

REAÇÃO DE FIXAÇÃO EM SUPERFÍCIE COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FEBRE TIFÓIDE (1)

USE OF SURFACE FIXATION IN THE LABORATORIAL DIAGNOSIS OF TYPHOID FEVER

CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO (2)

SUMMARY

BRANDÃO, C.H.B. — Use of surface fixation in the laboratorial diagnosis of typhoid fever. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 17-35, 1972.

Sera from 100 patients of typhoid fever had been tested by means of the surface fixation and of the Widal test using somatic and flagelar antigens, in comparison with the results of hemocultures.

There was strict accordance between the results obtained through the hemoculture and the surface fixation reaction, while, for the same sera, the Widal test showed negative results in 18 cases where the somatic antigen was used and in 24 cases where the flagelar antigen was used.

In 200 sera of patients with clinical and laboratorial diagnosis of infectious diseases other than typhoid fever, the surface fixation reaction showed always negative results; the Widal test using somatic antigen was positive in 52% of the cases and when the flagelar antigen was used the results were positive in 14,5% of the cases.

The adoption of the surface fixation reaction is suggested for the laboratorial diagnosis of the typhoid fever due to its greater sensibility and specificity.

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico da Febre Tifóide em nosso meio continua sendo um dos problemas que os laboratórios de Saúde Pública têm de enfrentar. Em 1969, o Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, foi solicitado a elucidar 1129 casos suspeitos de febre tifóide, revelando 85 casos positivos por hemocultura e muitos outros pela reação de Widal. Em 1970, maiores ainda foram as solicitações, 1717 casos, dos quais 192 foram confirmados por hemocultura e muitos outros, também, pela reação de Widal. Tratando-se de meio onde as condi-

ções epidemiológicas, tanto na Capital quanto no Interior, são ainda precárias, justificam-se, pois, as cautelas habituais de nossos clínicos, lembrando-se da febre tifóide toda vez que deparam com casos de doença febril de etiologia obscura. A natureza septicêmica de doença, determinando abundância de sintomas, bem como o fato incontestado da sua existência endêmica no Estado de São Paulo, levam muitos clínicos a solicitarem a ajuda do laboratório para esclarecimento do diagnóstico.

Baseia-se o diagnóstico de laboratório de febre tifóide no isolamento e identificação do agente infeccioso — *Salmonella typhi* — ou na

(1) Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos para obtenção do título de Doutor em Ciências — Microbiologia e Imunologia, São José dos Campos, SP., 1971.

(2) Professor Assistente da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, S.P.

verificação, no sangue dos pacientes, de anticorpos específicos para o bacilo tífico. O ideal seria o isolamento e identificação do agente infeccioso o que nem sempre é possível uma vez que o germe, em certas fases da doença, desaparece da corrente sanguínea ou, como hoje em dia é freqüente, o paciente é precocemente medicado com agentes antimicrobianos.

Fica, portanto, reservada ao diagnóstico sorológico uma função muito importante e, uma vez utilizado em condições adequadas, é de grande valia na orientação diagnóstica.

De todas as provas sorológicas, descritas até hoje para diagnóstico da infecção tífica, somente a reação de aglutinação — reação de Widal — tem sido largamente usada. Mas, embora seja um bom meio diagnóstico, apresenta falhas e, portanto, seria de grande significação, para evidenciação rápida da febre tifóide, o estudo de outra reação sorológica que satisfizesse os objetivos colimados — sensibilidade, especificidade, rapidez de execução e modicidade de custo — que nos propuzemos a fazer e é o assunto do presente trabalho: *estudo da reação de fixação em superfície de Castañeda, como método diagnóstico da febre tifóide*, em confronto com hemocultura e reação de Widal.

2. HISTÓRICO

2.1 Generalidades

Não há negar que a propriedade de certos soros, provenientes de animais, de se mostrarem capazes de promover “in vitro” a aglomeração dos germes inoculados foi evidenciada pela primeira vez por CHARRIN & ROGER⁵, quando pesquisavam a “ação dos humores sanguíneos, não só sobre a vitalidade, como também no que respeita às diversas propriedades dos micróbios”. Esse trabalho dos citados autores revelou, na realidade, o fenômeno da “aglutinação”, que “consistia na aglomeração dos micróbios em ajuntamentos ou grumos mais ou menos volumosos”. Embora tivessem descrito o fenômeno com notável exatidão, não se preocuparam em denominar essa propriedade, observada nos soros

de animais vacinados com *Pseudomonas aeruginosa*

Coube a GRUBER¹³ qualificá-la de “aglutinina” e, com efeito, deve-se a esse autor a demonstração de que soros de indivíduos convalescentes de febre tifóide continham tais anticorpos, pois com aqueles era possível aglutinar *Salmonella typhi*. Note-se, porém, que GRUBER & DURHAN¹⁴ diziam que as aglutininas antitíficas eram encontradas em indivíduos “que conseguiam sobreviver à infecção tífica”, nada acrescentando sobre a possibilidade de as referidas aglutininas existirem no soro dos que ainda estavam em pleno período de infecção.

Evidencia-se, pois, o mérito de WIDAL³⁶ ao demonstrar que os anticorpos aglutinantes do bacilo tífico podiam ser encontrados no sangue dos pacientes até mesmo no terceiro dia da doença, servindo, portanto, não apenas como evidência da imunidade, como referiam Gruber & Durhan, mas, seguramente, como prova de infecção.³³ O próprio Widal, de parceria com Sicard³³ esmiuçou devidamente o assunto — distinção entre “reação de imunização” e “reação de infecção” — esclarecendo com precisão a diferença que entendia existir entre um e outro conceitos³⁴.

Evidentemente, o “sorodiagnóstico de Widal” é prova sorológica em que agem as aglutininas tíficas, assim como são aglutininas os anticorpos que revelam um passado de febre tifóide; Widal, contudo, insistia neste ponto, que é capital: “o sorodiagnóstico evidencia infecção e não imunidade”. Aliás, é por assim pensar que médicos e sanitaristas solicitam do laboratório o auxílio da reação de Widal, quando suspeitam de infecção pelo bacilo tífico. Sem pretender entrar, agora, no mérito da questão, cumpre-nos assinalar que, decorridos quase oitenta anos de sua ininterrupta aplicação, tinha WIDAL³⁷ razão quando proclamava: “É mostrando que o fenômeno existe, não apenas no soro de indivíduos tornados refratários à febre tifóide, mas nos soros dos enfermos em plena evolução, que o sorodiagnóstico se transforma num processo de ex-

ploração clínica, permitindo o diagnóstico da doença”.

Com referência a nosso meio, embora o “Brazil Médico”, em 22 de setembro de 1896, na página 322, transcrevesse quase na íntegra a comunicação de Widal à Sociedade Médica dos Hospitais (Paris), datada de 26 de junho desse ano, não conseguimos apurar, com certeza, quem tenha sido o pioneiro da aplicação do sorodiagnóstico no Brasil. A primeira referência ao sorodiagnóstico de Widal, realizado por autor brasileiro, encontramos-na no ano seguinte, quando no “Brazil Médico”, de 8 de julho de 1897, Puppig e Ottoni inseriram um trabalho denominado “Da aglutinação como meio diagnóstico do bacilo tífico”, redigido em português, mas que fora realizado no Instituto de Higiene Experimental de Montevideo, Uruguay, declarando-se o segundo dos autores preparador da cadeira de Histologia Normal da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.

Nada estranhável essa demora na aplicação da reação de Widal, porquanto perduravam dúvidas, até então, quanto à existência, no Brasil, da febre tifóide como entidade mórbida, embora, já em 1894, Lutz²¹, após ingentes esforços, houvesse demonstrado, pelo isolamento e identificação da *Salmonella typhi*, que as chamadas “febres paulistas” nada mais eram que febre tifóide, o que provava, de vez, a existência endêmica da doença em nosso meio. É natural, pois, que só a partir de então a reação de Widal passasse a ser solicitada como método propedêutico indispensável à elucidação de doenças febris com antecedentes suspeitos.

2.2 A reação de Widal

A reação de Widal, originariamente, realizava-se com germes vivos: num tubo de ensaio, a 10 gotas de cultura jovem, suficientemente rica em germes, adicionava-se uma gota do soro suspeito. Podia a proporção cultura/soro reduzir-se a 1:5, com resultados semelhantes.

Para Widal, citado por DIEULAFOY⁶, o importante residia na juventude da cultura, pois, dizia ele: “L’usage d’une culture jeune, datant d’un on deux jours, est preferable. Je

dirai même que si le developpement d’une culture est suffisamment riche, *plus elle est jeune, meilleure elle est*” (grifo do autor). Como cuidado especial, recomendava Widal que a mistura fosse mantida em repouso, durante 15 a 30 minutos, para formação dos grumos; a seguir, uma gota da mistura era colocada em lâmina de vidro e examinada ao microscópio.

Como se vê, o método era extremamente rápido, donde a denominação de “extemporâneo”; que lhe deu Widal. Havendo dúvidas quanto ao aspecto dos aglutinados, isto é, se persistisse a presença de bacilos móveis ou isolados, ou se os aglutinados, apesar de evidentes, não se mostrassem muito confluentes, Widal renovava a leitura passadas algumas horas, primeiro com vista desarmada e depois com o auxílio de microscópio, firmando o diagnóstico se os aglutinados apresentassem o aspecto de “ilhas de um arquipélago”. No caso de resultado negativo com persistência dos sintomas suspeitos, reiterava o exame seguidamente, durante vários dias. Assinala esse autor ter encontrado reações positivas tão precocemente como no terceiro dia de doença e bastante freqüentes no quinto e sétimo dias da infecção.

Entretanto, como é de se ver, o uso de germes vivos, além de constituir-se em sério perigo para os laboratoristas, acarretava uma série de inconvenientes quando a reação devia aplicar-se em grande número de doentes e, ainda mais, limitava sua aplicação a laboratórios especializados. A remoção dessa dificuldade é atribuída por ZINSSER³⁸ a Neisser, cuja idéia de empregar emulsões de bacilos tíficos mortos pelo formol resolveria de vez o problema do antígeno, já que se tornaria possível executar o sorodiagnóstico sem maiores entraves. No entanto, em que pese à opinião de Zinsser, há que ponderar que, bem antes de Neisser, já em 1897, WIDAL³⁵ sugeria a adoção de antígeno constituído por germes mortos pelo formol, assim se expressando—“A reação aglutinante sobre os bacilos mortos não é reação vital por parte dos micróbios; ela mais parece ser uma reação passiva por parte da substância protoplasmática” — e recomendando usassem-se germes mortos pelo formol

na proporção de “uma gota de formol comercial para 150 gotas de cultura”. Acrescentava ainda — “Essa emulsão conserva-se bem por 5 meses, em armário de laboratório, com sensibilidade fixa, servindo admiravelmente para medir poder aglutinante do soro de um mesmo doente, durante várias semanas”. Apenas para os casos de aglutinação fraca ou duvidosa, julgava Widal indispensável recorrer à “contra-prova, realizada com cultura viva e rejuvenecida”.

Também, no laboratório de bacteriologia médica da Universidade de Copenhagem, DREYER⁷ recomendava o emprego de emulsões de bacilos tífcos mortos pelo formol a 1% e distribuía-as a quem as solicitasse.

O achado de Weil e Felix (FELIX⁸) em que o *Proteus* e outros germes, inclusive os bacilos tífcos e paratíficos, possuíam dois tipos de antígenos — somáticos e flagelares — designados “O” e “H” respectivamente, introduziu um novo problema na reação de Widal, tornando-se necessário substituir a técnica clássica pela aglutinação qualitativa de FELIX⁹, hoje vigente em todos os laboratórios. Essa modificação, contudo, alterou sua interpretação, até então bem simples. Com efeito, já não basta que o soro de um indivíduo suspeito clinicamente de febre tifóide aglutine uma suspensão de bacilos mortos ou vivos; torna-se necessário saber quais os títulos das aglutininas somáticas e flagelares existentes no soro.

Conseqüentemente, a interpretação da reação de Widal nos novos moldes depende do conhecimento da distribuição das aglutininas “O” e “H” na população local, para avaliar-se de sua significação, assim como para permitir a distinção entre reações positivas, decorrentes de infecção, e reações de vacinação.

Com referência a esses dois pontos capitais da avaliação da reação de Widal, parece-nos importante referir observações relativas ao nosso meio ambiente.

LEME & CARRIJO¹⁹, pesquisando aglutininas somáticas e flagelares em 321 indivíduos internados no Hospital do Juquerí, sem passado de vacinação TAB ou de infecção tífica, verificaram, para as primeiras, títulos de 1:20 em 18,69% dos casos, 1:40 em apenas 4,36% e, para as segundas, 1:20 em 7,78% e 1:40 em 5,29%; quanto a título mais elevado, encontraram apenas um caso com ambas as aglutininas a 1:80 (0,34%).

AMARAL & LACERDA JR.¹ dosaram as aglutininas “O” de 123 doentes mentais, internados no Hospital do Juquerí, encontrando 4 indivíduos com título de aglutininas “O” de 1:80 e, com títulos superiores, apenas um, com taxa de 1:640; não pesquisaram anticorpos anti — “H”.

TAUNAY³¹, verificando o teor de aglutininas “O” e “H” em pessoas aparentemente sadias, residentes no município de São Paulo, encontrou a seguinte distribuição:

Aglutininas	Indivíduos examinados	Títulos (recíprocas)					
		< 50	50	100	200	400	800
“O”	Número	833	99	35	13	4	1
	%	89,4	10,6	3,8	1,4	0,4	0,1
“H”	Número	900	32	13	3	1	0
	%	96,6	3,4	4,4	0,3	0,1	0

A análise dos dados referidos por esses autores revela que os títulos de aglutininas considerados entre nós como significativos de infecção tífica¹⁷ isto é, 1:100 para “O” e 1:200

para “H”, são relativamente baixos, não só no que respeita às aglutininas “H” como no que concerne à aglutinina “O”.

No que respeita ao problema do aumento

das aglutininas "O" após vacinação, CARRIJO, PIRES & BRANDÃO⁴ verificaram que, em soros de indivíduos inoculados com vacinas de boa qualidade, ou seja, nas quais o antígeno "O" não foi lesado por agentes químicos como o fenol ou sublimado, é bastante significativa a alta dos títulos aglutinantes contra esse antígeno. Assim é que, em 66 indivíduos recolhidos à Penitenciária Estadual de São Paulo, que haviam sido vacinados há dois anos ou mais, encontraram, uma semana após a terceira dose de vacinação por eles efetuada, títulos bastante elevados e em porcentagens significativas, tais como: 3 com 1:40; 13 com 1:80; 19 com 1:160; 17 com 1:320; 9 com 1:640 e 5 com 1:1280, quando antes predominavam títulos baixos, 36 com 1:20; 19 com 1:40 e 11 com 1:80.

Poderia parecer, pelo anteriormente exposto, que as aglutininas "H" se prestariam melhor para o diagnóstico de infecção suspeita de tífica, pois os respectivos títulos encontrados em pessoas normais foram muito mais baixos e em menor número que os das aglutininas "O". Na realidade verifica-se o contrário, porquanto os anticorpos "H" podem surgir independentemente de infecção por *Salmonella typhi*, tão somente como resposta anamnésica a infecções diversas, não sendo, como concluiu FELIX¹¹, dignas de confiança para indicar a presença de uma infecção específica por bacilos típicos ou paratípicos.

Outro problema na interpretação da reação de Widal é o das reações cruzadas. Como é sobejamente conhecido, a *Salmonella typhi*, de acordo com o esquema de White e Kaufmann, pertence ao grupo D, cujos componente contém sempre o antígeno IX e muitos o antígeno XII, que pode estar presente em outras salmonelas que não do grupo D. Nessas condições, deve-se admitir que infecções por esses germes possam provocar elevação de aglutininas "O" nos soros dos pacientes, embora seja provavelmente baixa a frequência de títulos anti-"O", devida a infecções por Salmonelas outras que não a tífica, como assinala SCHROEDER³⁰. Esse autor é muito severo na análise que faz do valor da reação de Widal como método diagnóstico de febre tifóide, concluindo que "as provas sorológicas para

diagnóstico da febre tifóide são inespecíficas, pobremente padronizadas, freqüentemente equivocantes e de difícil interpretação. Se forem usadas para diagnosticar a febre tifóide, o título de anticorpo "O" deverá ser o único de valor expressivo".

Contestando, inclusive, o valor do anticorpo "O" como prova diagnóstica da febre tifóide, REYNOLDS *et alii*²² estudaram um caso em que a infecção por *Salmonella typhimurium* ocasionou uma elevação significativa do título das aglutininas "O", gerando dessa forma confusão diagnóstica só resolvida com o isolamento do germe em questão.

Embora FELIX¹⁰ tenha insistentemente debatido o problema da padronização da reação de Widal, chegando até a preparar emulsões de antígenos e amostras de soros aglutinantes "O" e "H", são raros, se não raríssimos, os laboratórios oficiais que os utilizam. Sabemos que somente na Inglaterra é que esse trabalho de Felix teve repercussão, havendo facilidade para obtenção tanto de antígenos como de soros-padrão. Em nosso meio, reina ainda grande heterogeneidade de antígenos, bem como não é usual o controle das reações por soros-padrão, o que seria de grande importância, tanto no ponto de vista diagnóstico, como para cotejamento dos resultados obtidos por pesquisadores em diferentes pontos do país. No Estado de São Paulo há que ressaltar o significado do trabalho que vem sendo desenvolvido, há muitos anos, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, para uniformização da interpretação dos resultados e padronização dos antígenos da reação de Widal em uso na sua rede laboratorial em todo o Estado e em outros laboratórios.

2.3 Reações de precipitação

Embora KRAUS¹⁸ tenha demonstrado a possibilidade de identificar a febre tifóide mediante a evidenciação de precipitinas existentes no soro de pacientes, esse método diagnóstico não teve difusão, talvez em virtude da inespecificidade dos antígenos empregados. TULASNE & KUHLMANN³² renovaram as tentativas anteriores, passando a utilizar antígenos completos, segundo a técnica de Boivin,

de *Salmonella typhi* em fase lisa; referem julgar o processo muito bom especialmente no que respeita à possibilidade de diferenciar uma infecção tifóide de uma paratifóide. Em São Paulo, BARACCHINI² estudou o assunto, concluindo que a reação de precipitação, utilizando o antígeno de Boivin, apresenta elevada especificidade, além de permitir, em certo grau, a distinção entre anticorpos oriundos de infecção e os provenientes de vacinação TAB.

O trabalho de Baracchini, acima citado, foi único, pelo que sabemos, realizado em nosso país, não se registrando, apesar dos bons resultados referidos pelo autor, novas tentativas da utilização das precipitinas no diagnóstico da febre tifóide.

2.4 Reação de fixação em superfície

O emprego do método da denominada “aglutinação seletiva”, descrito por RUIZ CASTAÑEDA²⁸, destinado à diferenciação dos anticorpos de *Brucella melitensis* dos de *Brucella abortus*, levou seu autor à interessante observação seguinte: nas depressões hemisféricas das placas de porcelana, das que se usam para determinação de grupos sanguíneos, onde realizava a reação, as misturas de anticorpo e antígeno, este constituído por emulsões bacterianas em partes iguais de *Brucella abortus* coradas pelo azul de metileno e *Brucella melitensis* corada pela safranina O, aderiam de tal forma à superfície da placa que era necessário empregar energia para remover os anéis coloridos formados”. “Era pois”, deduziu RUIZ CASTAÑEDA²⁹, “uma fixação do complexo antígeno-anticorpo sobre a superfície da porcelana”. Prosseguindo, diz esse autor: “baseados nessa observação, passamos a colocar misturas de antígeno colorido a seu correspondente anticorpo sobre papel de filtro, submetendo este a uma corrente de solução isotônica, com a idéia de lavar a mistura por ação hidrodinâmica e mobilizar o líquido com a absorção. Observamos notável afinidade do complexo antígeno-anticorpo com o papel, contrastando com misturas de soro normal e antígeno”. Essa “fixação em superfície”, assim RUIZ CASTAÑEDA²³ denominou o fenômeno, “é instantânea como pudemos

comprovar, depositando uma gota de soro imune sobre o papel, no qual se formou um círculo de aproximadamente 2 centímetros, aplicando-se então no centro do referido círculo uma gota de antígeno colorido e imediatamente agregando-se solução salina isotônica, com uma pipeta capilar, tratando-se de forçar o antígeno a correr até a periferia. Para contraste, empregou-se soro normal como base sobre a qual depositou-se o antígeno. Enquanto que no soro negativo o antígeno foi facilmente deslocado até a periferia, no soro positivo permaneceu fixo no local onde foi colocado apesar de haver-se procedido com toda rapidez possível. Esta diferença na maneira de manifestar-se a reação antígeno-anticorpo, comparada à que sucede quando empregamos soro normal, serviu-nos de base para desenvolver o método rápido para investigar a presença de anticorpos contra *Brucella*, tifo e paratifo, *Proteus* OX19 e *Proteus* OXK”. A este interessante retrospecto do desenvolvimento da reação de fixação em superfície, segue-se, no trabalho citado, a explicação que Castañeda sugere ao mecanismo de sua descoberta: “expusemos a maneira de reagir de uma suspensão de bactérias expostas ao correspondente anticorpo em uma placa de porcelana, e de como o antígeno se fixa no papel por influência do anticorpo. No primeiro caso ocorrem fenômenos de aglutinação em que as partículas agrupadas mediante o anticorpo correm até a periferia onde aderem à porcelana. Resta por investigar a causa que determina tal aderência. No papel, o antígeno se colocou sob a forma de uma gota colorida, de maneira que, ao agregar um soro com grande proporção de anticorpos, não haverá movimento que permita aglutinações, e tão somente o antígeno manter-se-á fixo no local onde foi posto. Se no primeiro caso pode-se aceitar que, para aglutinar o antígeno, os anticorpos atuam como intermediários que ligam as bactérias umas às outras, que eventualmente se acumulam na periferia, aderindo à porcelana por contacto e dessecação, no segundo não se pode deduzir recíproca reação nas partículas antigênicas, já que o soro, ao aplicar-se sobre a mancha antigênica nada mais faz do que sujeitá-la ao papel, como se fosse uma aderência.

suficientemente ativa para impedir sua separação pela influência da corrente de solução salina. Como se pode supor, não se trata de reação em que os anticorpos atuam como amboceptor senão que o verdadeiro mecanismo da fixação tem que ocorrer entre o anticorpo e o papel. Pelo que parece, ao reagirem os anticorpos com o antígeno, este se fixará graças à aderência da globulina sobre a superfície do papel. Bem conhecida é a explicação, considerada factível, no fenómeno de união de um antígeno com o seu correspondente anticorpo e que, resumidamente, consiste em supor um movimento dos campos polares do anticorpo, os que se ajustam aos receptores do antígeno, deixando exposta a parte hidrófoba da globulina, com o que esta, ao perder sua afinidade pela água por neutralização de seus elementos polares, transforma-se em material insolúvel e, portanto, expulso do meio líquido. É evidente que, ao perder sua afinidade pelo líquido, os elementos hidrófobos expostos aderem fortemente à superfície sólida disponível, tal como ocorre sobre a placa de porcelana ou sobre o papel”.

Desde a primeira descrição do fenómeno, em 1950, procurou RUIZ CASTAÑEDA ²⁴ “aperfeiçoá-lo até convertê-lo em método prático que nos permita diagnóstico rápido das infecções que comumente se investigam pela presença de anticorpos no sangue.

Tais infecções são as tíficas e paratíficas, o tifo exantemático e a brucelose, doenças ainda freqüentes, relativamente em nosso meio .

De fato, o emprego da fixação em superfície tornou-se extremamente difundido na República Mexicana, conforme nos foi dado verificar quando freqüentamos o Instituto de Investigaciones Medicas, da cidade do México, dirigido por Castañeda, onde se prepara constantemente, grande número de papéis reativos, que se destinam ao uso nos Centros de Saúde, hospitais, laboratórios de análises clínicas e outras instituições.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Soros testados*

Foram testados, pelas reações de fixação em superfície e de Widal:

a) Cem soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para *Salmonella typhi*;

b) cinquenta soros positivos nas reações de V.D.R.L. e de Wassermann;

c) cinquenta soros positivos na reação de aglutinação para leptospiros;

d) cinquenta soros com reação de imunofluorescência e/ou reação de Sabin-Feldman positiva para toxoplasmose;

e) cinquenta soros com reações de aglutinação (reação de Wright), “spot-test” e fixação em superfície positivas para brucelose;

f) cento e sessenta soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa;

g) trezentos e quarenta soros de pacientes cujo diagnóstico clínico final foi de moléstia febril indeterminada.

3.2 *Antígenos*

3.2.1 *Antígeno para reação de fixação em superfície*

Foi preparado como segue:

a) Em 20 tubos, de 16 X 160mm, cultivar *Salmonella typhi* O 901, em fase lisa comprovada pelas provas de aspecto de colônias em placa de ágar e inaglutinabilidade com salina e com solução aquosa de tripaflavina a 0,5%;

b) emulsionar o crescimento de cada tubo em 5ml de solução fisiológica e semear em uma garrafa de Roux com ágar ligeiramente alcalino, pH 7,4 (Tryptone-Soy-Agar*), da qual foi retirada previamente a água de condensação;

c) incubar durante 24 horas, a 37°C, com a superfície do ágar voltada para cima durante 30 minutos e, em seguida, inverter a posição da garrafa;

d) retirar o excesso de líquido e ressuspender o crescimento em 20 ml de salina, com o auxílio de 4 cilindros de vidro de aproximadamente 3 cm, que são deslocados sobre a superfície do ágar por movimentação em bácia da garrafa;

e) proceder ao exame bacterioscópico de cada garrafa;

f) juntar os crescimentos das garrafas, filtrando-os em dupla camada de gaze esterilizada, em um balão de fundo chato;

g) deitar na suspensão bacteriana, para cada 100 ml, 5 ml de solução aquosa a 1%, esterilizada a 120°C por 5 minutos, do corante vital 2-3-5 cloreto de trifênil-tetrazólio que, reduzido, cora os germes de vermelho. Pode-se usar, também, outro corante, o tetrazólio azul: 3:3' dianisol-bis 4:4 - (3:5 difenil) cloreto de tetrazólio; este, quando reduzido, cora os germes de azul. Tanto faz um como outro; os resultados são idênticos. Geralmente, dentro de 60 minutos, consegue-se o colorido mais intenso, já que, depois disso, a tonalidade permanece inalterável;

h) juntar à suspensão colorida, álcool puro absoluto, na proporção de 100% do volume da suspensão;

i) guardar o balão por 24 horas, em temperatura ambiente; executar prova de esterilidade, semeando tubo de ágar com uma gota de suspensão;

j) proceder à lavagem da suspensão, centrifugando-a fortemente, 4.000 a 5.000 rotações por minuto, durante 30 minutos; desprezar a salina alcoolizada. Repetir a centrifugação tantas vezes quantas necessárias, até que o líquido sobrenadante saia incolor;

k) colher com espátula o sedimento, pesar em balança de precisão, sensível ao centígrama; deitar o purê bacteriano pesado em gral de vidro ou porcelana e, a seguir, juntar-lhe, pouco a pouco, misturando energeticamente, sacarose pró-análise finamente pulverizada, até que a massa da sacarose adicionada iguale o dobro do peso do purê bacteriano;

l) deixar o gral, coberto, por uma noite, em banho-maria a 52°C; no dia seguinte, colher o líquido sobrenadante, por inversão do gral, desprezando o sedimento, quase sólido, formado por excesso de sacarose que não se incorporou aos germes. Ao sobrenadante, juntar duas gotas de solução de mertiolato a 1% correspondentes a cada grama do purê bacteriano que se obteve;

m) fazer a impregnação das folhas do papel da seguinte forma: tomar uma agulha nº 20 (calibre americano) seccionada transversalmente, na distância de um centímetro da inserção no canhão, e encher esse canhão com algumas gotas do antígeno; em geral, 3 bastam. A seguir, com a ponta da agulha encostada à superfície do papel, procurar, com movimentos circulares, impregná-lo de maneira a formar uma mancha que meça 2 milímetros de diâmetro. Distanciar a mancha da borda do papel, aproximadamente 5 milímetros. Deixar secar o papel, impregnado com as gotas do antígeno, em temperatura ambiente, por uma hora; depois, guardar em envelopes, também em temperatura ambiente. A duração do antígeno é de 60 dias, aproximadamente. Para que esse tempo de validade fosse maior — 12 meses, e até mais — tornar-se-ia necessário que, logo após a secagem em temperatura ambiente, fossem os papéis ensacados em sacos

* Oxoid

de plástico impermeável, e fechados hermeticamente, para impedir contato com a umidade ambiente.

3.2.2 Antígenos para reação de Widal

Preparam-se os antígenos de *Salmonella typhi* "somático e flagelar" da seguinte maneira:

3.2.2.1 Antígeno somático

a) Empregou-se a técnica de BIEN³, ligeiramente modificada: em garrafas de Roux, com ágar nutritivo ligeiramente alcalino, de pH 7,4, de preferência Tryptone-Soy-Agar (*) das quais se colheu previamente a água de condensação, semeou-se a raça O 901, comprovadamente lisa, mediante as seguintes verificações; produção de colônias perfeitamente lisas em placas do mesmo meio nutritivo, inaglutinabilidade em solução salina fisiológica e em solução aquosa de Tripaflavina a 0,5%.

b) A sementeira é feita deste modo: cultiva-se por 18 horas a raça O 901 em tubos de 16 a 160 mm com ágar nutritivo; colhe-se o crescimento com solução salina isotônica a 0,85%, 5 ml para cada tubo, o que fornece a emulsão necessária para semear uma garrafa de Roux.

c) Incubam-se as garrafas a 37°C, com a superfície de ágar voltada para cima, durante 24 horas.

d) Colhe-se o líquido que serviu para semeadura e lavam-se as garrafas com 10 ml de salina; a emulsão resultante é então deitada em balão de fundo chato. De todas as garrafas faz-se um esfregaço e cora-se pelo Gram, para descartar possíveis garrafas contaminadas, antes de se proceder à mistura final no balão.

e) Deita-se no balão álcool etílico puro, absoluto, na proporção de 200% do volume da suspensão bacteriana e deixa-se em contato 24 horas.

f) Centrifuga-se a suspensão, durante meia hora a 3.000 rotações por minuto; descarta-se o álcool, emulsiona-se com salina isotônica e repete-se a operação três vezes; deita-se fora o líquido sobrenadante final e emulsiona-se o centrifugado em salina com 20% de álcool.

g) Por tentativas, usando-se a salina alcoolizada a 20% como diluente, procura-se conseguir que a suspensão bacteriana fique com concentração tal que, diluída a 1%, tenha opacidade igual ao tubo nº 1 da escala de Mac Farland. Essa é a concentração final, pronta para ser envasada, e que foi por nós empregada nas reações de Widal. Guarda-se o antígeno pronto na geladeira.

3.2.2.2 Antígeno flagelar

a) Empregou-se a técnica preconizada por GILBERT, COLEMAN & LAVIANO¹²; usa-se a raça H 901, perfeitamente lisa e móvel, comprovando-se essa condição mediante semeadura em ágar nutritivo e verificando-se o aspecto das colônias e a inaglutinabilidade pela Tripaflavina, como se descreveu para a raça O 901.

b) Em cada garrafa de Roux, da qual não se retirou a água de condensação, semeia-se o crescimento de 24 horas, em tubos de 16 x 160 mm de ágar nutritivo, ou Tryptone-Soy-Agar(*) e que se colheu com 10 ml de salina isotônica.

c) Incubam-se as garrafas de Roux, com a camada de ágar voltada para baixo, durante 24 horas a 37°C.

(*) Oxoid

d) Colhe-se o crescimento mediante lavagem das garrafas com 10 ml de salina isotônica, formolada a 0,2%, por garrafa, com o auxílio de cilindros de vidro, de aproximadamente 3 cm, que são deslocados sobre a superfície do ágar por movimentação em báscula da garrafa; junta-se tudo em balão de fundo chato.

e) Antes de se fazer a mistura final,  necessário examinar, pelo método de Gram, o crescimento de cada garrafa, para afastar possíveis contaminaes.

f) O antígeno, concentrado, conserva-se em geladeira mais ou menos a 5°C e dilui-se a 1% no momento de usar. A concentrao desse antígeno  igual, aproximadamente, ao tubo n 1 da escala de Mac Farland; conseqe-se a concentrao ideal do antígeno procedendo-se por tentativa, usando-se salina formolada a 0,2%.

3.3 Reao de Fixao em Superfície

3.3.1 Técnica

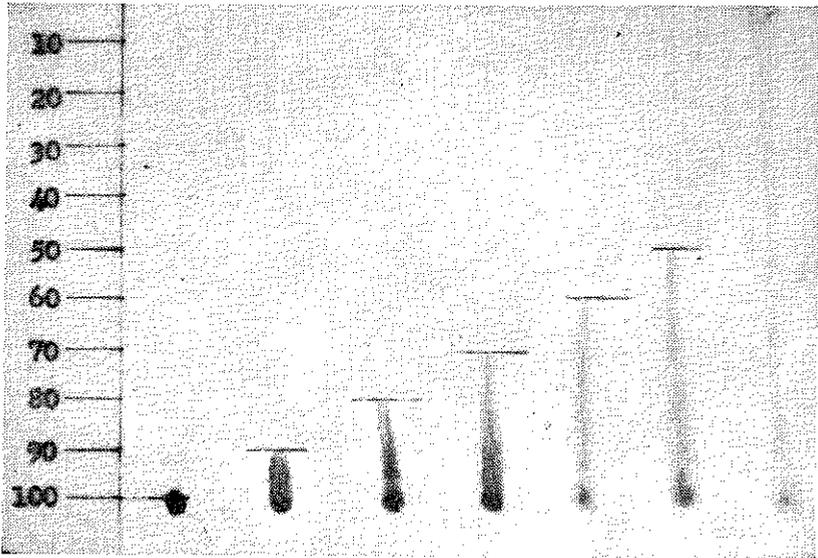
Executa-se a reao de fixao em superfície (que por brevidade, no decorrer deste trabalho, será denominada F.S.) da seguinte maneira: com alça de níquel-cromo, de 3 milímetros de diâmetro, deita-se, sobre a mancha do antígeno, uma gota do soro a examinar. Toma-se o cuidado de sempre usar, como testemunha, um soro seguramente negativo. A seguir, prende-se o papel pela parte superior num suporte e mergulha-se a borda inferior do papel em soluço salina isotônica e aguarda-se que a força da capilaridade faça subir a salina até o extremo superior do papel; nesse momento, cerca de 10 minutos, a reao está terminada e os resultados podem ser lidos.

3.3.2 Interpretao

Interpretam-se os resultados da seguinte maneira: em primeiro lugar, verifica-se se a mancha do antígeno onde se depositou o soro negativo foi arrastada totalmente pela salina deixando, apenas, em seu trajeto ascensional, um rastro levemente colorido, concentrando-se na borda superior. Em seguida, comparativamente  marca que deixa o soro negativo na sua subida, qual o grau de fixao havido; será de 100%, se a mancha colorida não se moveu do lugar; de 50%, se a coluna colorida resultante do deslocamento do antígeno atingir  metade da extensão do papel. Os valores intermediários, 60% — 70% — 80% e 90%, medem-se mediante a aplicao de uma régua feita do mesmo papel de filtro, onde se desenharam, espaçadamente, riscos de tinta indelével, que representam as diferentes alturas que a coluna do antígeno pode atingir em sua marcha ascendente. A figura 1 esclarece perfeitamente o que acabamos de dizer, pois nela encontramos todos os diferentes valores de fixao que se descreveram.

Não são todos os papéis de filtro que se prestam  prática da F. S. ; o papel inicialmente empregado, com ótimos resultados, de fabricao Eaton-Dickeman N 609 teve de ser substituído, em vista das irregularidades que posteriormente passou a apresentar, substituio nada fácil de realizar, aliás, pois que se tornou necessário experimentar, aproximadamente, 50 tipos diferentes, até recair a escolha sobre o papel "Ederol" n 20(*). Em nossas pesquisas, adotamos como valor mínimo diagnóstico a fixao de 50%; consideramos como negativa toda fixao de percentagem inferior a esse valor, tendo em vista que todos os soros de casos com hemocultura positiva testados acusaram valores iguais ou acima de tal porcentagem. Aliás, essa  a opinião de RUIZ CASTANEDA²⁵, particularmente no que se refere a pessoas de menos de 15 anos.

(*) Fabricado por J.C. Binzer, Hatzfeld/Eder, Alemanha Ocidental.



Reprodução de reação com fixação de 100% até reação negativa.

3.4 Reação de Widal

3.4.1 Técnica

As reações de Widal, tanto somáticas quanto flagelares, executavam-se de acordo com a técnica em uso há vários anos na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz¹⁷ e que é a seguinte: Usa-se série de 5 tubos, de 12 x 120 mm, para cada antígeno (somático e flagelar).

Do segundo ao quinto tubos, distribuem-se 0,5 ml de solução fisiológica em cada. Adicionam-se 0,5 ml de soro, diluído a 1/25, ao primeiro e segundo tubos. Misturam-se o soro diluído e a solução fisiológica do segundo tubo, transferem-se 0,5 ml da mistura para o terceiro tubo, repetindo-se essa operação até o quinto tubo, do qual, após misturar, retiram-se 0,5 ml desprezando-os. O soro, assim diluído, ficará com os seguintes títulos: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Juntam-se 0,5 ml da emulsão de antígeno a cada tubo, ficando, pois, dobradas as respectivas diluições. Essa junção é feita: a) para reações somáticas imediatamente após a diluição, agitando-se os tubos e levando-os à estufa a 37°C, onde permanecem até o dia seguinte (18 a 24 horas); b) para as reações flagelares, os tubos com as diluições de soro são colocados em geladeira até o dia seguinte, quando será feita a junção

de 0,5 ml de antígeno flagelar, indo os tubos para banho-maria a 52°C, onde permanecem por 2 horas. Ao fim desse tempo, faz-se a leitura de todos os tubos, tanto dos que ficaram na estufa como dos retirados do banho-maria. Usa-se testemunho de cada antígeno (0,5 ml da solução fisiológica e 0,5 ml de antígeno diluído). A leitura deve ser feita de preferência com lupa, anotando-se a última diluição na qual são visíveis grumos.

3.4.2 Interpretação

Os títulos considerados positivos, segundo essa técnica, e por nós adotados, são os seguintes: antígeno somático igual a 1:100 ou maior; antígeno flagelar igual a 1:200 ou maior.

3.5 Hemoculturas

As hemoculturas foram realizadas de acordo com técnica vigorante na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz¹⁶ e que é a seguinte:

Além da colheita em caldo glicosado citratado, as *S. typhi* e *paratyphi* podem ser satisfatoriamente isoladas do próprio coágulo de sangue. Uma vez retirado o soro, colocar, com pipeta estéril, no mesmo recipiente onde ficou o coágulo, cerca de 10 ml de bile-nutrose. Incubar a 37°C por 24 horas. Após 24 horas,

com pipeta ou alça de platina, retirar algumas gotas do meio e semeá-las em placas de ágar-ácido rosólico ou do meio de Holt-Harris-Teague, espalhando-as com bastão de vidro. Não havendo crescimento microbiano nas placas, repetir as mesmas operações após 48 horas e após 5 dias, partindo sempre da cultura original, que permanecerá na estufa. Três subculturas negativas são suficientes para dar resultado negativo.

Havendo colônias suspeitas, passá-las para tríplice-açúcar e depois identificá-las. Se o comportamento em tríplice-açúcar for idêntico ao de *S. typhi*, submeter imediatamente essa cultura às provas de aglutinação com soros típicos somático IX e flagelar "d".

A prova de aglutinação será feita em lâmina, emulsionando-se, com alça de platina, o crescimento da parte inclinada do tríplice açúcar diretamente com as gotas de soro previamente colocadas na lâmina, tendo-se cuidado de fazer testemunho da emulsão em solução salina, para controlar possíveis auto-aglutinações.

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos, constantes de quadros adiante apresentados, foram analisados em função dos diagnósticos laboratoriais feitos pelo método em estudo comparativamente com a reação de Widal.

Em estudos nos quais se pretende escolher, entre dois métodos experimentais, aquele capaz de acusar a maior positividade, o mesmo indivíduo ou material é usado como seu próprio controle. Assim sendo, em tais experimentos, o problema de colocar em prova a hipótese de nulidade (H_0), de que os dois métodos apresentam proporções iguais de positividade, contra a hipótese alternativa (H_1), de que diferem tais proporções, envolve comparações de amostras não independentes. Em tais casos é indicado o emprego do teste das mudanças de MC NEMAR²⁰, que evita a consideração da correlação entre as duas amostras.

O teste de Mc Nemar consiste no cálculo de: $X^2 = \frac{(b-c)^2}{(b+c)}$, que se distribue aproximadamente segundo a distribuição X^2 com um grau de liberdade.

Considerando-se a natureza dos dados no presente trabalho e os objetivos a que ele se

propôs, fez-se necessária a adoção do referido teste que, no intuito de ter reforçada sua eficiência, foi empregado com a correção de continuidade de Yates (X^2_c)

4. RESULTADOS

4.1 Resultados obtidos pelo emprego da reação de fixação em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para *Salmonella typhi*

As reações de fixação em superfície realizadas nesses casos sempre foram positivas, mostrando as seguintes porcentagens de fixação:

50%	2 casos
60%	7 casos
70%	27 casos
80%	31 casos
90%	23 casos
100%	10 casos

Verifica-se, à simples inspeção, que a grande maioria dos casos (91) situou-se na faixa de maior positividade (70 a 100%).

4.2 Apreciação dos valores médios da reação de fixação em superfície em 98 casos com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para *Salmonella typhi* em relação às idades dos pacientes

Verifica-se que, contrariamente ao que foi assinalado por RUIZ CASTAÑEDA²⁷ e GUTIERREZ *et alii*¹⁵, no México, onde é possível encontrar em crianças de menos de 15 anos valores diagnósticos de fixação tão baixos como 50% e mesmo 25%, entre nós esses níveis situam-se sempre acima de 70%, não havendo diferenças com os dos demais grupos etários.

QUADRO I

Distribuição, por idades, dos valores médios da reação em 98 casos de febre tifóide, com hemocultura positiva

Idade (anos)	N.º Casos	Valores médios da porcentagem de fixação (%)
0 - 5	9	78,8
6 - 10	12	80,0
11 - 15	14	77,6
16 - 20	19	80,0
> - 20	44	79,8

4.3 *Comparação entre os resultados das reações de fixação em superfície e de Widal (somática e flagelar), executadas simultaneamente em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para Salmonella typhi.*

Submetidos os dados constantes dos qua-

dro II e III à análise estatística (quadros IV e V), verificou-se, de acordo com os valores X^2 encontrados, que diferem significativamente as proporções de positividade encontradas nas reações de fixação em superfície e de Widal, o que permite concluir pela maior sensibilidade da primeira.

QUADRO II

Resultados das reações de fixação em superfície e de Widal "O" (somática) realizadas simultaneamente em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para Salmonella typhi

Reação de fixação em superfície	Reação de Widal "O"					Total
	Positiva (título)				Negativa	
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a						
50%	1	—	—	—	1	2
60%	1	2	2	—	2	7
70%	3	4	7	8	5	27
80%	3	3	10	9	6	31
90%	—	1	2	16	4	23
100%	—	2	—	8	—	10
Negativa	—	—	—	—	—	—
Total	8	12	21	41	18	100

QUADRO III

Resultados das reações de fixação em superfície e de Widal "H" (flagelar) realizadas simultaneamente em 100 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura positiva para Salmonella typhi

Reação de fixação em superfície	Reação de Widal "H"			Negativa	Total
	Positiva (título)				
	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a					
50%	1	—	1	—	2
60%	—	1	3	3	7
70%	1	5	13	8	27
80%	5	5	15	6	31
90%	—	1	17	5	23
100%	1	1	7	1	10
Negativa	—	—	—	—	—
Total	8	13	56	23	100

QUADRO IV

Comparação dos resultados das reações de fixação em superfície (F.S.) com os das reações de Widal "O" (W. "O")

F.S. \ W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	82	–	82
Neg.	18	–	18
Total	100	–	100

$X_c^2 = 16,05$
 $P < 0,001$

4.4 *Comparação entre os resultados das reações de fixação em superfície e de Widal (somática e flagelar), executadas simultaneamente em:*

- a) 50 soros positivos nas reações de Wassermann e de V.D.R.L. (quadros VI e VII);
- b) 50 soros com reação de aglutinação positiva para leptospiras (quadros VIII e IX);
- c) 50 soros de reação positiva de imunofluorescência e/ou de Sabin-Feldman para toxoplasmose (quadros X e XI) e

QUADRO VI

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de Wassermann e V.D.R.L

F.S. \ W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	15	15
Neg.	0	35	35
Total	0	50	50

$X_c^2 = 13,06$
 $P < 0,001$

QUADRO V

Comparação dos resultados das reações de fixação em superfície com os das reações de Widal "H" (W. "H")

F.S. \ W. "H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	77	–	77
Neg.	23	–	23
Total	100	–	100

$X_c^2 = 21,04$
 $P < 0,001$

- d) 50 soros positivos nas reações de aglutinação, "spot-test" e fixação em superfície para brucelose (quadros XII e XIII).

Verificou-se, usando simultaneamente as reações de fixação em superfície e de Widal (somática e flagelar) em casos de outras moléstias que não febre tifóide, a existência de diferenças significativas em todas as comparações entre a F.S. e Widal "O", não tendo sido encontrada essa diferença apenas entre F.S. e Widal "H" realizadas em soros de casos de sífilis e toxoplasmose.

Pode-se, assim, concluir serem as duas reações diferentes no que tange à positividade, e que há maior especificidade por parte da reação de fixação em superfície

QUADRO VII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de Wassermann e V.D.R.L

F.S. \ W. "H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	2	2
Neg.	0	48	48
Total	0	50	50

$X_c^2 = 0,5$
 Não significativo

QUADRO VIII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de aglutinação para Leptospiras

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	35	35
Neg.	0	15	15
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 33,02$$

$$P < 0,001$$

QUADRO X

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Toxoplasmose

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	21	21
Neg.	0	29	29
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 19,04$$

$$P < 0,001$$

QUADRO XII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Brucelose

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	32	32
Neg.	0	18	18
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 33,3$$

$$P < 0,001$$

QUADRO IX

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros positivos nas reações de aglutinação para Leptospiras

F.S. W. "O"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	9	9
Neg.	0	41	41
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 7,11$$

$$P < 0,01$$

QUADRO XI

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Toxoplasmose

F.S. W. "H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	3	3
Neg.	0	47	47
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 1,3$$

$$\text{Não significativo}$$

QUADRO XIII

Comparação dos resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 50 soros com reações positivas para Brucelose

F.S. W. "H"	Pos.	Neg.	Total
Pos.	0	15	15
Neg.	0	35	35
Total	0	50	50

$$X_c^2 = 13,06$$

$$P < 0,001$$

4.5 *Comportamento da reação de fixação em superfície, em 160 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa, comparativamente com a reação de Widal*

Essa série de resultados, que constam dos quadros XIV e XV, apesar de proveniente de indivíduos com diagnóstico clínico de febre tifóide, não comporta entretanto apreciação definitiva, pelo fato de serem negativas as respectivas hemoculturas.

Pareceu-nos, porém, interessante cotejar esses resultados com os da reação de Widal que, em casos dessa natureza, é a base do diagnóstico.

As duas reações comportaram-se, aproximadamente, da mesma maneira, acusando porcentagens de positividade de 88,1% para fixação em superfície, 89,3% para reação de Widal somática e 71,2% para a reação de Widal flagelar.

QUADRO XIV

Resultados das reações de F.S. e W. "O" realizadas simultaneamente em 160 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa para Salmonella typhi

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal "O"					Total
	Positiva (título)				Negativa	
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a						
50%	—	—	1	1	—	2
60%	2	6	5	—	2	15
70%	4	12	7	14	2	39
80%	3	5	10	24	5	47
90%	—	1	4	13	1	19
100%	—	—	3	15	1	19
Negativa	5	6	2	—	6	19
Total	14	30	32	67	17	160

QUADRO XV

Resultados das reações de F.S. e W. "H" realizadas simultaneamente em 160 soros de pacientes com diagnóstico clínico de febre tifóide e hemocultura negativa para Salmonella typhi

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal "H"				Total
	Positiva (título)			Negativa	
	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a					
50%	—	—	1	1	2
60%	3	2	4	6	15
70%	6	9	14	10	39
80%	4	5	23	15	47
90%	3	—	15	1	19
100%	2	4	9	4	19
Negativa	1	—	9	9	19
Total	19	20	75	46	160

4.6 *Comportamento da reação de fixação em superfície, em 340 soros de pacientes com classificação final de "moléstias indeterminadas"*

Também nestes casos (quadros XVI e XVII) a amostragem não permitiu conclusões

definitivas. Comparativamente à reação de Widal, a F.S. apresentou, aproximadamente, a mesma porcentagem de positividade – 23,2% sendo que a reação de Widal somática revelou 21,5% e a flagelar, 18,2%.

QUADRO XVI

Resultados das reações de F.S. e de W."O" realizadas simultaneamente em 340 soros de pacientes de moléstias indeterminadas e hemoculturas negativas

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal "O"					Total
	Positiva (título)				Negativa	
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a						
50%	—	—	—	—	—	—
60%	10	6	—	—	8	24
70%	3	1	—	6	13	23
80%	—	3	2	3	4	12
90%	1	2	—	7	1	11
100%	—	1	—	3	5	9
Negativa	19	4	2	—	236	261
Total	33	17	4	19	267	340

QUADRO XVII

Resultados das reações de F.S. e W."H" realizadas simultaneamente em 340 soros de pacientes de moléstias indeterminadas e hemoculturas negativas

Reação de Fixação em superfície	Reação de Widal "H"				Total
	Positiva (título)			Negativa	
	1 : 200	1 : 400	1 : 800		
Positiva a					
50%	—	—	—	—	—
60%	3	1	4	16	24
70%	4	2	—	17	23
80%	2	2	4	4	12
90%	—	3	6	2	11
100%	—	1	3	5	9
Negativa	12	8	7	234	261
Total	21	17	24	278	340

5. CONCLUSÕES

À vista do que foi explanado, é lícito deduzir que:

1. A sensibilidade da reação de fixação em superfície é bem mais acentuada do que a da reação de Widal.

2. A reação de fixação em superfície é mais específica do que a de Widal no diagnóstico sorológico da febre tifóide.

3. A fixação em superfície é de realização mais rápida e de leitura mais fácil do que a reação de Widal.

4. Para maior segurança do diagnóstico sorológico da febre tifóide, o emprego da reação de fixação em superfície é aconselhável na rotina dos laboratórios que se encarregam de trabalhos dessa natureza.

6. RESUMO

BRANDÃO, C.S.H. — Reação de fixação em superfície como método diagnóstico laboratorial da febre tifóide. Estudo comparativo com a reação de Widal. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 17-35, 1972.

Soros de 100 pacientes com febre tifóide confirmada foram testados simultaneamente pela reação de fixação em superfície e pela reação de Widal com antígeno somático e com antígeno flagelar, em comparação com os resultados de hemocultura.

Houve concordância absoluta entre os resultados de hemocultura e de reação de fixação em superfície, enquanto que a reação de Widal foi negativa em 18 casos, com antígeno somático e, em 24 casos, com antígeno flagelar. Em 200 casos de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de outras moléstias infecciosas, a reação de fixação em superfície sempre foi negativa, enquanto que a reação de Widal, com antígeno somático, foi positiva em 52% e, com antígeno flagelar, em 14,5% dos casos.

É sugerida a adoção da reação de fixação em superfície no diagnóstico laboratorial da

febre tifóide em razão de sua maior sensibilidade e maior especificidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, J.P. & LACERDA JR., P.M.G. — Estudos sobre a vacinação antitífica. 1. Vacinação pelo método de Felix. *Mems Inst. Butantan*, 20: 227-232, 1947.
2. BARACCHINI, O. — *Estudo comparativo das reações de aglutinação de Grüber-Widal e de precipitação no diagnóstico sorológico da febre tifóide*. Ribeirão Preto, 1951. p. 71. [Tese Profess. — Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto].
3. BIEN, Z. apud GILBERT, R.; COLEMAN, M.B. & LAVIANO, A.B.¹² p. 228.
4. CARRIJO, L.N.; PIRES, C. D'A. & BRANDÃO, C. — Vacinação T.A.B. Formação de aglutinina "O" no homem pelo emprego de vacina formolada. *Mems Inst. Butantan*, 18: 45-54, 1944/45.
5. CHARRIN, & ROGER, G.H. apud BOUCHARD, C. & ROGER, G.H. — *Nouveau traité de pathologie générale*. Paris, Masson, 1912. v. 1, p. 514.
6. DIEULAFOY, G. — *Manual de pathologie interne*. 15. ed. Paris, Masson, 1908. p. 181.
7. DREYER, G. — Widal's reaction with sterilised cultures. *J. Path. Bact.*, 13: 331-337, 1909.
8. FELIX, A. — The qualitative receptor analysis and its application to typhoid fever. *J. Immun.*, 9: 115-192, 1924.
9. FELIX, A. — The qualitative serum diagnosis of enteric fevers. *Lancet*, 1: 505-507, 1930.
10. FELIX, A. Standardisation des épreuves d'agglutination servant au diagnostic de fièvre typhoid et fievres paratyphoids. *Bull. Org. Mond. Santé*, 2: 685-691, 1950.
11. FELIX, A. apud TOPLEY, W.W. & WILSON, G.S. — *Bacteriologia e inmunidad*. Traducion de la tercera edicion inglesa, por José Estelles Salarich. Barcelona, Salvat, 1953. v.2, p. 1519.
12. GILBERT, R.; COLEMAN, M.B. & LAVIANO, A.B. — A story of the granular and floccular types of agglutination with *B. typhosus*. *J. Lab. Clin. Med.*, 19: 225-231, 1933.
13. GRUBER apud WIDAL, F. & SICARD, A.³³ p. 358.

14. GRUBER & DURHAN apud WIDAL, F. & SICARD, A.³³ p. 359.
15. GUTIERREZ, T.; BENAVIDES, L.; KUMARTE, J. & RANGEL, L. – Encuesta inmunológica en la población infantil. 1. Investigación de anticuerpos contra *S. typhosa* por meio de la reacción de fijación en superficie. *Bol. Méd. Hosp. Infant.* (México), 19: 107, 1962.
16. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Hemoculturas. I.A.L.: *Bol. Inst. Adolfo Lutz*, 1(2): 7, 1961.
17. INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Reações de Widal e de Weil-Felix. I.A.L.: *Bol. Inst. Adolfo Lutz*, 1(1): 36-37, 1961.
18. KRAUS, R. apud TULASNE, R. & KUHLMANN, A. MANN, A.³² p. 299.
19. LEME, J.S.M. & CARRIJO, L.N. – Nível médio de aglutininas tíficas em São Paulo. *Mems Inst. Butantan*, 17: 121-125, 1943.
20. McNEMAR, A. – Note on the sampling error of the difference between correlated proportions on percentage. *Psychometrika*, 12: 153-157, 1947.
21. RELATÓRIO. Instituto Bacteriológico de São Paulo: 1894-1895. São Paulo (1895) p. 37.
22. REYNOLDS, D.W.; CARPENTER, Le R.R. & SIMON, W.H. – Diagnostic specificity of Widal's reaction for typhoid fever. *J. Am. Med. Ass.*, 214(12): 2191-92, 1970.
23. RUIZ CASTAÑEDA, M. – *Libro conmemorativo del primer centenario – Academia Nacional de Medicina – 1864-1964*. México, 1964. v. 2, p. 200-207.
24. *Ibid.* p. 199.
25. *Ibid.* p. 204.
26. *Ibid.* p. 208
27. RUIZ CASTAÑEDA, M. – Reacciones sorológicas para el diagnóstico de las reacciones febriles. *Bol. Med. Hosp. Infant.* (México), 18: 74-75, 1961.
28. RUIZ CASTAÑEDA, M. – Selective agglutination. A possible substitute for the absorptive test in the classification of *Brucella*, *Salmonella* or their antisera. *J. Immun.*, 43: 203-211, 1942.
29. RUIZ CASTAÑEDA, M. – Surface fixation. A new method of detecting certain immunological reactions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73: 46-49, 1950.
30. SCHROEDER, S.A. – Interpretation of serologic tests for typhoid fever. *J. Am. Med. Ass.*, 206(4): 839-840, 1968.
31. TAUNAY, A.E. apud SCHMID, A.W. – *Contribuição para o conhecimento da epidemiologia da febre tifóide através da pesquisa de portadores*. São Paulo, 1966. [Tese profess. – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
32. TULASNE, R. & KUHLMANN, A. – Étude des précipitines dans la fièvre typhoid 'a l'aide d'antigènes purifiés. *Ref. Immun.*, 5: 299-316, 1939.
33. WIDAL, F. & SICARD, A. – Étude sur le séro-diagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques. *Annls Inst. Pasteur (Paris)*, 11: 353-452, 1897.
34. *Ibid.* p. 359
35. *Ibid.* p. 369-370.
36. WIDAL, apud BOUCHARD, C. & ROGER, G.H. – *Nouveau traité de pathologie generale*. Paris, Masson, 1912. v. 1, p.523.
37. WIDAL, F. apud GASTINEL, P. – *Précis de bacteriologie médicale*. Paris, Masson, 1949. p. 392.
38. ZINSSER, H. & BAYNE-JONES, E. – *Tratado de bacteriologia*. Tradução brasileira da 8ª edição americana, por Aristides Monteiro. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1947. p. 213.

Recebido para publicação em 10 de maio de 1972.

