

BRUCELOSE HUMANA NO ESTADO DE SÃO PAULO. INQUÉRITO SOROLÓGICO (*)

por

JANDIRA PLANET DO AMARAL
Médico do Instituto Butantã

AUGUSTO DE E. TAUNAY

e

J. R. C. NOVAES
Médicos do Instituto Adolfo Lutz

NELSON PLANET
Médico do Instituto Biológico

e

MARIA BRASIL ESTEVES
Assistente do Instituto Butantã

Desde que a infecção brucélica foi pela primeira vez comprovada no Brasil por CARINI e VESPUCCI, em 1932, nos 20 anos que se sucederam os casos bem documentados de brucelose elevam-se talvez a uma meia centena. Contrariamente e em flagrante contraste com êsses dados, a ocorrência da infecção veterinária, especialmente no gado, apresenta índices muito elevados. No Estado de São Paulo, em trabalho sistemático que realiza o Instituto Biológico, PENHA e D'APICE demonstraram que nossos rebanhos se apresentam pesadamente infectados, não sendo rara a incidência de 100%. Não só o gado vacum, mas também o suíno, de acôrdo com os dados de D'Apice, apresentam índices de infecção igualmente elevados.

Em São Paulo, NEIVA e MELLO (1930), foram os primeiros a verificar a ocorrência da brucelose em rebanhos bovinos do interior do estado, tendo assinalado alto índice de sôro-aglutinações positivas (10,4%) e, ao mesmo tempo, isolado de alguns animais o agente causador da moléstia.

No mesmo ano, NEIVA realiza o primeiro inquérito sorológico sôbre a moléstia, em soros humanos. Usou como antígeno suspensão de *B. suis* e *B. abortus*, obtida de culturas de 48 — 72 horas; a reação foi realizada em estufa a 37°C, 24 horas. Examinou 22 soros recebidos para diagnóstico de lues, de doentes suspeitos de febre tifóide e de indivíduos normais. Em três encontrou títulos aglutinantes significativos (aglutininas 1/80 a 1/160).

O mesmo autor, em 1935, realiza segundo inquérito, utilizando, como antígenos, emulsões de *B. melitensis* e *B. suis*, usadas separadamente. Pratica a reação em banho-maria a 55°C, 2 horas, fazendo uma primeira lei-

(*) Trabalho laureado com o prêmio MARIO PEREIRA, 1953, da Associação Paulista de Medicina. Entregue para publicação em 28 de dezembro de 1953.

tura e deixando em temperatura ambiente para segunda leitura no dia seguinte. Examinou 603 soros recebidos para reação de Widal ou diagnóstico de lues, obtendo 41 reações positivas, assim distribuídas: 6-1/20, 15-1/40, 7-1/50, 4-1/80, 7-1/80, 7-1/100, 2-1/320 e 1-1/640.

Considera aglutinação de 1/100 como índice seguro de infecção e de 1/80, como índice forte de suspeita da infecção. Em nenhum dos casos em que praticou a hemocultura encontrou o germe na corrente sanguínea.

CARINI, em 1937, realiza inquérito sorológico em 200 soros de doentes suspeitos de febre tifóide, tendo encontrado somente 1 positivo. Usou como antígeno suspensão de cultura de *B. abortus*. No caso positivo, isolou *B. suis* do sangue do paciente.

Em 1940, OLIVEIRA (citado por Parreiras Horta), em 1080 soros de indivíduos matriculados na Fundação Gafrée Guinle, cujo sangue fôra retirado para diagnóstico de lues, pesquisou aglutininas anti-brucela, obtendo os seguintes resultados:

| | | | | | |
|----------|----------------------|---------|----------|---------|---------|
| Antígeno | <i>B. melitensis</i> | 7 casos | 2-1/160 | 2-1/320 | 3-1/640 |
| „ | <i>B. abortus</i> | 32 „ | 16-1/160 | 7-1/320 | 9-1/640 |
| „ | <i>B. suis</i> | 10 „ | 6-1/160 | 3-1/320 | 1-1/640 |

Não nos foi possível obter o trabalho original do autor, motivo por que deixamos de transcrever a técnica usada em sua investigação.

Em 1943, SILVA em trabalho realizado no Rio Grande do Sul, verifica incidência muito elevada da moléstia no gado leiteiro que abastece Pôrto Alegre. Em amostras de leite, que correspondem acêrca de 3.400 animais, encontrou 21,79% positivas, fazendo a reação de aglutinação de Zammit (prova lenta). Em certos rebanhos encontrou positividade de 100%, o que coincidia com o estado de saúde do gado (abortos freqüentes). Verificou ainda que cachorros das mesmas localidades apresentavam título aglutinante anti-brucela de 1/640, chegando a isolar do sangue desses animais uma bactéria com caracteres morfológico-químicos de *B. abortus*. Passando à verificação de aglutininas em soros humanos de indivíduos suspeitos de febre tifóide, residentes em Pôrto Alegre e no interior do estado, obteve pequeno número de reações positivas. Em 811 soros, encontrou 6 casos positivos, cujo título aglutinante variava de 1/80 a 1/5120. Em 2, cujos títulos aglutinantes eram altos, isolou o germe por hemocultura, e nos 4 restantes, a história clínica permitia afastar a infecção brucélica. Em 101 soros do interior do estado obteve 2 com título aglutinante 1-1/80 e 1-1/320, não tendo podido obter dados clínicos a respeito desses pacientes.

Em 1944, PERES faz um inquérito em soros de doentes suspeitos de febre tifóide enviados ao Instituto "Ezequiel Dias", de Belo Horizonte. Utilizou somente os soros cuja reação de Widal fôra negativa, sendo os doentes residentes em Belo Horizonte e noutras localidade do Estado. Como antígeno, usou suspensão de *B. abortus* 295 de Huddleson, formulada a 0,5%. Tal antígeno foi padronizado de modo que 1 gôta em 1 cm³ de solução salina daria concentração de 300 milhões de germes. Usou, como temperatura de incubação para suas reações, 50°C em banho-maria, durante 24 horas. Em 167 soros examinados, obteve os seguintes resultados: 5-1/20,

1-1/40, 2-1/80, 1-1/150 e 3-1/640. Considera o título de 1/80 ou mais como de valor diagnóstico.

O mesmo autor, em 1945, realiza segundo inquérito utilizando 2160 amostras de sangue recebidas para diagnóstico de lues. Praticou reações rápidas em lâmina usando a técnica preconizada pelo "Bureau" de Indústria Animal dos E. U. A., técnica da estação experimental de Beltsville e também o método de Huddleson, preferindo o primeiro por ser mais facilmente padronizável. Os resultados que obteve foram os seguintes: 58-1/25, 25-1/50, 9-1/100, 1-1/200 e 1-1/3200. Não conseguiu informações clínicas dos 10 casos em que obteve aglutinações positivas de 1/100 a 1/200. No caso positivo a 1/3200, tratava-se de um veterinário com forma aguda de brucelose, comprovada pela hemocultura.

CAUSEY e AZEVEDO (1947), em Belém do Pará, pesquisando anticorpos anti-brucela pela técnica de aglutinação rápida de Huddleson em soros bovinos e humanos, encontraram anticorpos para brucela no soro de vacas leiteiras (62,5%) e de novilhas (21,4%), num total de 38 animais. Examinando outro lote de 253 vacas leiteiras, encontraram em 160 (63,2%), títulos aglutinantes de 1/25 ou mais. Na mesma ocasião, isolaram do leite de vaca com aglutininas no sangue, *Brucella abortus*. No pessoal encarregado desses animais (68), encontraram títulos aglutinantes em 16:7-1/25, 3-1/50, 1-1/100, 5-1/200. Examinaram 501 soros recebidos para diagnóstico da lues, tendo encontrado 3 reações positivas: 1-1/25, 1-1/50, 1-1/200. Desses soros, 251 eram de soldados norte-americanos, sendo um positivo a 1/50, e 250 de brasileiros, com dois positivos: 1-1/25 e 1-1/200.

Em 1947, SILVA, prosseguindo na averiguação dos casos de brucelose no Rio Grande do Sul, faz um resumo de suas observações de 1943 até a data da publicação de sua segunda comunicação, trazendo documentação muito importante sobre o que observou. Realizando reações de aglutinação para brucela em 2.244 soros suspeitos de febre tifóide, encontrou 13 nitidamente positivos, obtendo, em 6 deles, dados clínicos completos que confirmaram o diagnóstico da moléstia, tendo isolado *Brucella suis* do sangue de 4. Dos 7 restantes, não obteve informações quanto aos antecedentes. Fazendo um pequeno inquérito entre os trabalhadores de matadouros (107 operários), todos em contacto com carnes, encontrou 21 reagentes, ou seja 19,6% de positivos.

No mesmo trabalho analisa a infecção brucélica no gado bovino e suíno e em outros animais, mostrando o alto grau de infecção dos rebanhos e chamando a atenção para a possibilidade de o homem se infectar com *B. suis*, que é de grande virulência e patogenicidade, e lembra o fato de ser *Brucella abortus* (a mais comum no rebanho bovino) dotada de baixo poder patogênico para o homem, uma vez que raramente é isolada da corrente sanguínea, nos casos de doença.

Em 1952, PACHECO, examinando o soro de 832 doadores de sangue no Distrito Federal e 385 amostra de sangue recebidas pelo laboratório do Hospital dos Servidores do Estado, encontrou incidência de 5,23% de reações positivas, muito acima da média assinalada por outros pesquisadores. Só considera positivos os casos em que a aglutinação é superior a 1/80, aceitando os títulos de 1/40 a 1/80 como suspeitos. Descreve detalhadamente

as técnicas usadas em seu trabalho, não só na preparação do antígeno como também na realização e na leitura da reação, chamando a atenção para êsses detalhes técnicos, que considera fundamentais. Todas as reações foram executadas pelo método lento com incubação de 48 horas.

Em 1953, SCHLÖGEL, em Curitiba, realiza inquérito na população da capital paranaense e no interior do estado, em soros recebidos para diagnóstico de lues. Usou a técnica aconselhada pela "Animal Disease Station — National Agriculture Disease Center", de Beltsville, Maryland (E. U. A.), com antígenos preparados no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas de Curitiba. Introduziu modificação na técnica porquanto fazia reações em placas, tipo de reação de Kline, colocando a mistura soro-antígeno no agitador de Kline durante 7 minutos e sobre as placas, uma lâmpada para aquecer levemente a mistura. Examinou 620 soros recebidos para diagnóstico da lues de residentes na capital do estado (295 homens e 325 mulheres), tendo encontrado 7 casos suspeitos. Considera como negativa a reação até 1/25; suspeita, a partir 1/50 e positiva, além de 1/100. Para avaliar a porcentagem de amostras positivas no interior do estado, analisou o sangue de 874 soldados provenientes de vários municípios, tendo encontrado 2 casos suspeitos e 6 positivos. Examinando 27 amostras de sangue de leiteiros, encontrou 3 com aglutinação acima de 1/100.

Além dos trabalhos mencionados, referentes aos inquéritos sorológicos realizados nos vários Estados do Brasil, na literatura nacional ao nosso alcance encontramos número pequeno de casos nos quais se isolou o germe pela hemocultura.

Em ordem cronológica, temos o caso de CARINI (1932), que foi o primeiro no Brasil a isolar brucela pela hemocultura. Tratava-se de um tripeiro com a moléstia em fase aguda e a variedade isolada foi *suis*, identificada por BIER (1932).

No ano seguinte, BARROS e GIANONI (1933) relatam a observação de um descarnador do frigorífico Armour (S. Paulo), portador de brucelose aguda com *B. suis* no sangue circulante.

Em 1934, CARINI descreve novo caso da doença no qual isolou *B. suis* de um lavrador, que estivera partejando uma porca.

Segundo PACHECO e MELLO (1950), Wederhake, em 1934, estudando foco de brucelose na cidade de Santa Maria, isolou *B. abortus* de 2 mulheres com moléstia febril simulando febre tifóide. A primeira trabalhava num cortume e a segunda, sua mãe, foi quem dela tratou durante a moléstia.

No mesmo ano, PEREIRA FILHO, no Rio Grande do Sul, relata caso de mulher com sintomatologia de brucelose, de quem isolou, pela hemocultura, *B. abortus*, atribuindo o autor, como fonte de contágio, a ingestão de creme Chantilly.

Ainda em 1933, ANTUNES e CARNEIRO isolam em São Paulo, *B. suis* de um trabalhador de frigorífico.

No Rio de Janeiro, o primeiro caso, com hemocultura positiva, foi descrito, em 1934, por CORREA, em doente cuja profissão era de abatedor de porcos. O germe isolado foi identificado como *B. melitensis*, por Lacorte.

Assim foram-se sucedendo os diagnósticos de brucelose positivados pela hemocultura. BOTTINI (1936), no Rio Grande do Sul, relatou 1 caso de infecção por *B. abortus*, provavelmente devido à ingestão de leite cru. CARINI (1936 e 1937) isola *B. suis* de 2 doentes, um, açougueiro, e, o outro, tratador de animais.

BARROS (1937) observa 2 pacientes com moléstia aguda, de quem isolou *B. suis* do sangue. O interessante destes 2 casos é que os portadores da moléstia tinham como profissão a de tirador de areia e de motorista.

SILVA, em 1943, no Rio Grande do Sul, relata 9 casos com hemocultura positiva, 7 por *B. abortus* e 2 por *B. suis*. O mesmo autor, em 1947, completando suas observações, isola *B. suis* de mais 4 doentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Nossa intenção, ao planejar este trabalho, foi a de fazer um inquérito sorológico em vários grupos da população do Estado de São Paulo, utilizando técnicas perfeitamente padronizadas.

Não é nosso propósito analisar os vários processos usualmente empregados no diagnóstico laboratorial da brucelose; procuramos unicamente justificar quais as razões que nos levaram a dar preferência a certas técnicas, sem cogitar do emprego de outras.

No diagnóstico da brucelose são de uso corrente quatro processos:

- 1) Teste alérgico;
- 2) Índice opsonocitofágico;
- 3) Reação de aglutinação;
- 4) Cultura do agente causal.

Quanto ao valor dos dois primeiros, as opiniões dos vários autores não são concordes. O teste alérgico tem sido largamente utilizado, empregando-se, como antígeno, as preparações mais variadas, o que torna difícil a comparação dos resultados. SPINK e col. (1952), no relatório que apresentaram sobre alguns aspectos do critério diagnóstico da brucelose humana, chegam a dizer: o teste alérgico não serve de auxílio no diagnóstico de casos de brucelose; seu uso indiscriminado e sem crítica tem provocado confusão entre os clínicos; o emprego desta prova deve ser abandonado para uso diagnóstico.

Quanto ao índice opsonocitofágico, seu emprego requer um controle tal que dificilmente seria conseguido num inquérito desta natureza.

É a reação de aglutinação, sem dúvida alguma, o elemento de maior valor para o diagnóstico, desde que realizada dentro de normas certas.

É indispensável que os antígenos usados sejam preparados com amostras de brucela rigorosamente lisas porque, dada a tendência de essas bactérias dissociarem-se, podem ocorrer variações muito amplas na sua aglutinabilidade pelos soros imunes.

Obtida uma amostra de brucela que sirva para preparar antígeno, o método de prepará-lo, assim como as temperaturas de incubação, parece que não interferem com a leitura das reações.

FEINBERG e WRIGHT (1951), preparando antígenos formolados, fenicados ou mortos pelo calor, a partir de 22 culturas de brucela, originárias da mesma cepa, obtiveram, sempre, títulos aglutinantes semelhantes, para os mesmos soros fôsse qual fôsse o antígeno e a temperatura de incubação. Nas temperaturas de 24°C e 60°C não notaram diferenças nos seus resultados; somente aumentou o número de reações cruzadas não específicas para os antígenos fenolados, quando a temperatura de incubação era inferior a 56°C. Com antígenos formolados não houve êste inconveniente; no entanto, tais antígenos favoreceram o fenômeno da zona.

Resultados, divergentes com o mesmo sôro em vários laboratórios, mostram bem a importância do emprêgo de um antígeno uniforme e bem estandardizado.

MURDOCK e cols. (1952) fizeram inquérito sôbre a prova de aglutinação no diagnóstico da brucelose, realizada em vários laboratórios, cada qual usando antígenos próprios. Os resultados finais são de difícil comparação, o que bem mostra a necessidade de estabelecer técnica uniforme usando antígeno estandardizado, como já foi feito nos Estados Unidos da América do Norte para uso animal, o que permitiu o contrôle da infecção nos animais.

A afirmação de que aglutininas anti-brucela podem aparecer em outras doenças febris não parece ser verdadeira; não há dúvida de que estas, quando aparecem, apresentam títulos baixos.

A interpretação da reação é problema muito importante. Quanto mais alto o título aglutinante, maior a certeza de infecção ativa; um título de 1/100, juntamente aos sintomas da moléstia, já é de grande valor diagnóstico. Títulos mais baixos, em zonas onde a moléstia é endêmica, não devem ser considerados (SPINK e cols. 1952).

A ausência de aglutininas em doentes com hemoculturas positivas também já foi descrita. WEST e BORMAN (1945), cultivando sistematicamente coágulos sanguíneos de indivíduos com moléstia febril, verificaram em 16% a presença de brucelas sem o achado de aglutininas no sôro. Suas verificações, entretanto, não puderam ser reproduzidas por outros autores (SPINK, 1952).

A pesquisa das aglutininas tanto pode ser feita pelo método rápido, em lâmina, como pela aglutinação lenta, em tubo. A primeira tem a vantagem de nos informar, rapidamente, da presença de aglutininas num determinado sôro, não devendo ser utilizada com o fito de verificar o teor destas, que somente a aglutinação em tubo irá indicar de maneira certa.

Conforme verificaremos mais adiante, utilizamos os dois métodos: o da lâmina com antígeno corado, titulado para aglutinar até soros de título aglutinante 1/10 e o método lento, em tubo, para verificação do teor em aglutininas dos soros positivos. Achamos útil usar antígeno com tal sensibilidade porque, assim, dificilmente nos escaparia um caso, mesmo que o teor em aglutininas fôsse bastante baixo.

SPINK (1952), empregando, durante um período de 5 anos, antígeno semelhante, titulado para reagir com soros de título 1/100, obteve resultados plenamente concordes com os da aglutinação lenta.

HEMOCULTURA — É o único método de laboratório que permite o diagnóstico da moléstia sem sofrer contestação. Apesar de não ser positiva em grande número de casos, não pode deixar de ser empregada.

Por dificuldades independentes de nossa vontade, só a utilizamos em pequeno número de casos e, sempre que possível, nos que assinaláramos, previamente, título aglutinante no sangue ou quando a suspeita clínica era de brucelose.

Usamos o processo preconizado por Castañeda (1947), tomando o cuidado de utilizar, na preparação do meio de cultura, peptona que não contivesse fatores anti-brucelá (SCHUKARDT e cols. 1951 e PICKETT e NELSON (1951).

Nosso meio de cultura foi preparado de maneira idêntica ao descrito por Castañeda, somente tendo sido substituída a triptose "Difco" pela peptona "M. Albimi".

PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

ANTÍGENO RÁPIDO — A principal característica deste antígeno é ser suspensão espessa de brucelas adicionadas a um corante (azul de metileno). Para a standardização deste antígeno partimos de uma amostra que nos foi fornecida pelo Dr. Ruiz Castañeda.

Este antígeno foi preparado por um de nós, de acordo com a seguinte técnica: Amostras utilizadas — *Brucella abortus* 600 e *Brucella melitensis* 582, cuja estabilidade foi previamente verificada, não apresentando qualquer sinal de variação. Semear em tubos de ágar-fígado; 48 horas após, suspender o crescimento bacteriano em 10cm³ de solução fisiológica e semear, esta suspensão, em garrafas de Roux com ágar-fígado (um tubo para cada duas garrafas); incubar 24 horas em posição normal e, em seguida, invertê-las (ágar para acima) por mais de 24 horas. Ao fim deste tempo de incubação verificar a pureza da cultura e suspender o induto, em 20 cm³ de solução fisiológica formolada a 4%. Filtrar as suspensões em algodão, adicionando-se mais formol de modo a obter concentração final de 10%. Deixar a suspensão bacteriana em temperatura ambiente durante 48 a 72 horas. Desprezar o depósito mais grosseiro, que decantou no fundo das provetas e centrifugar a suspensão bem homogênea de bactérias a 2.000 r. p. m., durante duas horas. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o centrifugado no menor volume possível de solução fisiológica. O antígeno foi sempre preparado usando-se partes iguais de brucelas *abortus* e *melitensis*.

O acerto final da suspensão foi feito, por comparação, com o antígeno original de Castañeda, a fim de se obter turvação e coloração semelhantes.

Depois de preparada cada partida, o antígeno foi testado para verificar sua sensibilidade. Utilizamos soros positivos, em geral de origem animal (bovinos), previamente titulados.

Como nossa principal intensão era a de obter aglutinações mesmo em títulos muito baixos (inclusive 1/10), tivemos o cuidado de preparar antígeno com o máximo de sensibilidade, isto é, que reagisse com soros cujos títulos fôsem de 1/10.

As condições que permitem obter antígenos mais ou menos sensíveis dependem da concentração de germes, da concentração do corante, e da predominância de uma das amostras. Em nosso caso, a concentração de germes que satisfaz plenamente nossas exigências era tal que diluído cem vezes, correspondia ao tubo n.º 3 da escala de Mac Farland. O corante foi sempre juntado para obter coloração igual ao padrão de Castañeda. As amostras foram usadas em partes iguais. As diversas partidas de antígeno, preparadas nessas condições, aglutinavam com soros de títulos 1/10. Para preparar antígenos menos sensíveis, devem-se variar as condições de seu preparo. Pode-se aumentar as concentrações dos germes fazendo predominar *Brucela abortus*, que produz antígenos mais "duros". Esta mesma suspensão bacteriana, sem o corante, constitui a emulsão-mãe usada para obtenção do antígeno lento, que é utilizado diluindo-se aquela cem vezes.

TÉCNICA DA REAÇÃO RÁPIDA — Em placa de vidro quadriculada, colocada sobre uma caixa iluminada (caixa de Huddleson), distribuem-se os soros a testar (0,03 cm³) aos quais se adicionam 0,02 cm³ do antígeno. Misturam-se com bastãozinho de vidro e a leitura é feita até o prazo de 2 minutos. Os resultados positivos são, nitidamente distintos dos negativos, pela formação de finos flocos de aglutinação, muito semelhantes aos que se obtêm na determinação dos grupos sanguíneos.

TÉCNICA DA AGLUTINAÇÃO LENTA — Os soros, positivos pelo teste da aglutinação rápida, foram examinados pelo método lento, partindo-se da diluição 1/25. A leitura foi feita após incubação de 24 horas a 37°C e permanência até o dia seguinte em temperatura ambiente ou geladeira. Nos casos fortemente positivos e nos que havia suspeita clínica de brucelose, sempre que possível, foi feita a hemocultura, assim como obtidos dados relativos aos antecedentes mórbidos.

RESULTADOS

Usando as técnicas anteriõrmente descritas, examinamos 13.177 soros, enviados ao Instituto Adolfo Lutz pelos vários Centros de Saúde do Estado, Hospital das Clínicas da Universidade, serviço do Professor João Alves Meira e pelo Hospital Emilio Ribas, e que podem ser divididos em quatro grupos distintos :

- 1) soros de doentes com diagnóstico clínico de brucelose.
- 2) soros de doentes com diagnóstico clínico de moléstia infecciosa, excluída a brucelose.
- 3) soros recebidos para diagnóstico de lues ou de indivíduos normais (doadores de sangue).
- 4) soros de empregados em matadouro.

As amostras examinadas correspondem a indivíduos residentes na capital do estado e nos vários municípios do interior.

Consideramos o grupo 3 como sendo de indivíduos normais, representativo da média da população do estado.

A título de comparação, incluímos, em nossa observação, empregados de matadouro, apesar de ser seu número reduzido, pois sabemos de antemão, estarem estes indivíduos muito expostos à infecção brucelica. I) Considerando como de significação diagnóstica um título aglutinante igual ou superior a 1:100, resumimos, na tabela I os resultados obtidos para cada grupo.

TABELA I

| GRUPO | Total de reações | Reações positivas $\geq 1:100$ | |
|----------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------|
| | | Número | % sobre o total |
| Suspeita clínica de brucelose... | 170 | 6 | 3,53 |
| Doenças febris diversas | 1.825 | 14 | 0,77 |
| Testemunhos (normais) | 11.152 | 3 | 0,03 |
| Trabalhadores de matadouro... | 30 | 1 | 3,33 |

Dáí podemos tirar as seguintes conclusões.

a) A positividade da sôro-aglutinação em 3,53% dos 170 indivíduos com suspeita clínica de brucelose contrasta, nitidamente, com a proporção de 0,03% de reações positivas no grupo de 11.152 indivíduos "normais", tomados como testemunho. A magnitude da diferença, entre as incidências de reações positivas nesses dois grupos, é de tal ordem que dispensa qualquer tratamento estatístico para comprovação da significância. Este resultado, embora por si só não prove a especificidade da soro-aglutinação para o diagnóstico de brucelose, indica claramente que, com a técnica empregada, apenas muito excepcionalmente serão obtidas reações positivas em indivíduos normais.

b) No grupo de 1825 indivíduos com doenças febris, excluída a brucelose, a incidência de reações positivas foi de 0,77%, que é ainda nitidamente mais elevada que no grupo testemunho. Este resultado dá uma medida da extensão em que devem ocorrer casos de brucelose diagnosticados clinicamente como infecções outras.

c) A diferença, na incidência de reações positivas, entre o grupo de indivíduos com suspeita clínica de brucelose e o grupo das doenças febris diversamente diagnosticadas, é altamente significativa.

TABELA II

| GRUPO | Positivos \geq 100 | Negativos | Total |
|-------------------------------|----------------------|-----------|-------|
| Doenças febris diversas | 14 | 1.811 | 1.825 |
| Suspeita de brucelose | 6 | 164 | 170 |
| Total | 20 | 1.975 | 1.995 |

$$\chi^2 = 9,3350$$

$$P = 0,0022$$

Esta diferença indica paralelismo definido entre o diagnóstico clínico e o resultado da soro-aglutinação, com relação à brucelose, em grupos de indivíduos nas condições dos que foram por nós observados.

d) Em operários de matadouro, embora nossas conclusões aqui tenham a reserva ditada pelo número reduzido de observações (30), a incidência de reações positivas (3,33%) foi relativamente elevada, igual a observada no grupo de indivíduos com diagnóstico de brucelose.

II) Considerando-se agora as reações positivas em título inferior a 1:100, nos indivíduos dos 4 grupos estudados, excluídos os que apresentaram títulos aglutinantes mais altos, podemos resumir nossos resultados na tabela III.

TABELA III

| GRUPO | Total de reações | Reações positivas < 1 : 100 | |
|---------------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------|
| | | Número | % sobre o total |
| Suspeita clínica de brucelose.. | 164 | 6 | 3,66 |
| Doenças febris | 1.811 | 10 | 0,55 |
| Testemunhos "normais" | 11.149 | 34 | 0,30 |
| Trabalhadores de matadouro.. | 29 | 6 | 20,69 |

Dêsses resultados, podemos tirar as seguintes conclusões :

a) A incidência de soro-aglutinação positiva, em título baixo, é significativamente maior nos indivíduos com suspeita clínica de brucelose, quando comparada, seja com a incidência nos indivíduos "normais" seja com a incidência nos indivíduos com doenças febris diversas :

TABELA IV

| GRUPO | Positivos < 1 : 100 | Negativos | Total |
|-----------------------------------|------------------------|-----------|--------|
| Suspeita clínica de brucelose ... | 6 | 158 | 164 |
| Testemunhos "normais" | 34 | 11.115 | 11.149 |
| Total | 40 | 11.273 | 11.149 |

$$\chi^2 = 42.5117$$

$$P < 0,001$$

b) A incidência de soro-aglutinações positivas, em título baixo, não difere, significativamente, entre o grupo de indivíduos normais e o de indivíduos apresentando doenças febris diversas :

TABELA V

| GRUPO | Positivos < 1 : 100 | Negativos | Total |
|-----------------------------------|------------------------|-----------|-------|
| Suspeita clínica de brucelose ... | 6 | 158 | 164 |
| Doenças febris diversas | 10 | 1.801 | 1.811 |
| Total | 16 | 1.959 | 1.975 |

$$\chi^2 = 14.3995$$

$$P < 0,001$$

c) Elevado índice de reações positivas em título baixo (20,69%) é encontrado em operários de matadouro, aparentemente normais, o que dispensa qualquer tratamento estatístico.

Tais conclusões são altamente sugestivas de que as soro-aglutinações positivas em título baixo resultem de infecções por brucela. Representassem tais reações inespecificidade da soro-aglutinação, seria de se esperar que ocorressem numa mesma proporção nos diferentes grupos de indivíduos. A equivalência das proporções observadas nos grupos de indivíduos "normais" e de portadores de doenças febris diversas, sugere, ainda, que as aglutinações em título baixo não resultam de reação anamnésica.

III) Voltando a considerar o grupo de operários de matadouro, constatamos que nossos resultados, embora baseados em número pequeno de observações, se assemelham aos verificados por outros autores que usaram

métodos e material comparáveis. Considerando tanto as reações positivas em título alto como as de título baixo, nossos resultados são muito semelhantes aos assinalados por PERES, ANGELO e MALHEIROS.

TABELA VI

| GRUPO | Positivos | Negativos | Total |
|-------------------------------|-----------|-----------|--------|
| Doenças febris diversas | 10 | 1.801 | 1.811 |
| Testemunhos "normais" | 34 | 11.115 | 11.149 |
| Total | 44 | 12.916 | 12.960 |

$$\chi^2 = 2.131$$

$$P = 0,145$$

TABELA VII

| AUTOR | Reações positivas > 1 : 100 | Reações positivas < 1 : 100 | Reações negativas | Total de reações |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------|
| Presente trabalho | 1 | 6 | 23 | 20 |
| Peres e col (1945) | 10 | 22 | 136 | 168 |
| Total | 11 | 28 | 159 | 198 |

$$\chi^2 = 1,236$$

$$P = 0,53$$

Conforme indica o teste do que ao quadrado não há diferença, estatisticamente significativa, entre as duas séries de resultados.

HEMOCULTURA — Foi realizada em 23 casos nos quais havia aglutininas no sôro, tendo sido positiva em um paciente, de quem foi isolada *B. suis*. Em doentes com suspeita clínica da moléstia, mas sem aglutininas no sangue, foram realizadas 30 hemoculturas, tôdas com resultado negativo.

DISCUSSÃO

Fôsse falho o método que usamos, certamente não iríamos encontrar maior número de aglutinações positivas $\geq 1:100$ nos grupos onde era de se esperar que estas ocorressem. O fato de operários de matadouro e de doentes com suspeita clínica de brucelose terem apresentado índice sorológico bastante semelhante bem mostra que a técnica empregada foi boa. Houvesse esta sido má, não haveria diferença tão altamente significativa

entre o grupo de indivíduos com suspeita clínica de brucelose e o de indivíduos com doenças febris de outra origem ($\chi^2 = 9,335$; $P = 0,002$), mostrando paralelismo definido entre a suspeita clínica e o resultado da soro-aglutinação.

A enorme diferença entre o grupo normal e o de suspeita clínica (0,03 para 3,53%) dispensa tratamento estatístico para comprovação de significância. Se bem que não prove a especificidade da soro-aglutinação, indica claramente que, muito excepcionalmente, se obterão reações positivas em indivíduos normais.

Se analisarmos os resultados positivos $<1:100$, verificamos que aqui também o maior número de reações positivas ocorre no grupo de doentes suspeitos, se bem que em número muito inferior ao dos operários de mata-douro.

No grupo de indivíduos normais e de indivíduos apresentando doenças febris diversas, as aglutinações em título baixo não diferem significativamente ($\chi^2 = 2,131$; $P = 0,145$), o que nos leva a crer que êstes títulos sanguíneos também resultem de infecções por brucela, passadas ou presentes. Representassem inespecificidade da reação, deveriam ocorrer nas mesmas proporções nos diferentes grupos. A equivalência observada nos grupos de indivíduos normais e de portadores de doenças febris diversas, sugere ainda que não são devidas à reação anamnésica.

Diante desses resultados, julgamos não ser a brucelose moléstia tão freqüente como se supõe. Poderá parecer estranha esta nossa afirmação de que a brucelose humana seja pouco freqüente em São Paulo, pois a literatura médica brasileira mais recente acha-se enriquecida de grande número de casos considerados como tal.

Além do mais, o fato de o gado vacum em São Paulo apresentar alto índice de infecção brucélica ativa, com conseqüente elevado índice de soro-aglutinações positivas e eliminação do agente patogênico pelo leite que servirá ao consumo da população, tem levado muitos médicos e sanitaristas a crerem que a brucelose humana em nosso meio seja premente problema sanitário.

Acreditamos que, a muitos casos de brucelose humana até hoje diagnosticados entre nós, falem bases suficientes para o estabelecimento de um diagnóstico preciso.

A discordância entre a alta infecção do gado vacum, principal fonte de contágio para o homem, e o baixo índice da doença humana pode ser explicada perfeitamente pelo fato de aqui existir somente a variedade *abortus*, de baixa patogenicidade para o homem e que, quando o infeta, tende a desaparecer espontaneamente ou sendo pequeno o número de indivíduos nos quais a moléstia toma a típica evolução de febre ondulante.

Como se pode verificar nas tabelas de nosso trabalho, o alto índice de positividade, encontrado entre os trabalhadores de matadouro, contrasta, de maneira muito nítida, com os índices da população tomada como testemunha. Ora, se a infecção fôsse fácil de ser adquirida, tal fato não deveria ocorrer numa região como é nosso Estado, onde existem rebanhos nos quais 100% dos animais são doentes, muitos deles eliminando o germe pelo leite.

Verificações feitas por MORALES OTERO (1929 e 1930), mostram bem as dificuldades de provocar a infecção com *B. abortus*. Para provocar a doença em voluntários, por via gastrintestinal, necessitou de 7 doses sucessivas de *B. abortus* suspensas em leite, tendo obtido um caso de infecção leve. Quando usou *B. melitensis* ou *B. suis*, duas doses foram suficientes para provocar forma aguda de brucelose.

Outro fato sugestivo de que a maioria dos casos de febre ondulante, diagnosticados clínica e sorologicamente em São Paulo, sejam produzidos por *B. abortus* é a baixa freqüência de positividade das hemoculturas.

Nos países onde a moléstia é endêmica, devida a *B. melitensis* e *B. suis*, a regra é a obtenção de 80% de hemoculturas positivas dos casos clinicamente bem diagnosticados e quase 100% nas formas agudas com título aglutinante no sangue (SPINK, 1952, CASTAÑEDA, 1942). No entretanto, na moléstia produzida pela *B. abortus*, a hemocultura só é positiva em 10-20% (Wilson e Miles).

Nosso trabalho mostrou que, hemoculturas feitas em doentes com sintomatologia típica de brucelose e com alto título aglutinante no sangue, sempre foram negativas, mesmo quando repetidas por várias vêzes. Como já vimos anteriormente, todos os casos bem documentados de brucelose humana em São Paulo, que pudemos verificar, tinham como agente etiológico *B. suis*. Dados epidemiológicos sobre este tipo de moléstia, computados em outros países, mostram que ela é essencialmente profissional, ocorrendo entre pessoas que lidam com porcos, sobrevivendo a infecção através da pele lesada.

Os dados acima citados assinalam a relação muito nítida entre a profissão e a doença.

Assim sendo, a enorme discrepância entre a extensão da infecção veterinária e a baixa freqüência da doença humana seriam perfeitamente explicáveis, em nosso Estado, pela pouca patogenicidade de *B. abortus* para o homem e pelo fato de a ocorrência de *B. suis* estar ligada à moléstia profissional.

Nos países onde a moléstia é endêmica, com número elevado de doentes, a regra é o isolamento de *B. melitensis*, que, das três espécies, é a mais patogênica para o homem.

No Brasil, a variedade *melitensis* só foi assinalada rarissimamente, e, mesmo alguns casos são discutíveis. Em medicina veterinária não tem sido assinalada de todo. Acresce que a principal fonte de infecção *melitensis*, o gado caprino, tem pouca expressão econômica no Brasil e, pelos dados disponíveis, encontra-se indene da infecção por *B. melitensis*.

Por outro lado, sendo o leite a principal fonte de infecção, o hábito indiscutível do uso do leite fervido, poderá, talvez, representar papel importante na prevenção da moléstia, sendo forçoso convir, entretanto, que não dispomos de qualquer dado em abono desta hipótese.

RESUMO

Os autores, usando a técnica de Castañeda, realizaram um inquérito sorológico sobre a brucelose no Estado de São Paulo. Examinaram o soro de doentes: 1) com diagnóstico clínico de brucelose (170); 2.º de doentes

com diagnóstico clínico de moléstia infecciosa, excluída a brucelose (1825); 3.º soros de indivíduos supostos normais para diagnóstico de lues ou de doadores de sangue (11.152); 4.º sôro de operários de matadouro (30).

A incidência de reações positivas a título <100 entre os indivíduos com suspeita clínica de brucelose (3,53%) e do grupo suposto normal (0,036), dispensa tratamento estatístico, mostrando, ao mesmo tempo, que, com a técnica empregada, excepcionalmente, serão obtidas reações positivas em indivíduos normais.

A incidência de reações positivas, entre o grupo de indivíduos com suspeita clínica de brucelose e os de doenças febris diversamente diagnosticadas, é altamente significativa ($x = 9,335$ $P = 0,0022$), mostrando um nítido paralelismo entre o diagnóstico clínico e a sôro-aglutinação.

As reações em título <100 sugerem que sejam resultantes de infecções por brucela, uma vez que ocorreram em muito maior número no grupo com suspeita clínica da doença. Se não fôsse essa a causa, seria de se esperar que ocorressem numa mesma proporção nos diferentes grupos de indivíduos. A igualdade das proporções observadas nos grupos de indivíduos "normais" e de portadores de doenças febris diversas faz crer que as aglutinações em título baixo não resultam de reação anamnésica.

Apesar do número reduzido de observações dos trabalhadores em matadouro, nossos resultados são semelhantes aos assinalados por outros autores nacionais, não havendo diferença estatisticamente significativa.

O fato do grupo vacum apresentar alto índice de infecção brucélica ativa, principal fonte de contágio para o homem, sendo baixo o índice da doença humana, pode ser explicado por serem os animais infetados pela variedade *B. abortus* de baixa patogenicidade para o homem.

Todos os casos publicados em São Paulo em que a moléstia foi comprovada pela hemocultura tinham como agente etiológico a *B. suis* estando a doença quase sempre ligada à moléstia profissional.

Talvez a pasteurização do leite ou sua fervura, hábito normal da população, represente um papel importante na prevenção da moléstia.

SUMMARY

The authors using the Castañeda brucella slide agglutination test, performed an inquire in São Paulo, Brazil.

The blood of four groups of patients was tested: 1) with clinical diagnosis of brucellosis (170); 2) with clinical diagnosis of infectious disease, not suspected of brucellosis (1825); 3) samples for lues diagnosis (11.152); 4) slaughter-house workers (30).

The antigen used, was prepared according to Castañeda rapid antigen, colored with methylene blue. This antigen was built in such a way that it will agglutinate sera with a tube title as weak as 1/10 and was used for screening test. The same antigen, without the dye, was used for tube agglutination.

Blood cultures (Castañeda method) were performed in 23 blood specimens. Considering a tube title of 1/100 as indicative of brucellosis our results may be resumed as follows:

| GROUP | TOTAL OF REACTIONS | Positive \geq 1/100 | |
|--|--------------------|-----------------------|------|
| | | N.º | % |
| 1) Clinical diagnosis of brucellosis | 170 | 146 | 3.53 |
| 2) Infectious diseases not suspected of brucellosis..... | 1,825 | 14 | 0.77 |
| 3) Lues samples | 11,152 | 3 | 0.03 |
| 4) Slaughter-house workers..... | 30 | 1 | 3.33 |

Comparing agglutination title between group 1 (3,53%) and groups 3 (0.003) we may conclude that : 1) with our technic positive reactions will occur excepcionally in the supposed normal group ; 2) clinical diagnosis and serum agglutination run in paralel ($\chi^2 = 9.350$ $P = 0.002$) ; 3) higher incidence of positive reactions in group 2 shows clearly that brucellosis may simulate another infectious diseases.

Considering now titles below 1/100 we may resume our results as follows :

| GROUP | TOTAL OF REACTIONS | Positive $<$ 1/100 | |
|---|--------------------|--------------------|-------|
| | | N.º | % |
| 1) Clinical diagnosis of brucellosis | 160 | 6 | 3.66 |
| 2) Infectious disease brucellosis not suspected. | 1,811 | 10 | 0.55 |
| 3) Lues samples | 11,149 | 34 | 0.30 |
| 4) Slaughter-house workers..... | 29 | 6 | 20.69 |

We may conclude that : 1) the higher incidence of a low blood title in patients which clinical diagnosis of brucellosis is statistically significant if we compare with group 3 ($\chi^2 = 42.5117$ — $P < 0.001$) and group 2 ($\chi^2 = 14.399$ $P < 0.001$).

We may assume that even a positive reaction in low title must be caused by brucella infection previous or actual.

2) There is not any statistical difference between groups 2 and 3 ($\chi^2 = 2.131$ $P = 0.145$). If these reactions were inespecific, probably they would occur in the same proportion in all different groups. The similarity of incidence between groups 2 and 3 shows clearly that agglutinations in low title are not due to anamnestic reaction.

Blood culture was realized in 23 patients and only one time we were able to recover the brucella organism identified as *B. suis*.

Although the native cattle presents the brucellosis in a high degree, being the chief source of infection in man, the incidence of the disease is very low in humans. This is explained by the fact that the brucellosis in cattle, caused by *Brucella abortus*, is of low pathogenicity for the human being.

All cases of human brucellosis diagnosed in S. Paulo with positive hemoculture for *Br. suis* prove that the infection found is almost exclusively a professional disease.

The pasteurization or the simple boiling of the milk, a common use of population, are of a great importance in the prevention of the disease in man.

* * *

Não podemos deixar de consignar os nossos agradecimentos ao Dr. Paulo Melo Freire que se encarregou da parte estatística do nosso trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- ANTUNES, A. e CARNEIRO, V. (1933) — *Brucella suis* e sua ação patogênica para o homem. *Rev. Soc. Paul. Med. Vet.* 3 : 107-119.
- BARROS, O. M. (1937) — As bruceloses humanas no Brasil. A propósito de alguns casos observados em S. Paulo. *Rev. Clin. S. Paulo*, 1 : 24-42.
- BARROS, O. M. e GIANINI, G. (1933) — Sobre um caso de brucelose de São Paulo. *An. Paul. Med. Cir.* 26 : 125-126.
- BIER, O. (1932) — Caracterização bacteriológica da amostra de *Brucella*, de proveniência humana, isolada pelo Prof. Carini, em S. Paulo. *Arch. Biologia* 15 : 140-141.
- BOTTINI, A. (1936) — Brucelose humana. *Brasil Médico* 50 : 1014-1018.
- CARINI, A. (1934) — Mais dois casos de febre ondulante. *Arch. Biologia* 16 : 32-35.
- CARINI, A. (1936) — Mais alguns casos de febre ondulante. *Arch. Biologia* 20 : 14-16.
- CARINI, A. (1937) — Ainda um caso de febre ondulante causada por *Brucella suis*. *Arch. Biologia* 21 : 11-12.
- CARINI, A. e VESPUCCI, P. (1932) — Primeiro caso autóctone de febre ondulante, comprovado pela hemocultura, observado no Brasil. *Arch. Biologia* 15 : 135-138.
- CASTAÑEDA, M. R. (1947) — A practical method for routine blood in brucellosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73 : 46-49.
- CASTAÑEDA, M. R.; TOVAR, R. e VELEZ, R. (1942) — Studies on brucellosis in Mexico. Comparative study of various diagnostic tests and classification of the isolated bacteria. *J. Inf. Diseases* 70 : 97-102.
- CAUSEY, C. E. e AZEVEDO, M. C. (1947) — Infecção por *Brucella* no homem e no gado em Belém, Pará. *Rev. Serviço Espec. Saúde* 1 : 77-86.
- CORREA, J. J. (1934) — Primeiro caso de febre ondulante aparecido no Rio de Janeiro. *Brasil Médico* 48 : 953-954.
- FEINBERG, R. J. e WRIGHT, G. G. (1951) — Factors influencing the agglutination titration in human brucellosis. *J. Immunology* 67 : 115-122.
- HORTA, P. PARREIRA (1942) — Bruceloses. *Arg. Higiene* 12 : 113-176.
- MURDOCK, F.; ROEPKE, M. H. e BLOOD, B. D. (1952) — Uniformización del diagnóstico de la brucellosis en las Américas. 1. Estudios comparativos de los metodos de laboratorio en uso. *Bol. Ofic. Sanit. Panamericana* 32 : 136-146.
- NEIVA, C. (1930) — Agglutininas para *Brucella abortus* em soros humanos. *Rev. Soc. Paul. Med. Vet.* 1 : 73-80.

- NEIVA, C. (1935) — Aglutininas para o gênero *Brucella* em soros humanos. *An. Paul. Med. Cir.* 30 : 5-6.
- NEIVA, C. e MELLO, A. (1930) — A moléstia de Bang em S. Paulo. *Rev. Soc. Paul. Med. Veter.* 1 : 118-122.
- OTERO, P. M. (1929) — Experimental infection of *Brucella abortus* in man. *Porto Rico J. Pub. Health Trop. Med.* 5 : 144-157.
- OTERO, P. M. (1930) — *Brucella abortus* in Porto Rico. *Porto Rico J. Pub. Health Trop. Med.* 6 : 3-88.
- PACHECO, G. (1952) — Freqüência de brucelose particularmente em candidatos a doadores de sangue. *Brasil Médico* 65 : 227-232.
- PACHECO, G. e MELLO, M. T. (1950) — Brucelose humana no Brasil. Contribuição para o estudo da casuística nacional. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 48 : 393-436.
- PERES, J. N. (1944) — Pesquisas de aglutininas para *Brucella abortus* em soros Widal negativos. *Brasil Médico* 58 : 449-450.
- PERES, J. N. (1945) — A febre ondulante no Estado de Minas Gerais. *Brasil Médico* 59 : 2-4.
- PERES, J. N.; ANGELO, P. e MALHEIROS, C. (1945) — Investigações sobre a febre ondulante em Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais). An. III.º Congr. Bras. Vet. Porto Alegre, Outº 1945, pp. 558-564.
- PICKETT, M. J. e NELSON, E. L. (1951) — Observations on the problem of *Brucella* blood cultures. *J. Bacteriology* 61 : 229-237.
- SCHLÖGEL, F. (1953) — Contribuição ao conhecimento da brucelose humana em Curitiba. *Hospital* 43 : 405-409.
- SCHUKARDT, V. T.; RODE, L. J.; FOSTER, J. W. e OGLESBY, G. (1949) — An anti-brucella factor in peptones. *J. Bacteriology* 57 : 1-8.
- SILVA, N. N. da (1943) — A brucelose no Rio Grande do Sul. *Arq. Dept. Estad. Saúde. R. G. Sul* 4 : 7-14.
- SILVA, N. N. da (1947) — Brucelose. O problema humano e veterinário no Rio Grande do Sul. *Hospital* 32 : 925-938.
- SPINK, W. W. (1952) — The laboratory in the diagnosis of brucellosis. *Amer. J. Clin. Pathol.* 22 : 201-211.
- SPINK, W. W. (1952a) — Correlation of a rapid slide agglutination test (Castañeda) with a tube agglutination test in screening suspected cases of human brucellosis. *J. Lab. Clin. Med.* 40 : 593-600.
- SPINK, W. W.; McCULLOUGH, N. B.; HUTCHINGS, L. M. e MINGLE, C. R. (1952) — Diagnostic criteria for human brucellosis. Report N.º 2 of the National Research Council, Committee on public health aspects of brucellosis. *J. A. M. A.* 148 : 805-808.
- WEST, D. E. e BORMAN, E. K. (1945) — The culturing of blood clots for *Brucella* organisms. *J. Infect. Diseases* 77 : 187-192.
- WILSON e MILES — Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and immunity. Baltimore, Williams and Wilkins, 1946.