

VOLUME 24

1964

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

SECRETARIA DA SAÚDE PÚBLICA
e
DA ASSISTÊNCIA SOCIAL
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
S. PAULO - BRASIL

VI Congreso Ibero-Latino-Americano de Dermatología — Este Congreso está organizado por el Colegio Ibero-Latino-Americano (G.I.L.A.D) y tendrá lugar en Barcelona (España) los días 24-25-26 y 27 de Julio de 1967. Es Presidente de Honor el Prof. Xavier Vilanova Montiu (in Memoriam) Presidente Oficial Nato Prof. Juvenal Esteves y Presidente Ejecutivo el Dr. José Mercadal Peyrí.

TEMAS OFICIALES DEL CONGRESO:

Las Genodermatosis y el Eczema Seborreico.

Habrá además comunicaciones sobre Temas Libres en los que podrán participar todos los Congressistas, siendo obligatorio su aviso de participación y envío del resumen del tema antes del 15 de Abril de 1967. También tendrán lugar Conferencias extraordinarias a cargo de destacados Dermatólogos que por sus trabajos de investigación universalmente reconocidos serán invitados por el Comité Ejecutivo.

Otras actividades: Presentación y discusión de casos clínicos. Exhibits científicos y comerciales.

Los idiomas oficiales del Congreso serán el Español o Portugués. Se facilitarán traducciones simultáneas e intérpretes para aquellos idiomas cuyo número de Congressistas sea suficiente. Los trabajos realizados en otros idiomas habrán de ser traducidos y leídos en español o portugués.

Coincidiendo estas fechas con el apogeo del turismo en España, se encarece la petición de reserva e inscripción con la máxima antelación. Los derechos de inscripción serán de 30\$ o su equivalente en pesetas para los miembros del C.I.L.L.A.D., 40\$ para los no miembros y para los acompañantes de Congressistas serán de 20\$.

Están previstos diversos actos sociales y excursiones a distintos monumentos de interés histórico-artístico, playas, visitas a los Museos, fiestas folklóricas y una corrida de toros en homenaje a los Congressistas. Asimismo tendrán lugar viajes facultativos pre y post Congreso a Mallorca, Costa Brava y Tarragona.

La correspondencia en relación con el Congreso ha de ser dirigida al Dr. Joaquín Piñol Aguadé, Facultad de Medicina, Casanova n.º 143 Barcelona (11), España.

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

ARIOSTO BÜLLER SOUTO
Diretor do Instituto Adolfo Lutz

SECRETÁRIA

DEBORA D. E. REBOCHO

COMISSÃO DE REDAÇÃO

ADALBERTO PETRONI
ADELAIDE B. WALKYRIA H. LARA
ANTÔNIO JAMES BRANDI
JOSÉ LOPES NETTO
SILVIO JORDÃO

REDAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO
BIBLIOTECA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CAIXA POSTAL, 7027
SÃO PAULO, S. P. — BRASIL

ENDEREÇO TELEGRÁFICO: IALUTZ

REVISTA ANUAL

TIRAGEM: 1 000 EXEMPLARES

REV. INST. ADOLFO LUTZ

ERRATA

Rev. Inst. Adolfo Lutz 22/23

NOVA TÉCNICA PARA A DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE α -TOCOFEROL - Waldomiro Pregolatto & Ione I. Gomes.

Na pág. 63, 11.ª linha da 2.ª coluna, no lugar onde se lê: ...3) Esperar 2m e 30s e lêr no espectrofotômetro...
...vitamina E), **leia-se:**

3) Esperar 2m e 30s e adicionar 1 ml da solução de EDTA. 4) Esperar mais 2m e 30s e lêr no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 520 m μ . Acertar o 100% de transmitância do aparelho com o "branco" (mistura dos reagentes, menos a vitamina E).

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

Rev. Inst. Adolfo Lutz 24, 1964

C O N T E Ú D O

	Pág.
Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1.000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. <i>Comparative evaluation of toxoplasmosis indirect fluorescent and Sabin-Feldman dye tests in a thousand human sera. A few unexpected results.</i>	
MÁRIO E. CAMARGO	1
Grupo <i>Providência</i> . Prevalência dos biogrupos em São Paulo, Brasil .. <i>Providencia Group. Prevalence of biogroups in São Paulo, Brazil</i>	
ETTORE RUGAI & RACHEL TEIXEIRA RUGAI	27
Meio de cultura para diferenciar o grupo <i>Proteus</i> e <i>Providencia</i> de outras enterobactérias pela l-triptófano desaminase <i>Culture medium for differentiation of Proteus and Providencia groups from other enterobacteria by the l-tryptophan desaminase</i>	
ETTORE RUGAI & RACHEL TEIXEIRA RUGAI	29
Observações sobre o emprêgo do carbonato de bário como planorbicida. <i>Notes on the use of barium carbonate as a planorbicid</i>	
LUIZ DOS SANTOS	33
Reação de Schlör para diagnóstico da gravidez. Fixação do composto róseo em papel de filtro. <i>Schlör reaction for pregnancy diagnostic. Fixation of the pink compound on filter paper</i>	
ETTORE RUGAI & RACHEL TEIXEIRA RUGAI	39
Surto epidêmico de meningite por <i>Salmonella grumpensis</i> <i>Outbreak of meningitis caused by Salmonella grumpensis</i>	
AUGUSTO DE ESCRAGNOLE TAUNAY, CARLOS DE OLIVEIRA BASTOS & HÉLIO MARTINS	45
Colite ulcerativa crônica por <i>Strongyloide</i> <i>Chronic ulcerative colitis due to Strongyloide stercoralis</i>	
EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS	51

A O S C O L A B O R A D O R E S

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos especialmente relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Todos os artigos destinados à Revista deverão ser redigidos na ortografia oficial, apresentados em duas vias (original e primeira cópia), datilografados com espaço duplo em folhas de papel formato ofício, numeradas no ângulo superior direito, com margens de 3 cm de ambos os lados. As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas), legendas e rodapés deverão ser apresentados a parte, devidamente identificados, assinalando-se, no texto, onde deverão ser inseridos.

No preparo do texto, os autores deverão, sempre que possível, obedecer à seguinte ordem:

- Título em português
- Título em inglês
- Nome do autor ou autores (dados pessoais em rodapé)
- Resumo em inglês
- Introdução
- Material e métodos
- Resultados
- Discussão
- Conclusões
- Resumo em português
- Agradecimentos
- Referências bibliográficas

TÍTULO — Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

RESUMOS — Não deverão exceder 200 palavras. Deverão ser concisos e claros, pondo em relevo de forma precisa os fatos essenciais necessários à conclusão.

ABREVIATURAS — Serão evitadas, ou usadas apenas as que obedecem às normas nacionais ou, na falta destas, às internacionais. Os pesos e medidas (inclusive suas abreviaturas) deverão ser expressos no Sistema Métrico Decimal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — Deverão ser apresentadas somente as de trabalhos consultados ligados ao assunto e citados no texto. Havendo um único autor, será indicado o último sobrenome, seguido das iniciais do (s) prenome (s). Sendo dois ou três os autores, será citado sempre o último sobrenome dos autores, seguido das iniciais do(s) prenome(s). Para quatro ou mais autores, será citado unicamente o sobrenome do primeiro autor, iniciais do prenome e a expressão et alii.

No texto — serão numeradas, em ordem crescente, com número alto ao lado do nome do autor.

Na lista de referências — serão ordenadas numericamente, de acordo com seu aparecimento no texto, como segue:

Para artigos

Sobrenome do autor (ou autores) seguido das iniciais, título do trabalho, título do periódico por extenso, volume, número, página inicial e final e ano de publicação.

Para livros

Sobrenome do autor (ou autores ou editor responsável) seguido das iniciais, título, edição, tradução (se for o caso), local de publicação, editor comercial, ano de publicação, número do volume, página(s) citada(s).

ILUSTRAÇÕES — Deverão ser citadas no texto como "Fig.", numeradas e vir acompanhadas de legendas explicativas. Os desenhos, gráficos, fórmulas, equações, mapas e diagramas deverão ser feitos a nanquim preta, em papel vegetal e confeccionados de modo a poderem ser reduzidos na clichéria a 1/2 ou 1/3 do tamanho original, sem perda de nitidez ou legibilidade. As fotografias serão apresentadas em envelope a parte; deverão ser nítidas e de bom contraste, e trazer no verso o nome do autor, título do artigo e número com que irão figurar no texto.

QUADROS E TABELAS — Não deverão exceder as dimensões do texto da Revista. Os respectivos títulos deverão indicar claramente o conteúdo e, se possível, seguir as normas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Nenhuma casa, em quadros ou tabelas, deverá ficar vazia; a ausência de dados será representada por:

- quando o fenômeno não existe
- 0; 0,0; 0,00 quando o fenômeno existe, não atingindo o seu valor, porém, a unidade adotada no quadro
- ... quando o dado é desconhecido, não implicando, porém, afirmar ou não a existência do fenômeno.

Quando o fenômeno for mensurável, deverá ser expresso de maneira a somente figurarem os algarismos significativos.

DA PUBLICAÇÃO

1. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação.
2. Na publicação do artigo, constará obrigatoriamente, em rodapé, a data de recebimento.
3. Os originais de trabalhos aceites para publicação não serão devolvidos aos autores.
4. Os autores terão direito a 70 separatas; quando desejarem maior número, deverão entender-se com a secretária da Revista.
5. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.
6. Solicita-se aos autores indicarem o endereço para correspondência.
7. É proibida a reprodução no todo ou em parte de trabalhos publicados na Revista, sem prévia autorização do autor responsável e da Comissão de Redação da Revista. É permitida, entretanto, a reprodução de resumos, com a devida citação bibliográfica.

ESTUDO COMPARATIVO DAS REAÇÕES DE SABIN-FELDMAN E DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA, PARA A TOXOPLASMOSE, EM 1 000 SOROS HUMANOS. COMPORTAMENTO ANÔMALO DE ALGUNS SOROS (1)

COMPARATIVE EVALUATION OF TOXOPLASMOSIS INDIRECT
FLUORESCENT AND SABIN-FELDMAN DYE TESTS IN A THOUSAND
HUMAN SERA. A FEW UNEXPECTED RESULTS

MÁRIO E. CAMARGO (2)

SUMMARY

Dye-test and indirect antiglobulin fluorescent test for toxoplasma antibodies were compared in 1,000 human sera. Both techniques were described in detail, with special emphasis on preparation of antigens and conjugates for the fluorescent test. The tests were studied as to reproductibility of results, and a close agreement was found for successive titrations of same sera. Dye-test and fluorescent test compared well, with an almost total coincidence of results as to reactivity of sera. Titers were the same or differed by only one dilution in 97.7% of reactive sera and by only two dilutions in the remaining 2.3%. A small number of cases was seen with unexpected temporary divergences, as they reacted only in the dye-test when first examined. However, when tested again after being frozen for a few hours or days, they furnished entirely negative results. A cytoplasm-modifying factor different from that responsible for immune-reactions was suggested to occur in such sera.

I — INTRODUÇÃO

A reação sorológica descrita em 1948 por SABIN & FELDMAN³², o "dye test" ou reação do corante, tem sido considerada método padrão para a pesquisa e titulação de anticorpos para o *Toxoplasma gondii*. Embora predomine na literatura atual o conceito de que se trata de reação específica (CATHIE⁴, 1957; KABELITZ^{30, 31} 1960; MEIRA *et alii*⁴³, 1959), certo número de pesquisadores ainda manifesta dúvidas quanto ao significado dos resultados, especialmente diante de reações positivas de baixos títulos (VAN THIEL⁵⁸, 1958; KELEN *et alii*³², 1962). Na verdade, o emprego da reação do corante tem sido muito limitado, mas esse fato se deve às dificulda-

des relacionadas com a execução da prova. Apenas alguns centros especializados reúnem as condições necessárias para tanto e, assim mesmo, com capacidade de trabalho até certo ponto restrita. Assim, a necessária amplitude de aplicação dos métodos sorológicos para a toxoplasmose justifica a pesquisa de novas técnicas que possam substituir com vantagens a reação do corante.

Dentre os demais métodos sorológicos descritos para a pesquisa de anticorpos para o toxoplasma, são mais comumente referidos os da reação de fixação do complemento e de hemaglutinação.

A reação de fixação do complemento tem se mostrado menos sensível do que a reação

(1) Tese apresentada à Cátedra de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para doutoramento em Medicina.

(2) Do laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

de Sabin-Feldman. Para a maioria dos autores, são diversos os anticorpos revelados por ambas. Para outros (DESMONTS²¹, 1960; HULDT²⁵, 1958; THALHAMER⁵⁴, 1960; BOZDECH & JIRA¹, 1961), entretanto, as divergências observadas refletem apenas diferentes sensibilidades dos métodos e tendem a desaparecer à medida que aumenta a sensibilidade das técnicas de fixação de complemento. A grande variedade de antígenos e a pluralidade de técnicas utilizadas nas reações de fixação do complemento não permitem comparação segura dos resultados obtidos por diferentes laboratórios.

A reação de hemaglutinação, descrita por JACOBS & LUNDE²⁷, 1957, tem mostrado sensibilidade comparável à da reação de Sabin-Feldman (MALONEY & KAUFMAN⁴⁰, 1960; KNIERIM *et alii*³³, 1960; LUNDE *et alii*³⁸, 1962; THIERMANN *et alii*³⁵, 1964). A simplicidade de execução poderá fazer dela substituto ideal para a reação do corante. Entretanto, não são pequenas as dificuldades com que se defronta quem se propõe a realizá-la de rotina. Os resultados por vezes bastante discrepantes, referidos por vários pesquisadores (LEWIS & KÉSSSEL³⁷, 1961; REUSS⁴⁸, 1961; MITCHELL & GREEN⁴⁵, 1960; WITMER *et alii*⁶¹, 1961, bem como as numerosas modificações técnicas introduzidas nos seus protocolos, traduzem tais problemas com eloquência. É de se notar, além do mais, que as reações de fixação do complemento e de hemaglutinação exigem a obtenção freqüente de quantidades relativamente grandes de toxoplasmas, o que é sempre limitado pela impossibilidade, até o presente, do cultivo "in vitro" desses organismos.

A intuição de COONS⁷ (1941) de marcar proteínas imunologicamente ativas por substâncias fluorescentes, e de assim obter "corantes" com especificidade imunológica, veio criar novas possibilidades em biologia, inclusive no campo da sorologia. O posterior desenvolvimento e utilização de fluorocromos facilmente ligáveis às proteínas e quimicamente estáveis, como o isotiacianato de fluoresceína (RIGGS *et alii*⁴⁰ 1958), a lissamina rhodamina B (CHADWICK *et alii*⁵, 1958) e outros, possibilitou a divulgação do emprego dos novos métodos de imunocoloração, ou melhor, de imunofluorescência.

De execução bastante simples, não exigindo senão aparelhagem de custo acessível e reativos de fácil preparo ou já hoje de obtenção no comércio, as técnicas de imuno-

fluorescência vêm encontrando aplicação cada vez mais ampla na prática médica. Além disso, elas têm mostrado alta sensibilidade e grande especificidade de resultados. Todas essas características justificam o interesse despertado para a adaptação das técnicas de imunofluorescência à sorologia da toxoplasmose.

As primeiras tentativas na pesquisa de anticorpos para *Toxoplasma gondii* com técnicas de imunofluorescência foram feitas por GOLDMAN¹⁷, em 1957. Esse pesquisador, inicialmente, conseguiu evidenciar toxoplasmas por imunofluorescência em esfregaços de exsudatos peritoneais de camundongos infectados. Para isso, utilizou soros imunes contendo anticorpos específicos, marcados pelo isocianato de fluoresceína. Submetidos diretamente à ação destes, os toxoplasmas mostravam-se fluorescentes quando observados à luz ultravioleta. Goldman demonstrou a especificidade das colorações obtidas, inibindo-as pelo tratamento prévio dos organismos por um anti-soro específico não marcado. As áreas antigênicas dos parasitas eram então bloqueadas pelos anticorpos não marcados e passavam a não mais fixar os anticorpos conjugados ao fluorocromo. Em seguida, GOLDMAN¹⁸ (1957) aplicou o mesmo processo de inibição à pesquisa de anticorpos séricos. Tratava os esfregaços, contendo toxoplasmas, pelos soros suspeitos e pelas globulinas marcadas. A presença de anticorpos nos soros era traduzida pela inibição, parcial ou total, da fluorescência dos toxoplasmas. Resultados mais consistentes eram obtidos fazendo a reação em apenas um tempo, isto é, tratando os esfregaços por mistura do soro a testar e conjugado específico. Os anticorpos presentes no soro como que competiam com os anticorpos marcados e se fixavam, preferencialmente, e com exclusão destes, às áreas antigênicas dos toxoplasmas. Goldman trabalhava somente com soros não diluídos e apenas avaliava a intensidade da inibição, de 1⁺ a 4⁺. Não mais do que 50% dos soros reagentes na reação de Sabin-Feldman mostravam atividade inibidora. A maioria das discrepâncias entre as duas reações ocorria com soros de baixos títulos, inferiores a 1/256 na reação de Sabin-Feldman.

Somente cerca de cinco anos depois destes primeiros trabalhos, registra a literatura novos resultados com a técnica de inibição da fluorescência para a toxoplasmose; foram publicados por GOLDMAN *et alii*²⁰ (1962).

Para aumentar a sensibilidade da reação, usaram conjugados diluídos ao limite da atividade fluorescente. Titularam os soros empregando diluições crescentes, de razão 4, como é habitual na reação de Sabin-Feldman. A reação de inibição mostrou boa reprodutibilidade de títulos e estes aproximaram-se nitidamente daqueles obtidos com a reação de Sabin-Feldman. Os resultados de ambas concordaram, dentro da variação de um tubo de diluição, em 83% de 183 soros paralelamente titulados. Entretanto, em conjunto, a reação de fluorescência mostrou-se menos sensível do que a reação de Sabin-Feldman, em geral revelando títulos mais baixos.

DALLENBACH & PIEKARSKI¹⁹, em 1960, procurando demonstrar toxoplasmas em tecidos por meio de anticorpos fluorescentes, verificaram relação quantitativa evidente entre os títulos dos soros e a intensidade das fluorescências resultantes. Esses pesquisadores, além da técnica direta descrita por GOLDMAN¹⁷, utilizaram também a técnica indireta. Esta, descrita inicialmente por WELLS & COONS²⁰, (1954), consiste em evidenciar os anticorpos fixados às estruturas antigênicas por meio de soro antiglobulina, marcado por fluorocromo. O material, contendo os parasitas, em lâminas, é tratado inicialmente pelo soro com anticorpos específicos. Depois é lavado em solução salina para a retirada das proteínas não imunologicamente ligadas às estruturas antigênicas. Em seguida, é pôsto em contato com o conjugado antiglobulina. Os anticorpos do soro, de natureza globulínica, ligados imunologicamente aos toxoplasmas, funcionam então como antígenos, fixando estas proteínas marcadas. Sob iluminação adequada, tornam-se fluorescentes e emprestam esta fluorescência aos organismos a que estão ligados.

KELEN *et alii*³², (1962) foram os primeiros a relatar a utilização da técnica indireta de imunofluorescência na sorologia da toxoplasmose. Titularam cerca de 600 soros humanos paralelamente pelas reações de Sabin-Feldman, de imunofluorescência indireta, de fixação do complemento e de hemaglutinação. Enquanto 30,8% dos soros reagiram positivamente à reação de Sabin-Feldman, nas demais reações tais percentagens foram sensivelmente menores, de 5,0% para a imunofluorescência, 2,9% para a fixação do complemento e 3,9% para a hemaglutinação. Comparando títulos obtidos na reação de Sa-

bin-Feldman com a reatividade à imunofluorescência, esses pesquisadores verificaram que todos os soros de títulos iguais ou maiores do que 1/1 024 reagiam positivamente na imunofluorescência. Entretanto, dos soros com títulos entre 1/128 e 1/64, somente 37% reagiam na fluorescência e, daqueles com títulos ainda menores, apenas raros o faziam. Kelen *et alii* interpretaram tais resultados como uma evidência a mais da inespecificidade dos resultados da reação de Sabin-Feldman, especialmente quando revelava baixos títulos.

MANDRAS *et alii*⁴¹, (1962), referiram os resultados das titulações de 20 soros de pessoas consideradas clinicamente doentes de toxoplasmose. Empregaram as reações de Sabin-Feldman, de fixação do complemento, de hemaglutinação e de imunofluorescência. Em 16 soros reagentes na reação de Sabin-Feldman encontraram 15 reagentes na imunofluorescência e os títulos obtidos em ambas, de 1/10 e 1/1 280, eram comparáveis. Em 13 desses 15 soros reagentes, os títulos nas duas reações não divergiam de mais do que duas diluições, de razão 2. Já, em 51 soros de pessoas consideradas normais, as reações feitas, de fixação do complemento, de hemaglutinação e de imunofluorescência, foram negativas, com exceção de um único soro que reagiu apenas na fluorescência e em baixo título (1/10).

Durante o ano de 1963, no Laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, começamos a nos adestrar em técnicas de imunofluorescência, especialmente dirigidas para a pesquisa e titulação de anticorpos séricos. Para a toxoplasmose, procuramos trabalhar inicialmente com a técnica de inibição, de GOLDMAN¹⁸, (1957). Entretanto, nossos resultados mostraram-se constantemente pouco sensíveis com relação aos títulos revelados pela reação de Sabin-Feldman, embora tivéssemos utilizado conjugados específicos de diferentes atividades e em diferentes diluições.

Tentamos, então, a técnica indireta e os resultados iniciais mantinha-se bastante inferiores aos da reação de Sabin-Feldman. Entretanto, pela introdução de ligeiras modificações técnicas, empregando conjugados de melhores características, obtivemos nítida elevação dos títulos que atingiram e mesmo ultrapassaram aqueles revelados pela reação de Sabin-Feldman. Publicamos então, em nota

prévia (CAMARGO³, 1964), o estudo comparativo de 140 soros humanos, titulados pelas técnicas de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta. Houve concordância total das percentagens de reatividade. Assim, todos os 109 soros reagentes na reação de Sabin-Feldman mostraram-se também reagentes na imunofluorescência, e vice-versa: todos os soros reagentes na fluorescência também o foram na prova do corante. Além disso, houve concordância dos títulos obtidos em ambas as reações, da ordem de 90,8% dentro de uma variação de uma diluição de razão 4. Não houve discrepâncias de títulos maiores do que duas diluições. Quanto a níveis de títulos, eles variavam de 1/16 a 1/32 000 e 1/64 000. Na maioria, os títulos revelados pela reação de imunofluorescência foram iguais ou superiores aos da reação de Sabin-Feldman.

Depois de publicada esta nota, tivemos conhecimento de publicações dos últimos meses de 1963 e 1964, referindo resultados mais sucintos obtidos por alguns pesquisadores. GARIN *et alii*¹⁵, (1963) submetem às reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta 189 soros humanos, dos quais 127 foram não reagentes em ambas. Os soros reagentes foram então testados em apenas três diluições diferentes, de 1/10, 1/100 ou 1/200 e 1/1 000. Houve boa correlação de títulos, freqüentemente mais elevados na reação de fluorescência. O mesmo verificaram STADTSBAEDER *et alii*¹⁶, (1964), em cerca de 70 soros humanos. ZARDI¹², (1963), trabalhando com pouco mais de uma centena de soros humanos, fez titulagens ao mesmo tempo pelas técnicas de Sabin-Feldman e de imunofluorescência em apenas 38 soros. Eram todos fracamente reagentes, não ultrapassando 1/256 os títulos máximos observados. Os resultados das titulagens, feitas com diluições sucessivas de razão 2, foram praticamente concordantes, em geral não havendo divergências maiores do que uma diluição.

KRAMARZH¹⁴, (1963) comparou a intensidade de reações de imunofluorescência indireta e de inibição de fluorescência de soros humanos diluídos a 1/10, com os resultados de titulagens por reações de fixação do complemento. Em geral, quando os títulos de fixação do complemento eram iguais ou maiores do que 1/40, as reações de fluorescência mostravam-se intensamente positivas. Para títulos de 1/10 e 1/20, eram positivas ou le-

vemente positivas, para fixações do complemento negativas, as reações de fluorescência eram igualmente negativas ou, por vêzes, levemente positivas.

Ainda em 1963, RUCKERBAUER *et alii*¹⁹ referem o emprêgo de técnicas direta e indireta de imunofluorescência para a demonstração de toxoplasmas em esfregaços de órgãos e de exsudato peritoneal e em cortes histológicos de material de animais infetados. Verificaram também a possibilidade de se pesquisar anticorpos nos soros de animais pelas técnicas de imunofluorescência, indireta e de inibição que, entretanto, resultaram menos sensíveis do que a da fixação do complemento.

* * *

Diante do exposto, propuzemo-nos a verificar, em número relativamente grande de soros, se os resultados da reação de imunofluorescência indireta são realmente concordantes aos da reação de Sabin-Feldman, como parecem evidenciar nossos resultados preliminares. Tal verificação apresenta grande interesse prático, qual seja o de possibilitar a divulgação do uso, hoje seriamente limitado pelas dificuldades inerentes à reação de Sabin-Feldman, de reações sorológicas para a toxoplasmose. Além disso, apresenta importância relevante em afastar dúvidas sobre a especificidade dos resultados da reação do corante. Essas dúvidas surgem, ao menos em parte, da impossibilidade de se confirmarem por outras técnicas sorológicas, muitos dos resultados da reação de Sabin-Feldman, especialmente quando de baixos títulos.

Propuzemo-nos ainda a apresentar os detalhes técnicos do método de fluorescência, tendo em vista o grande interesse de sua aplicação na pesquisa e na prática médica.

II — MATERIAL E MÉTODOS

a) SOROS — Os soros humanos, em número de 1 000, estudados no presente trabalho, não foram selecionados, mas constituem o material por nós recebido durante alguns meses do ano de 1964 para a pesquisa e titulação de anticorpos para toxoplasma. Os sangues foram colhidos evitando-se apenas os períodos pós-prandiais correspondentes a refeições mais copiosas, colocados em todos secos para coagular e em seguida mantidos em

estufa a 37°C para a retração do coágulo. Os soros, separados por centrifugação, eram utilizados em seguida, ou mais freqüentemente, congelados a 20°C até o momento das reações. Para as reações, alíquotas dos soros eram inativadas a 56°C por 30 minutos e em seguida diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,85%. As diluições se faziam na razão 4, de 1/16 a 1/4 096 e quando necessário, de 1/4 000 em diante, na razão 2. Preparavam-se da seguinte maneira: a um tubo com 1,5 ml do diluente, adicionava-se 0,1 ml de soro, misturava-se e passava-se 0,1 ml para um segundo tubo contendo 0,3 ml de diluente e assim por diante, para se obter ao todo 5 diluições, respectivamente de 1/16, 1/64, 1/256, 1/1 024 e 1/4 096. Para diluições maiores, a um tubo com 9,9 ml de diluente adicionava-se 0,1 ml de soro (diluição a 1/100), misturava-se e passava-se 0,1 ml para tubo com 0,9 ml de diluente (diluição a 1/1 000). Dêste, passavam-se 0,2 ml para tubo com 0,6 ml de diluente (diluição a 1/4 000). Passando-se 0,5 ml desta última diluição sucessivamente para tubos contendo 0,5 ml de diluente, obtinham-se diluições crescentes de razão 2 (1/8 000, 1/16 000, 1/32 000 e 1/64 000).

As mesmas diluições foram utilizadas para as reações de imunofluorescência e de Sabin-Feldman, realizadas concomitantemente e lidas independentemente por pessoas diferentes que ignoravam os resultados.

b) REAÇÃO DE SABIN-FELDMAN — Esta reação foi realizada pela modificação técnica do método original de SABIN-FELDMAN³² (1948), utilizada há vários anos no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os toxoplasmas, da cepa M isolada nesse mesmo Departamento, foram mantidos em camundongos brancos e repicados cada dois ou três dias.

Para a reação, utilizamos o exsudato peritoneal de camundongo inoculado dois dias antes. Com animais de peso constante (em torno de 20 g), originários da mesma colônia e inoculando-se número grosseiramente constante parasitas, tornou-se possível a obtenção relativamente constante de exsudatos peritoneais muito ricos em toxoplasmas e praticamente livres de células e de leucócitos. Para isso, inoculamos cerca de 0,5 a 1,0 ml de lavado peritoneal em cada camundongo, material êsse obtido injetando-se e aspiran-

do-se 5 ml de solução salina estéril na cavidade peritoneal de animais com dois dias de inoculação. Obtivemos, em geral, de 20 a 50 parasitas por campo microscópico de 230 aumentos, ao se observar pequena gôta (de agulha calibre 8, mantida horizontalmente) entre lâmina e lamínula de 18 x 18 mm. Os leucócitos, em geral, ocorreram em proporção diminuta, até um ou dois por campo microscópico. Enquanto para os repiques colhemos o exsudato peritoneal com solução estéril de cloreto de sódio a 0,85%, para a reação de Sabin-Feldman usamos solução de citrato de sódio a 3,8%.

Para reação, o lavado peritoneal, uma vez colhido, era diluído sem demora a 1/5 com "fator acessório" e o antígeno resultante, imediatamente pipetado nos tubos de reação. Como "fator acessório" foram usados soros humanos de doadores previamente selecionados entre pessoas jovens com reações de Sabin-Feldman negativas. Além disso, tais soros não deviam ter atividade lítica inespecífica sobre os parasitas, traduzida pela presença de mais de 10% de toxoplasmas não corados nos tubos testemunhas.

Êsses testemunhas eram feitos: 0,02 ml de lavado peritoneal mais 0,08 ml de "fator acessório", mais 0,1 ml de solução salina. Seguiu-se a reação, como a de Sabin-Feldman.

Tal atividade inespecífica, entretanto, foi raramente observada, ao menos em soros de doadores jovens (18 anos, em média). O sangue para "fator acessório" era colhido diretamente em tubos de centrifugação secos e deixado coagular à temperatura ambiente. Os tubos eram em seguida mantidos em estufa a 37°C para retração do coágulo e passados para geladeira onde permaneciam até o dia seguinte, para se obter o máximo volume de soro. Separado por centrifugação, êste era imediatamente distribuído em tubos, em volumes de cerca de 10 ml e congelado a -20°C.

Para uso, degelava-se um ou mais tubos e o remanescente era novamente congelado, sem perda de atividade. Tais soros conservaram-se ativos por períodos de, pelo menos, dois meses no congelador.

Para a reação de Sabin-Feldman, a volumes de 0,1 ml das diluições dos soros, em tubos de 12 x 75 mm, juntava-se 0,1 ml da mistura antigênica exsudato-fator acessório, misturando-se por agitação. Incubavam-se os tubos por uma hora, em banho-maria a

37°C, com agitação ocasional. Ao fim desse período, pipetava-se em cada tubo uma gota (de 0,030 a 0,035 ml) de azul de metileno alcalino, preparado segundo Sabin & Feldman (A 1,0 ml de tampão carbonato-borato de pH 10,8, adiciona-se 0,3 ml de solução alcoólica saturada de azul de metileno; tampão alcalino: 9,72 ml de carbonato de sódio anidro a 0,53% e 0,28 ml de borato de sódio a 1,91%). Deixavam-se os tubos à temperatura ambiente por 15 minutos aproximadamente e após esse período uma alíquota de cada era examinada entre lâmina e lamínula ao microscópio (320 aumentos). Contavam-se então os toxoplasmas corados e não corados, em número suficiente para se estabelecerem as percentagens respectivas, para cada diluição de soro. O número total de organismos contados variava de 50 a 100 para os preparados em que não era evidente o predomínio de corados ou não corados.

Como título dos soros foi tomada a maior diluição ainda capaz de modificar 50% ou mais dos toxoplasmas presentes, tornando-os não coráveis pelo azul de metileno. Em todas as reações eram incluídos como testemunhas positivas soros de títulos conhecidos. A sensibilidade da prova era freqüentemente verificada incluindo-se nas reações soro positivo padrão, de título 1/1 000 (gentilmente enviado pelos Drs. Brooke e Kagan, do Communicable Disease Center, Atlanta, U.S.A.).

c) REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA — Em síntese, a reação de imunofluorescência indireta consistiu em se fazer agir diluições crescentes dos soros a testar sobre esfregaços de toxoplasmas fixados em lâminas microscópicas. Em seguida, estas eram lavadas e tratadas por antiglobulina humana marcada. Após nova lavagem para a retirada da antiglobulina marcada não fixada imunologicamente, as lâminas eram montadas e examinadas em microscopia de fluorescência.

Descreveremos inicialmente os elementos da reação, antígeno e antiglobulina marcada, seu preparo, sua características; daremos, em seguida, a técnica detalhada da execução e da leitura da reação.

1) Antígeno

Como antígeno para a reação de imunofluorescência foram usados toxoplasmas fixados sobre lâminas de microscopia. Os parasitas eram obtidos de exsudatos peritoneais de camundongos, da mesma maneira como já descrito para a reação de Sabin-Feldman. Em seguida, eram fixados em formalina a 1%, como preconizado por GOLDMAN¹⁷ (1957). Ao material obtido por lavagem peritoneal com solução de cloreto de sódio a 0,85% ou de citrato de sódio a 3,8%, juntava-se igual volume de solução salina tamponada com fosfatos* contendo 2% de formalina. Misturava-se rapidamente por agitação e deixava-se à temperatura ambiente ou a 37°C durante 1/2 hora, com agitação ocasional. Centrifugava-se em seguida todo o material por 10 minutos a 2 000 r.p.m. (Centrífuga Internacional n.º 1) para sedimentar os parasitas. Dispensava-se a centrifugação prévia, a baixa velocidade, recomendada por Goldman, para a retirada dos leucócitos, já que estes ocorriam em pequeno número em nosso material. Os toxoplasmas eram então suspensos em volume adequado de solução de cloreto de sódio a 0,85% a fim de se conseguir, nos preparados, um número adequado de parasitas por campo microscópico. Esse volume era encontrado por tentativas.

A manipulação de grande número de lâminas, quando se titulam vários soros em uma reação, constitui dificuldade técnica da prova de imunofluorescência, especialmente na fase de leitura microscópica. Por esse motivo procuramos realizar maior número de reações por lâmina. Com esmalte de unhas, delimitamos, sobre cada lâmina, 10 pequenas áreas quadradas, com cerca de 5mm de lado, dispostas em dois grupos, ocupando cada um superfície correspondente à de uma lamínula de 18 x 18 mm, como demonstra a figura 1. Em publicação recente descrevemos o preparo das lâminas para utilização em reações sorológicas de imunofluorescência (CAMARGO³).

(*) A solução salina tamponada com fosfatos utilizada no presente trabalho consiste de solução aquosa de cloreto de sódio a 0,85% contendo fosfatos primário e secundário de sódio a 0,01 M, com pH 7,2. Era preparada em solução para uso com água destilada (50 ml para 1 000 ml) segundo as necessidades. A composição da solução estoque era a seguinte: NaCl 170,0g; Na₂HPO₄ 24,0g; NaH₂PO₄·2H₂O 5,0g; água destilada para 1 000 ml.

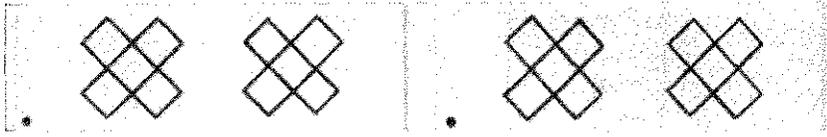


Fig. 1 — Lâminas de microscopia para reações sorológicas em técnicas de imunofluorescência.

A suspensão de toxoplasmas é depositada em cada uma das pequenas áreas por meio de pipeta de Pasteur ou de pipeta adaptada a agulha hipodérmica sem bisel. Aspira-se todo o excesso de líquido, restando apenas pequena quantidade recobrimdo por igual todo o pequeno quadrado. As lâminas secam rapidamente à temperatura ambiente ou na estufa a 37°C. A secagem de gotículas maiores apresenta, em nossa experiência, o inconveniente da formação de cristais de cloreto de sódio, responsáveis pela má fixação de organismos sobre as lâminas. Uma vez secas, estas são conservadas a -20°C até o momento do uso, mantendo-se inalteradas por muitos meses.

As suspensões de toxoplasmas podem ser conservadas em geladeira e utilizadas para o preparo de lâminas somente dentro de um prazo de 24 horas, desde que há perda progressiva da atividade antigênica depois desse período. O mesmo foi observado por GARIN *et alii*¹⁵ (1963) que tentaram preservar os toxoplasmas por vários métodos, inclusive o de liofilização, sem resultados.

Temos observado conservação das suspensões por períodos mais longos, até cerca de dois meses, incorporando-se às mesmas um agente quelante — etileno-dinitrilo-tetracetato sódico (EDTA) — como utilizado por PORTNOY & GARSON⁴⁷ (1960), para a preservação de antígenos de cardiolíplina (O “seqüestro” pelo EDTA de íons metálicos especialmente cúpricos suprimiria a ação catalítica destes e as reações de oxidação resultantes). Para manter pH neutro, misturamos soluções de 0,1 M de EDTA tetrasódico e dissódico na proporção de 3 para 2 e juntamos a mistura à suspensão de parasitas, para a concentração final de 0,01 M.

Métodos mais eficazes de preservação seriam, entretanto, de importância para a diluição da reação de imunofluorescência.

B) *Conjugado antiglobulina-fluoresceína*

A) SÔRO IMUNE — O sôro antiglobulina humana para o preparo do conjugado utilizado neste trabalho foi obtido por imunização de coelhos, pela técnica de Dalla Volta & Di Caprio (descrita e utilizada por LACAZ³⁵, 1953), no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apresentava título aglutinante de 1/8 000 diante de hemácias Rh-positivas sensibilizadas por anticorpos incompletos. Além desse, outros soros imunes utilizados para o preparo de conjugados foram obtidos pela imunização de coelhos com gamaglobulina humana do comércio, incorporada em adjuvante completo de Freund. Teremos a oportunidade de referir observações com vários conjugados, além daquele utilizado neste trabalho, quando tratamos dos resultados da reação de fluorescência.

B) FLUOROCROMO — Para a marcação das globulinas usamos o isotiocianato de fluoresceína produzido pela “The Sylvana Company”, lote n.º 1 036, doado ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela Fundação Kellog. Como foi demonstrado por FROMMHAGEN & SPENDLOVE¹², (1962), a presença em lotes de isotiocianato de fluoresceína de produtos de degradação do fluorocromo é um dos fatores responsáveis pelas colorações inespecíficas dos conjugados. Por isso, recomenda-se o emprêgo de isotiocianato da mais alta pureza, sabendo-se que, mesmo produtos de boa procedência contém por vezes 30% ou mais do seu peso em componentes degradados. Esses pesquisadores chamam a atenção para o matiz laranja de tais componentes contrastando com a cor pálida, amarelo esverdeada, do isotiocianato puro. O fluorocromo por nós utilizado foi submetido à electroforese em papel como indicado por Frommhagen & Spendlove, obtendo-se três componentes, um com velocidade de migração intermediária, de cor ama-

relo-limão e dois outros, de migração respectivamente mais rápida e mais lenta, de coloração laranja. O componente intermediário constituía quase a totalidade do material, dando mancha de intensa fluorescência à luz ultravioleta. Os dois outros formavam manchas discretas, apenas visíveis, indicando sua baixa concentração no presente lote de isotiocianato.

C) MARCAÇÃO DA ANTIGLOBULINA — Para a marcação com o fluorocromo foram tomadas as frações globulínicas do sôro imune de coelho, antiglobulina humana. Essas frações foram separadas das demais proteínas do sôro por precipitação a 4° C com sulfato de amônio de meia saturação, juntando-se a um volume de sôro, igual volume de sulfato de amônio saturado, lentamente, gota-a-gota e com agitação constante. A mistura era mantida até o dia seguinte em geladeira, para total precipitação das globulinas. Estas eram separadas por centrifugação a frio e resuspensas em sulfato de amônio de meia saturação, em volume igual ao do sôro. Centrifugava-se novamente e repetia-se esta lavagem das globulinas em sulfato de amônio por mais uma vez. Finalmente, dissolvia-se o sedimento em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,85%, em volume igual ao do sôro. Procedia-se em seguida à retirada do sulfato de amônio residual, por diálise contra solução salina freqüentemente trocada até que não mais se evidenciassem traços de sulfato de amônio no banho, revelados pela adição de gotas de reativo de Nessler ou de solução de cloreto de bário a 10%. Em geral bastavam períodos de 24 horas. Dosavam-se, então, as proteínas na solução, pelo método referido adiante (pág. 11) e, acertando-se a concentração final a 1 g por 100 ml, pela adição de volumes adequados de solução salina.

Com o objetivo de reduzir a atividade inespecífica dos conjugados, traduzida pela fluorescência de elementos não antigênicos, várias modificações têm sido introduzidas nas técnicas de marcação das proteínas por fluorocromos. CURTAIN⁹ (1958) verificou que, nos conjugados de isocianato de fluoresceína, os componentes mais responsáveis pelas colorações inespecíficas eram aqueles com maior mobilidade electroforética, isto é, com maior carga elétrica negativa. Tais

componentes eram os que possuíam maiores quantidades de fluorocromo por miligrama de proteínas.

MAYERSBACH & SCHUBERT¹⁰ (1960) estudaram as causas predominantes dos fenômenos de fluorescência inespecífica e concluíram como tendo influência decisiva a relativa acidez dos conjugados com relação às estruturas orgânicas a eles submetidas. GOLDSTEIN *et alii*²¹ (1961) confirmaram as observações de Mayersbach & Schubert. As moléculas de proteínas, em consequência da combinação com moléculas de fluorocromo, perdem cargas elétricas positivas. Essa perda é tanto maior quanto mais intensa a marcação, isto é, quanto maior o número de moléculas de fluorocromo ligadas a cada molécula protéica. Em consequência, há uma baixa do ponto isoelétrico das proteínas e aumento de sua mobilidade electroforética, além de outras modificações. Os mesmos pesquisadores trataram globulinas imunes com quantidades variáveis de isotiocianato de fluoresceína, verificando que a marcação resultante era mais intensa a medida que eram maiores as quantidades de fluorocromo oferecidas para a conjugação. Exprime-se de maneira simples o grau de marcação das proteínas em um conjugado, pela relação F/P, na qual êstes símbolos representam as quantidades respectivas de fluorocromo e de proteínas, em miligramas por mililitro. Nas técnicas de marcação inicialmente descritas, as quantidades de fluorocromo adicionadas às soluções de proteínas eram relativamente elevadas. Assim, na técnica de MARSHALL *et alii*¹² (1958) que substitui pelo isotiocianato de fluoresceína o isocianato utilizado por COONS & KAPLAN⁸ (1950), adicionam-se 50 mg de fluorocromo para cada grama de proteínas, isto é, na relação ponderal de 1/20. Com tal proporção, resultam conjugados com índices F/P da ordem de 20×10^{-3} ou mais. Goldstein *et alii*, no trabalho já referido, obtiveram colorações específicas intensas, não prejudicadas por colorações inespecíficas, com proteínas marcadas tendo índices F/P de 2 a $3,5 \times 10^{-3}$. Para a marcação adicionavam apenas 6 a 8 mg de isotiocianato de fluoresceína por grama de proteínas, mantendo assim relação ponderal de 1/166 a 1/125. Frommhagen & Spendlove não obtiveram colorações inespecíficas com proteínas marcadas com isotiocianato de fluoresceína de alto grau de pureza química, até que o índice

F/P não ultrapassasse o valor de $5,0 \times 10^{-3}$. Acima deste, a inespecificidade das colorações aumentava progressivamente.

Entretanto, o índice F/P exprime apenas um valor médio de marcação para cada conjugado, podendo haver grande variação na intensidade de conjugação de suas diferentes moléculas protéicas. Curtain já havia demonstrado tal heterogeneidade em conjugado de isocianato de fluoresceína. Conseguiu separar as frações homogêneas por meio de electroforese de convenção. GOLDBSTEIN *et alii* (1961) empregaram para o mesmo fim cromatografia em coluna permutadora de íons, trabalhando com anticorpos marcados por isotiocianato de fluoresceína.

CLARK & SHEPARD⁶ (1963) abordaram o problema da homogeneidade de marcação dos conjugados, por ângulo diverso. Em vez de fracionar conjugados heterogêneos em componentes homogêneos, procuraram marcar as moléculas protéicas de maneira uniforme, para níveis adequados de F/P. Para tanto, adicionavam o fluorocromo à solução protéica de maneira gradual, por diálise, evitando assim, na solução, concentrações locais elevadas do corante, que pudessem condicionar conjugações heterogêneas. As proteínas eram colocadas em tubo de celofane e este, mergulhado em banho contendo o fluorocromo em concentração tal que, uma vez estabelecido o equilíbrio, permitisse relação ponderal da ordem de 1/100, com as proteínas. Resultavam conjugados homogêneos, com índices F/P de 4,7 a $8,1 \times 10^{-3}$, dando colorações específicas intensas e colorações inespecíficas nulas ou muito fracas.

Preparamos nossos conjugados por técnica semelhante, ligeiramente modificada, que a seguir descrevemos.

Em tubo de diálise, a solução de globulinas era mergulhada em banho de cinco vezes o seu volume de solução de cloreto de sódio a 0,85% tamponada a pH 8,6 — 8,8 e contendo, em solução, isotiocianato de fluoresceína na concentração de 0,1 mg por mililitro. O tampão, de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio a 0,5 M, era rigorosamente acertado em potenciômetro. Preparava-se juntando de 4 a 5 ml de solução 0,5 M de carbonato a 100 ml de solução 0,5 M de bicarbonato. Para o tamponamento do banho, adicionava-se 1 parte de tampão a 9 partes de solução de cloreto

de sódio a 0,85%. O fluorocromo era dissolvido diretamente nessa solução tamponada. A diálise era mantida por 16 a 18 horas, com agitação contínua, em geladeira. Ao fim desse tempo, o saco de diálise era retirado do banho de fluoresceína e colocado em solução salina tamponada com fosfatos (0,01 M), de pH 7,2, para a retirada do fluorocromo não ligado às globulinas. Esta segunda diálise era feita por vários dias, em geral por uma semana, com trocas frequentes da solução tamponada, de início substituída cada três horas, depois uma ou duas vezes por dia.

Para se estabelecer as características do conjugado quanto à intensidade de marcação das proteínas pela fluoresceína, dosavam-se ambos estes elementos e calculava-se o índice F/P, já referido.

D) DOSAGEM DA FLUORESCÊNCIA NOS CONJUGADOS — A concentração de isotiocianato de fluorescência ligado às globulinas foi determinada espectrofotometricamente por leitura direta da intensidade da cor de diluições adequadas dos conjugados em solução salina tamponada, de pH 8,6 ou aproximado. A correspondência entre transmitâncias e concentrações foi obtida por meio de curva de calibração, construída a partir de soluções aquosas em meio alcalino de concentrações conhecidas de isotiocianato de fluoresceína.

Várias características físico-químicas dos fluorocromos, como por exemplo a intensidade de fluorescência, são modificadas pela ligação química com moléculas de proteínas. Por isso procurou-se verificar a validade do emprêgo de curvas de calibração construídas com soluções de fluorocromos livres, não ligados a proteínas, para a dosagem dos mesmos nos conjugados protéicos, onde se encontram unidos quimicamente às proteínas. GOLDMAN & CARVER¹⁹ (1961) prepararam conjugados adicionando isotiocianato de fluoresceína às soluções protéicas. Em seguida retiravam por diálise o fluorocromo não fixado. Dosavam então o isotiocianato fixado às proteínas, estabelecendo a diferença entre o isotiocianato adicionado inicialmente e o isotiocianato livre recolhido com o líquido de diálise. Por outro lado, dosavam o isotiocianato fixado às proteínas nesses mesmos conjugados, por espectrofotometria, utilizando curvas de calibração feitas a partir de isotiocianato livre. Comparando

ambos os resultados, concluíram pela ausência de diferenças significativas. Entretanto, mais recentemente McKINNEY *et alii*³⁰ (1964) repetindo essa comparação com técnicas mais delicadas, em que o isotiocianato não conjugado era recuperado em coluna de Sephadex, verificaram apreciável diferença entre os coeficientes de extinção de isotiocianato livre e de isotiocianato conjugado. Mas, para manter uniformidade com os resultados de outros pesquisadores, continuam empregando coeficientes de extinção de fluorocromo livre para a dosagem de isotiocianato conjugado. Lembrem, ainda, a possibilidade de variações em diferentes conjugados do coeficiente de extinção do fluorocromo combinado, pela interferência de uma série de fatores ainda mal definidos, sendo portanto aconselhável empregar ao menos provisoriamente curvas de calibração com compostos quimicamente puros de fluoresceína. Tal orientação é seguida em trabalho recente por LEWIS *et alii*³⁷ (1964).

Para o traçado das curvas escolhemos o comprimento de onda de 490 m μ correspon-

dente à máxima absorção de luz visível pelo isotiocianato. A figura 2 mostra a curva de absorção obtida em um espectrofotômetro Coleman Jr. do isotiocianato de um conjugado, em meio alcalino. As leituras foram feitas em densidades ópticas, em comprimentos de onda intervalados, de 400 a 540 m μ .

Já era conhecido o fato de que a intensidade de absorção de luz, pela molécula de fluoresceína, na região de 480 a 495 m μ , sofre acentuada redução com a acidificação do meio. EMMART¹² (1958) confirmou-o para os conjugados de fluoresceína, mostrando que a absorção é máxima em meio alcalino, diminuindo apenas ligeiramente até pH 7, mas caindo rapidamente com o aumento da acidez.

Para o traçado da curva de padronização, preparou-se solução-mãe, a 10 mg em 100 ml, de isotiocianato de fluoresceína, pesando-se rigorosamente 10 mg do sal e dissolvendo-se em pequena quantidade de acetona. Juntou-se, então, à solução, 1,0 ml de tampão carbonato-bicarbonato de sódio

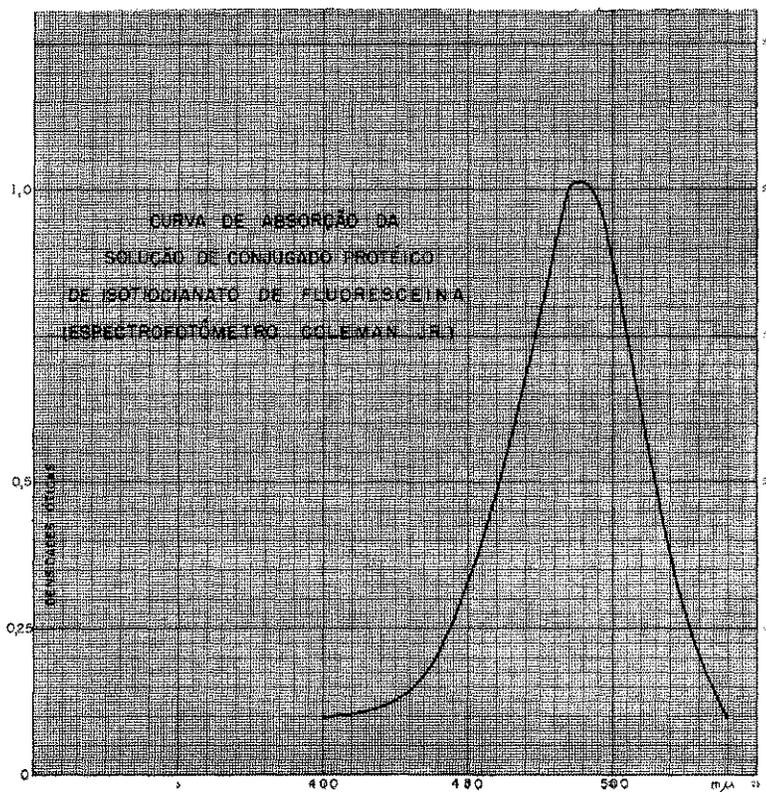


FIGURA 2

(0,5 M, de pH $8,6 \pm 0,3$) e transferiu-se cuidadosamente toda a mistura para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com água destilada. Foram então preparadas, em balões volumétricos de 25 ml ou de 50 ml, diluições crescentes do isotiocianato de fluoresceína, de 0,2 mg em 100 ml até 2,4 mg em 100 ml, intervaladas respectivamente de 0,2 mg (0,2 mg; 0,4 mg; 0,6 mg ... 2,4 mg) a partir de alíquotas da solução mãe, medidas com pipetas volumétricas, completando-se os volumes com água destilada. Utilizou-se um espectrofotômetro Coleman Jr., modelo 6A, fazendo-se as leituras em cubas de 10 mm, contra água, em 490μ . A figura 3 mostra, a título de exemplo, a curva obtida para o aparelho série n.º A42823, lançando-se em papel semilogarítmico as transmitâncias contra as respectivas concentrações de fluorocromo, expressas em miligramas em 100 ml.

ticianato de fluoresceína, foram determinadas espectrofotometricamente pelo método do biureto, segundo GORNALL *et alii*²³ (1949) ou quando em níveis inferiores a 2 g%, pela técnica de LOWRY *et alii* (1949), referida por KABAT & MAYER²⁰ (1961). As respectivas curvas de calibração foram construídas e constantemente verificadas por meio de solução padrão de globulina humana, previamente dosada pelo método de Kjeldahl. As dosagens pela técnica de Gornall *et alii* foram feitas juntando-se 0,1 ml da solução de globulina a 2,0 ml do reativo do biureto, em cubas de 12 mm, fazendo-se a leitura após o desenvolvimento de cor, no comprimento de onda de 560μ , como recomendado por GOLDWASSER & SHEPARD²³ (1958), a fim de se evitar interferência da cor da fluoresceína. Para a técnica de Lowry *et alii*, a solução de globulina era diluída adequadamente em água

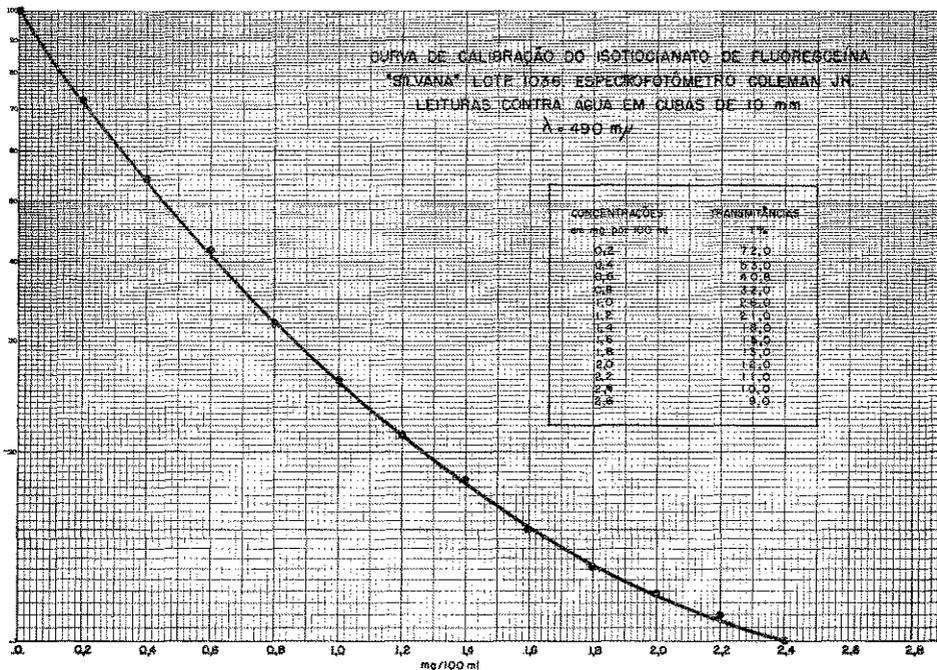


FIGURA 3

As dosagens nos conjugados foram feitas por leitura direta das transmitâncias de diluições adequadas, em solução salina tampoadada, alcalina.

E) DOSAGEM DAS PROTEÍNAS — As concentrações protéicas das soluções de globulinas, não marcadas ou já conjugadas ao iso-

destilada (a 1/50, por exemplo) e a 0,4 ml dessa diluição eram adicionados 2,0 ml do reativo cúprico e, após 10 minutos, 0,2 ml do reativo de Folin-Ciocalteu, fazendo-se as leituras em $660 m\mu$ em cubas de 12 mm.

F) CARACTERÍSTICAS DOS CONJUGADOS — Os resultados das dosagens num dos conju-

gados (*conjugado A*) utilizados no presente trabalho foram os seguintes:

Isotiocianato de fluoresceína	5,6 mg em 100 ml
Globulinas	1,0 g em 100 ml
Relação F/P	5,6 X 10 ⁻³

Determinação da atividade fluorescente inespecífica — Áreas com toxoplasmas, delimitadas sobre lâminas de microscopia, foram submetidas à ação de diluições crescentes de razão 2, do conjugado. Verificou-se que a atividade fluorescente inespecífica era intensa nos preparados correspondentes às primeiras diluições, sendo entretanto muito discreta a 1/16 e totalmente ausente de 1/32 em diante.

Atividade fluorescente específica — Fizeram-se reações, segundo a técnica descrita no parágrafo 3, empregando-se soro reagente, em concentração quatro vezes maior do que o título determinado na reação de Sabin-Feldman, isto é, em diluição correspondente ao penúltimo tubo positivo nessa reação. Foram utilizadas diluições crescentes do conjugado, a partir de 1/25 e na razão 2/3, a saber: 1/25 — 1/38 — 1/60 — 1/90 — 1/130 — 1/200 e 1/300. Resultaram fluorescências de média intensidade (2 + a 3 +) até à diluição de 1/90, de fraca intensidade nas diluições de 1/130 e 1/200 e negativa a 1/300.

O conjugado foi, então, utilizado na diluição de 1/80 nas reações.

Foi feita uma imuno-electroforese do conjugado, contra soro humano, observando-se apenas uma linha de precipitação, correspondente à gamaglobulina. À luz ultravioleta de uma lâmpada de Woods, essa linha era intensamente fluorescente, em contraste com a ausência das linhas de precipitação da mistura de soros hiperimunes usada como testemunha.

Um segundo conjugado (*conjugado B*), preparado a partir de um soro imune de coelho obtido pela injeção de gamaglobulina humana com adjuvante de Freund e com título aglutinante de 1/1 500 diante de hemácias Rh-positivas sensibilizadas, apresentou as características seguintes:

Isotiocianato de fluoresceína	7,5 mg em 100 ml
-------------------------------------	------------------

Globulinas	0,85 g em 100 ml
Relação F/P	8,5 x 10 ⁻³
Atividade inespecífica .	inferior a 1/10
Atividade específica ..	até 1/225

Este conjugado foi preparado por técnica semelhante àquela já descrita, apenas utilizando-se a concentração de 0,2 mg/ml de isotiocianato de fluoresceína no banho de diálise.

3) Técnica da reação

Retiram-se as lâminas do congelador, secam-se por alguns minutos à temperatura ambiente, sob ventilador. Pipetam-se as diluições dos soros, uma em cada quadradinho, em volumes aproximados de 0,01 ml. Cada conjunto de cinco quadradinhos destina-se a um soro diferente, nas diluições de 1/16 a 1/4 096 ou de 1/4 000 a 1/64 000. KELEN *et alii*³² (1962) mantém as lâminas por 30 minutos à temperatura ambiente, para que se processe a reação. Preferimos incubá-las a 37° C por uma hora, a fim de aumentar a sensibilidade da reação. Impede-se a dessecação, cobrindo-as com uma tampa de placa de Petri provida de papel de filtro umedecido com água. Para numerosas reações, preferimos caixa metálica provida de prateleiras plásticas móveis (conjunto Fanem para reações de fixação do complemento em placas planas). Terminada a incubação, escorre-se o excesso de líquido e lavam-se as lâminas, imergindo-as por períodos de 10 minutos em duas trocas de solução salina tamponada. Enxugam-se por pressão delicada, com papel de filtro ou papel absorvente. Em seguida, pipetam-se sobre cada área de reação volumes de cerca de 0,01 ml do conjugado, diluído em solução salina tamponada segundo o título. Incubam-se novamente as lâminas por 1 hora a 37° C em atmosfera úmida. Lavam-se por imersão em duas porções diferentes de salina tamponada por períodos de 5 minutos, enxugam-se com papel e montam-se, colocando uma lamínula de 18 x 18 mm sobre cada grupo de cinco quadradinhos, com uma gota de glicerina alcalina. Esta prepara-se adicionando a 9 partes de glicerina 1 parte de tampão alcalino, por exemplo, de carbonato de sódio — bicarbonato de sódio, 0,5 M; pH 8,7, aproximadamente. As lâminas são examinadas em microscopia de

fluorescência imediatamente após a montagem ou conservadas em geladeiras, ao abrigo da luz, para exame posterior, não perdendo a fluorescência mesmo após vários dias ou semanas.

Trabalhamos com microscópio Zeiss, binocular, com objetiva de imersão de 40 x, provida de diafragma; oculares de 10 x ou de 12,5 x; campo escuro, com condensador cardióide. A iluminação era fornecida por uma lâmpada HBO-200, filtro excitador BG12 de 3 mm e filtro barreira n.º 50 (Zeiss).

As reações positivas traduzem-se por fluorescência dos toxoplasmas, mais evidente na periferia dos parasitas, onde formam um limite brilhante, uniforme, verde-maçã, cuja intensidade vai decrescendo com o aumento progressivo das diluições do soro. Consideramos como título dos soros, as maiores diluições ainda capazes de determinar qualquer grau de fluorescência nos toxoplasmas. A transição entre reações positivas e negativas é bastante nítida, não havendo dificuldade na determinação do ponto de viragem. As reações negativas se evidenciam por total ausência de fluorescência dos toxoplasmas que aparecem com imagem muito tênue, ligeiramente esverdeada, contrastando mal com o fundo. Por vezes, entretanto, especialmente nas baixas diluições dos soros, encontra-se fluorescência dos toxoplasmas localizada exclusivamente na extremidade mais arredondada dos parasitas e nitidamente distinta da fluorescência específica que se dispõe sempre homogêneamente em tôda a periferia. Tal fluorescência zonal ou polar corresponde sempre a reações de Sabin-Feldman negativas, mesmo quando realizadas com soros não diluídos ou diluídos a 1/4.

Um detalhe técnico que facilita mais ainda a leitura das reações, tornando o ponto de viragem mais evidente, é o emprêgo de coloração de contraste pelo azul de Evans, como descrito por NICHOLS & McCOMB⁴⁶ (1962). Entretanto, em vez de tratar os preparados pelo conjugado e depois pelo azul de Evans, reunimos ambas as fases em uma única operação, acrescentando o azul à própria diluição do conjugado, para a concentração final de 1 mg%.

À luz ultravioleta a côr vermelha assumida pelo corante que impregna o corpo dos parasitas contrasta fortemente com a fluorescência periférica dos toxoplasmas.

III — RESULTADOS

Na apresentação dos resultados obtidos nas amostras examinadas, acrescentaremos quando indicado, a estimativa por intervalo que pode ser feita para o valor populacional, em termos dos limites de confiança 95% para a estatística em causa. Tais valores serão apresentados entre parênteses, com o símbolo LC-95.

I — REPRODUTIBILIDADE DAS REAÇÕES

Antes de tentarmos comparar os resultados das reações de Sabin-Feldman e de fluorescência, procuramos verificar os seus graus de reprodutibilidade. Para isso, incluímos nas reações de rotina soros previamente titulados e conservados congelados. Estes eram degelados, retirava-se uma alíquota de cada e o restante era novamente congelado -20°C. Após inativação, preparavam-se as diluições que eram submetidas a uma das reações ou a ambas.

a) *Reprodutibilidade da reação de Sabin-Feldman*

Muito se tem discutido e escrito sobre a variabilidade dos resultados da reação de Sabin-Feldman, por vezes considerados problemáticos, “freqüentemente irregulares e imprevisíveis (GOLDMAN⁴⁶, 1956)”. JACOBS & COOKS²⁶ (1954), por exemplo, demonstraram a influência perturbadora exercida por antígenos solúveis ocasionalmente presentes nos exsudatos peritoneais. Entretanto, estudos feitos por vários pesquisadores mostram que a reação é bastante reprodutível, desde que haja rigorosa padronização dos elementos participantes. RUBIN⁵⁰ (1958) verificou que os títulos, em duplicatas, coincidiam ou desviavam-se no máximo de uma diluição de razão 2. Importante contribuição para o esclarecimento do problema foi dada por VAN SOESTBERGEN *Apud*⁵⁸ (1956), VAN THIEL⁵⁸ (1958) e VAN SOESTBERGEN⁵⁷ (1962), que estabeleceram as relações matemáticas fundamentais da reação, permitindo, assim, o estudo acurado dos fatores interferentes nos resultados. A sensibilidade ao anticorpo, dos toxoplasmas que constituem a população de parasitas nos tubos de reação, se distribui segundo uma curva normal de freqüência. A relação entre quantidades de anticorpo representadas pelas diluições do soro e percentagens de toxoplasmas alterados, traduz-se

por uma reta, quando se lançam logaritmos de diluições contra probitos de percentagens de parasitas não corados. Estabelecidos esses fatos, foi possível aos pesquisadores citados verificar a grande reprodutibilidade da reação, quando alguns princípios fundamentais eram seguidos. Estão, entre estes, o emprêgo constante da mesma amostra de toxoplasma e da mesma linhagem de camundongos, assim como a utilização de "fator acessório" desprovido de atividade lítica inespecífica. Atribuem eles importância, para a boa reprodutibilidade dos resultados, à correção dos títulos por meio de cálculos em que são descontadas, das percentagens respectivas de parasitas corados e não corados, aquelas fra-

ções que decorrem de fatores inespecíficos intercorrentes. Assim por exemplo, nos toxoplasmas corados, há aqueles que escaparam à ação modificadora dos anticorpos por terem permanecido intracelulares durante o período de incubação, tornando-se extracelulares por ocasião da adição do azul de metileno ou das manipulações posteriores. Nos toxoplasmas não corados, há aqueles modificados por fatores lesivos outros que os anticorpos do sêro a testar, oriundos do exsudato peritoneal ou do sêro ativador. Em nossas reações não temos visto necessidade de tais correções. Quanto aos parasitas inespecificamente não alterados, não temos observado senão proporções ínfimas de toxoplasmas intracelulares nos ex-

QUADRO I

Títulos da reação de Sabin-Feldman realizada em duplicata, em 106 soros. Resultados expressos pelas potências de base 2 das reciprocas das diluições

Sêro n.º	Reações		Sêro n.º	Reações		Sêro n.º	Reações	
	1.ª	2.ª		1.ª	2.ª		1.ª	2.ª
1	10	8	37	8	8	73	8	8
2	8	8	38	8	8	74	8	8
3	13	13	39	8	8	75	8	10
4	8	6	40	8	8	76	8	8
5	4	4	41	8	6	77	8	10
6	8	10	42	8	8	78	8	10
7	10	8	43	8	6	79	8	8
8	6	6	44	8	8	80	8	8
9	8	10	45	8	8	81	8	10
10	8	8	46	8	10	82	8	8
11	12	10	47	10	10	83	8	8
12	12	12	48	8	8	84	8	8
13	13	12	49	10	8	85	8	8
14	10	10	50	12	10	86	8	8
15	8	8	51	10	10	87	8	8
16	8	8	52	10	8	88	8	8
17	12	12	53	10	8	89	8	8
18	10	10	54	10	10	90	8	8
19	8	6	55	8	10	91	10	10
20	12	12	56	8	6	92	10	10
21	8	10	57	10	10	93	10	10
22	12	12	58	13	13	94	10	10
23	8	8	59	8	10	95	8	8
24	8	10	60	8	8	96	8	8
25	12	12	61	8	8	97	10	10
26	8	6	62	8	8	98	8	8
27	6	8	63	8	8	99	8	8
28	12	12	64	8	6	100	8	8
29	8	10	65	8	10	101	8	8
30	10	10	66	8	8	102	8	10
31	8	10	67	8	10	103	8	8
32	6	6	68	6	6	104	10	10
33	12	10	69	8	8	105	10	10
34	8	6	70	8	10	106	10	8
35	8	8	71	8	8			
36	8	8	72	8	8			

sudatos peritoneais utilizados nas reações. Quanto aos toxoplasmas inespecificamente alterados, não verificamos sua presença nos tubos testemunhas em proporções que possam interferir nos resultados. Atribuímos êsse fato ao emprêgo de exsudatos peritoneais obtidos após somente cerca de 48 horas de inoculação de número relativamente elevado de parasitas. Além disso, os soros usados como ativadores sempre acusaram percentagens desprezíveis, ou mesmo nulas, de modificação inespecífica.

Submetemos 106 soros, de títulos variáveis de 1/16 a 1/8 000, a titulações em duplicata, realizadas a partir de diferentes alíquotas dos soros e em dias também diversos. Os títulos foram idênticos para as duplicatas de cada soro em 70 dêles, correspondentes a 66% (LC-95: 56,6 e 74,4%) do total de soros e diferiram de uma diluição, de razão 2 ou 4, em 36, correspondentes a 34%.

Êsses resultados estão reunidos no quadro I, no qual, para comodidade de registro, os títulos dos soros estão expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições. Assim, o número 4 indica a diluição de 1/16 ou 1/2⁴; o número 6 indica 1/64, 8 corresponde a 1/256, 10 a 1/1 024, 12 a 1/4 096 e 13 a 1/8 000.

Mesmo quando os soros foram submetidos a sucessivas titulações, em dias diferentes, com diferentes partidas de exsudato peritoneal e de fator acessório, os resultados mostraram-se muito constantes. O quadro II reúne alguns desses dados.

É necessário assinalar que vários meses decorreram entre algumas dessas titulações, mantendo-se os soros congelados a -20°C. Temos observado que, em tais condições, os títulos dos soros não se alteram, mesmo por longos períodos. Assim, um soro A, titulado em dezembro de 1963 e em dezembro de 1964, deu o título de 1/4 096 em ambas as vezes. Um soro B deu os títulos de 1/256 e 1/1 024.

QUADRO II

Títulos da reação de Sabin-Feldman em sucessivas determinações, expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições

Soros n.º	Títulos em reações sucessivas					
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª
18	10	10	8	10	—	—
12	12	12	12	—	—	—
75	10	8	10	8	—	—
98	8	8	10	8	—	—
99	8	10	10	8	—	—
19	8	6	8	6	6	6
24	8	10	8	10	—	—
45	8	8	8	8	8	8
15	8	8	8	8	8	8

b) *Reprodutividade da reação de imunofluorescência indireta*

Oitenta e quatro soros, com títulos entre 1/16 e 1/32 000, foram submetidos a titulações em duplicata e, em 30 dêles, a titulações em triplicata. Tais repetições foram feitas em diferentes dias, a partir de novas alíquotas dos soros. Os resultados obtidos estão reunidos no quadro III. Em 45 dos 84 soros, isto é, em 53,6% (LC-95: 43,0 e 63,8%) do total, os resultados das duplicatas foram idênticos. Nos 39 soros restantes, isto é, em 46,4%, houve variação de apenas uma diluição, com títulos mais elevados, na repetição, em 24 soros e mais baixos, em 15. Êste predomínio de títulos mais elevados na segunda determinação não é estatisticamente significativo, ao nível de 5%.

Nos 30 soros titulados em triplicatas, obtivemos resultados idênticos, nas três reações, em 15 soros, ou seja em 50% dos casos (LC-95: 33,1 e 66,9%). Nos 15 soros restantes houve diferenças de apenas uma diluição de razão 2 ou 4, entre os três valores das triplicatas.

Alguns desses soros foram submetidos a maior número de reações, todas elas realizadas em dias diferentes, por vezes com inter-

QUADRO III

Títulos da reação de imunofluorescência realizada em duplicata em 84 soros e em triplicata, em 30 destes. Resultados expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições.

Soros n.º	Reações			Soros n.º	Reações			Soros n.º	Reações		
	1ª	2ª	3ª		1ª	2ª	3ª		1ª	2ª	3ª
66	8	8	—	94	10	8	—	125	8	8	—
67	8	10	8	95	8	8	—	126	10	10	—
68	8	8	—	96	8	8	—	127	8	10	—
69	8	8	—	97	10	12	—	128	8	6	—
70	10	8	—	98	8	10	10	129	12	12	—
71	8	8	8	99	8	8	8	130	14	15	15
72	8	8	8	100	8	8	—	131	8	10	8
73	8	8	—	101	8	6	8	132	10	10	—
74	8	10	—	103	8	10	—	133	4	4	—
75	10	10	10	104	10	10	10	134	6	6	—
76	8	8	8	107	13	14	—	135	8	10	—
77	10	12	—	108	8	10	—	136	8	10	—
78	10	12	—	109	10	10	10	137	12	12	—
79	8	10	—	110	8	8	—	138	8	8	—
80	8	10	10	111	12	12	12	139	8	8	—
81	10	12	—	112	10	10	10	140	8	8	—
82	8	8	8	113	15	15	—	141	8	8	8
83	8	10	—	114	12	12	—	142	6	6	—
84	8	8	—	115	10	12	12	143	10	8	8
85	8	8	—	116	10	8	8	144	10	10	—
86	8	10	—	117	8	10	—	145	8	10	—
87	8	8	—	118	10	8	10	146	10	8	10
88	8	10	—	119	10	10	—	147	8	8	—
89	8	10	—	120	10	8	10	148	12	10	—
90	8	8	8	121	12	10	10	149	10	8	—
91	10	10	10	122	10	10	—	150	10	8	8
92	10	8	10	123	8	8	8	151	12	12	—
93	10	10	—	124	8	8	8	152	10	8	—

valos de semanas ou meses. Não obtivemos diferenças de mais de uma diluição para os títulos de um mesmo soro, mesmo quando as sucessivas reações eram feitas com diferentes partidas de antígeno. O quadro IV mostra alguns desses resultados.

QUADRO IV

Títulos da reação de imunofluorescência em sucessivas determinações, expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições

Soros n.º	Títulos em reações sucessivas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
72	8	10	8	10	—
75	10	10	10	10	—
82	8	8	8	8	—
98	8	10	10	8	—
99	8	8	8	8	—
108	8	10	10	10	—
141	8	8	8	8	8

Outro aspecto que procuramos verificar foi a influência do emprêgo de diferentes conjugados sobre os títulos. Dez soros foram diluídos adequadamente segundo os títulos obtidos na reação de Sabin-Feldman e, com as mesmas diluições de cada, fizeram-se três reações de imunofluorescência, empregando-se em cada um conjugado diferente.

Conjugado A — descrito na pág. 12

Conjugado B — descrito na pág. 12

Conjugado C — da marca "Sylvana, lote 042864, A

que nos foi gentilmente enviado pelo Dr. W. E. Deacon, do C.D.C., Atlanta, U.S.A.

O quadro V mostra que as flutuações eventuais dos títulos mantiveram-se dentro dos limites de variação encontrados ao se estudar a reprodutibilidade da reação.

QUADRO V

Títulos de 10 soros na reação de Sabin-Feldman e em reações de imunofluorescência, com diferentes conjugados. Resultados expressos em potências de base 2 das recíprocas das diluições

Soros	Reação de Sabin-Feldman	Reações de imunofluorescência		
		A	B	C
a	12	12	12	12
b	8	8	8	10
c	14	14	14	14
d	13	13	13	14
e	10	10	10	10
f	6	6	6	6
g	10	10	10	10
h	12	12	12	12
i	13	13	13	13
j	10	12	10	12

2 — RESULTADOS COMPARATIVOS DAS REAÇÕES DE SABIN-FELDMAN E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Dos 1000 soros estudados, 225 foram negativos nas duas reações, enquanto 768 foram positivos em ambas. Somente 7 soros mostraram resultados diversos, negativos na reação de Sabin-Feldman e positivos na reação de imunofluorescência, reagindo entretanto apenas a 1/16. Não houve caso algum de soro realmente positivo na reação de Sabin-Feldman que tivesse sido negativo na reação de fluorescência. O quadro VI mostra tais resultados.

QUADRO VI

Soros distribuídos segundo os resultados qualitativos das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência

Reação de Sabin-Feldman	Reação de imunofluorescência		Totais
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	768	0	768
Não reagentes	7	225	232
Totais	775	225	1000

Quanto aos títulos obtidos, verificou-se grande concordância de resultados entre as duas reações. Distribuindo os soros segundo os tí-

tulos em uma e outra reação, construímos o quadro VII, em que já se delineia tal concordância. De fato, a soma das caselas da diagonal principal desse quadro, com exclusão da casela superior esquerda onde figuram os 225 soros não reagentes, mostra que obtivemos títulos idênticos em 407 dos 775 soros reagentes, ou seja, em 52,5% (LC-95: 49 e 56%). Evidentemente, na avaliação da concordância dos resultados não levaremos em conta esses 225 soros não reagentes, pois se assim fizéssemos, o grau de concordância ficaria na dependência do percentual de soros reagentes na amostra estudada. Tal percentual, por sua vez, poderia ser expressão, não apenas da prevalência da infecção na população considerada, como também da sensibilidade das reações utilizadas.

Nos demais soros reagentes, em número de 368, houve diferenças de títulos, de apenas uma diluição em 350 e de duas diluições em 18. Não se verificaram discordâncias maiores.

Assim, dos 775 soros reagentes, temos 757, isto é, 97,7% (LC-95: 96,1 e 98,8%) com títulos iguais ou diferindo de somente uma diluição.

No quadro VIII, estudamos as discordâncias, distribuindo os 368 soros em que elas ocorreram, segundo o grau da diferença e segundo a reação em que o título foi mais elevado. Verificamos que, em 308 soros (83,7% dos casos reagentes em que não houve identidade de títulos) os resultados foram mais elevados na reação de imunofluorescência e, somente em 60 (16,3%), eles foram mais elevados na reação de Sabin-Feldman. Evidentemente, se não houvesse diferença de sensibilidade entre as duas reações, dever-se-ia esperar que nesses 368 soros o título mais elevado fosse encontrado em uma ou outra das reações o mesmo número de vezes, ou seja, em 184 vezes (50%) em cada uma. A diferença entre o resultado observado e essa expectativa tem probabilidade de ocorrência casual menor do que 1/1000, o que leva à rejeição da hipótese de igualdade da sensibilidade das duas reações e à aceitação da hipótese de ser mais sensível a reação de imunofluorescência.

QUADRO VII

Soros distribuídos segundo os títulos das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência.

Títulos da reação de Sabin-Feldman	Títulos da reação de imunofluorescência										
	Não reagentes	1/16	1/64	1/256	1/1 024	1/4 096	1/8 000	1/16 000	1/32 000	1/64 000	Totais
Não reagentes	225	7									232
1/16		4	8	7							19
1/64		1	32	42	8						83
1/256		1	5	123	92	1					222
1/1 024				33	175	110					318
1/4 096					4	34	14				52
1/8 000						4	19	8			31
1/16 000						1	3	12	6		22
1/32 000								8	8	5	21
1/64 000											0
Totais	225	13	45	205	279	150	36	28	14	5	1 000

 Caselas correspondentes a soros reagentes com títulos idênticos em ambas as reações

QUADRO VIII

Soros reagentes com títulos diferentes nas duas reações, distribuídos segundo a natureza e a amplitude da discordância

Diferença entre os títulos	Títulos mais altos		TOTAL
	na reação de imunofluorescência	na reação de Sabin-Feldman	
de uma diluição	292	58	350
de duas diluições	16	2	18
TOTAL	308	60	368

3 — COMPORTAMENTO ANÔMALO DE ALGUNS SOROS

Durante a elaboração deste trabalho, nossa atenção foi despertada para outro tipo de discordância entre os resultados das reações de imunofluorescência e de Sabin-Feldman. Raros soros reagentes nesta última, mostraram-se não reagentes na imunofluorescência. Entretanto, ao se repetirem as reações em alíquotas dos soros conservados congelados, para confirmação desses resultados, ambas eram negativas. Habitados com a estabilidade dos títulos em soros mantidos a -20°C, atribuímos inicialmente tais discordâncias a equívocos. Mas, a repetição da ocorrência do fenômeno, sua confirmação em segunda amostra de sangue de um mesmo paciente, colhi-

da dias após a primeira, e a constatação eventual da queda progressiva dos títulos, até total negatificação, em duas oportunidades, vieram afastar a hipótese de erros de técnica.

Tal comportamento anômalo foi verificado somente em 12 soros (de 11 pacientes), durante o presente estudo. Caracterizou-se pela discordância entre as reações, com positividade apenas na prova de Sabin-Feldman, aliada à labilidade dessa positividade, que tende a se anular em prazos relativamente curtos.

Embora não tenha sido possível observação uniforme de tais soros, pela dificuldade de execução da reação de Sabin-Feldman na frequência e regularidade desejadas, procuramos reunir os dados de que dispomos a respeito dos mesmos. O quadro IX traz os

QUADRO IX

Resultados de titulações sucessivas pela reação de Sabin-Feldman em soros constantemente negativos na reação de imunofluorescência

Soros	Resultados das reações					
	1ª reação	Dias *	2ª reação	Dias *	3ª reação	Dias *
A	1/256	4	negativa	10	—	—
B	1/1 024	0	negativa	2	negativa	7
C	1/1 024	6	negativa	8	—	—
D	1/64	2	negativa	4	—	—
E	1/256	1	negativa	3	negativa	8
F	1/256	3	negativa	8	—	—
G	1/16	4	negativa	11	—	—
H	1/256	0	negativa **	2	—	—
I***	1/1 024	1	negativa	12	—	—
J***	1/64	6	negativa	8	—	—
K	1/64	5	1/16	12	negativa	14
L	1/64	0	1/16	2	negativa **	7

* — Dias entre a colheita do sangue e a execução da reação.

** — Soros examinados a partir de 1/1.

*** — Soros do mesmo paciente.

resultados das reações de Sabin-Feldman feitas nesses 12 soros, bem como a época em que foram realizadas, a contar do dia da colheita dos sangues. Os períodos entre a colheita e a feitura da primeira reação variaram de 0 a 6 dias. Dos 12 soros então positivos, somente 2 ainda foram reagentes em segunda prova, feita com 12 e 2 dias respectivamente, depois da colheita de cada soro. Em ambos os casos os títulos foram menores do que os inicialmente observados. Examinados de novo, com 14 e 7 dias respectivamente, a contar da colheita, foram negativos, um deles mesmo a partir de 1/1. Os outros 10 soros, positivos na primeira reação, foram negativos já no segundo exame. Desta maneira, o maior número de dias, entre a colheita dos sangues e a feitura das reações, em que se observou esse tipo de positividade ainda presente, foi de 12 dias, isto mesmo uma única vez. No restante dos soros tal prazo não ultrapassou 6 dias.

Chamou-nos a atenção o fato de 10 dos 11 pacientes referidos serem crianças, de idades variáveis de alguns meses a cerca de 12 anos, havendo, entre estes, somente 1 adulto, com 20 anos de idade. Ora, provindo o nosso material de estudo tanto de adultos como de crianças, e tendo-se verificado mesmo proporção praticamente equivalente desses dois grupos etários nos 225 soros não reagentes, por nós encontrados (47% de adultos e 53% de crianças), torna-se pouco provável que a nítida prevalência de soros de crianças naqueles de comportamento anômalo seja decorrência de mero acaso.

Ainda não pudemos fazer observações sistematizadas sobre o fenômeno por nós verificado. Entretanto, depois de notados os fatos referidos e tendo concentrado nossa atenção nesse particular, tivemos ensejo de constatar, em diferentes ocasiões, a mesma anomalia de comportamento nos soros de cinco crianças normais, com idades de 7 a 12 anos. As reações foram feitas no mesmo dia da colheita dos sangues, em alíquotas dos soros inativados por 30 minutos a 56°C. O restante dos soros não inativados foi guardado a -20°C. Quarenta e oito horas depois, aproximadamente, as reações foram repetidas em duplicatas, uma com soro não inativado e outra com soro inativado. Todas estas repetições foram negativas, observando-se mesmo que as percentagens de toxoplasmas não corados, nos diversos tubos da reação de Sabin-Feldman, foram nulas ou muito diminutas

desde as mais baixas diluições dos soros. Reunimos no quadro X as reações efetuadas no dia da colheita dos sangues.

QUADRO X
Resultado das reações para toxoplasmose efetuadas no dia da colheita dos sangues

Soros	Reação de Sabin-Feldman	Reação de imunofluorescência
M	1/64	negativa
N	1/1 024	negativa
O	1/1 024	negativa
P	1/1 024	negativa
Q	1/256	negativa

Obs.: Foram consideradas reações negativas aquelas não reagentes desde a diluição de 1/16.

Em alguns soros, não reagentes na imunofluorescência, de crianças e de adultos, submetidos às reações logo após a colheita dos sangues, não se observou o fenômeno descrito.

IV — COMENTÁRIOS

Diante dos resultados apresentados, quer nos parecer que a reação de imunofluorescência indireta deva merecer lugar de relevo entre os métodos sorológicos para o estudo da toxoplasmose. Com resultados em geral superponíveis aos da reação de Sabin-Feldman, ela terá o mesmo valor diagnóstico do que esta, a par de grande facilidade de execução.

É preciso salientar, ainda uma vez, que a realização da reação de Sabin-Feldman está limitada a laboratórios especializados, não sendo possível, em geral, aos laboratórios clínicos comuns conseguir as condições necessárias para sua feitura. Isto porque o trabalho com toxoplasmas vivos e infetantes exige biotério e ambiente isolados para as manipulações, bem como pessoal técnico especializado. Não são mesmo infreqüentes casos de contaminação acidental em laboratório. Também constitui dificuldade, nem sempre de fácil solução, a obtenção de soro humano aceitável como "fator acessório", nas

quantidades exigidas para uma rotina razoável. Em contraposição, a reação de imunofluorescência poderá estar ao alcance dos laboratórios clínicos, posto que sua realização é extremamente simples. Não está mesmo fora de possibilidades o eventual fornecimento, por centros especializados, de suspensões de toxoplasmas para antígenos, libertando os laboratórios clínicos de inoculações ocasionais para o preparo das lâminas destinadas à reação. Quanto à obtenção do conjugado antiglobulina humana, já é de âmbito comercial, notando-se que êsse reativo é utilizável igualmente em várias outras reações sorológicas. A instalação de equipamento para microscopia fluorescente está dentro das possibilidades econômicas de laboratórios comuns e apresenta, desde já, grande interesse pela aplicação a vários métodos sorológicos e bacteriológicos extremamente rápidos, sensíveis e específicos.

Embora predomine atualmente na literatura médica o conceito de que a reação de Sabin-Feldman é a reação padrão para a sorologia da toxoplasmose, não apenas pela grande sensibilidade como também pela especificidade de seus resultados, há opiniões ainda discordantes de alguns autores que põem em dúvida especialmente o significado das reações de baixos títulos. Já nos referimos a isso na introdução deste trabalho. Não é nossa finalidade estudar aqui tal problema, desde que a literatura a respeito é bastante rica. Queremos apenas lembrar que um dos argumentos lançados em apoio de tais dúvidas é a não confirmação de resultados da reação de Sabin-Feldman por outros métodos sorológicos. Colocam-se, entre os que assim pensam, KELEN³² *et alii* (1962), justamente por terem verificado sensível discordância entre os resultados das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, mormente quando aquela acusava títulos inferiores a 1/1 024. No entanto, nossos resultados mostram concordância das duas reações em quaisquer níveis de títulos. Provavelmente isto traduz maior sensibilidade da reação de imunofluorescência em nossas mãos, decorrente do emprego de conjugados antiglobulina com melhores características, bem como de condições de reação mais adequadas para a interação de antígenos e anticorpos. O argumento de Kelen *et alii* parece estar assim infirmado. A simples concordância entre os resultados de reações de fundamentos aparentemente tão diversos não

constituirá, por si só, garantia de especificidade. Entretanto, a demonstração da especificidade dos resultados de qualquer uma delas aplicar-se-á imediatamente à outra. Recentes pesquisas de FULTON & VOLLER¹⁴ (1964) documentam, pela absorção de soros com antígenos diversos, o valor específico de resultados da reação de imunofluorescência indireta para a toxoplasmose, ainda quando êstes revelam baixos títulos.

Nos casos de comportamento anômalo, descritos em nosso trabalho, poderemos estar diante de anticorpos específicos lábeis, não evidenciáveis na reação de imunofluorescência, talvez por não se tratar de globulinas capazes de reagir com os conjugados utilizados. Mas, a verificação de discordâncias apenas em soros não reagentes na imunofluorescência, desde que a instabilidade de títulos não foi observada em soros que reagiram nas duas provas, leva-nos a suspeitar da existência, em tais soros anômalos, de mecanismo modificador de toxoplasmas diverso daquele intervindo no comum das reações. A Atividade modificadora mediada habitualmente por anticorpos específicos poderia ser desencadeada por elementos outros, talvez relacionados com mecanismos inespecíficos de defesa.

É interessante notar que STADTSBAEDER *et alii*³³ (1964) também ficaram impressionados com a discordância marcante entre resultados negativos da reação de imunofluorescência indireta e reações positivas na prova de Sabin-Feldman, em dois soros, em contraposição ao estreito paralelismo de resultados nos 70 soros reagentes restantes, do grupo de 500 examinados. A divergência era mais chocante porque ocorria também com a reação de fixação do complemento, igualmente negativa, embora tivesse sido sempre positiva em soros com títulos superiores a 1/1 000 na reação de Sabin-Feldman, como encontrado, aliás, nesses dois soros. Stadtsbaeder *et alii* limitaram-se a registrar o fato.

Não encontramos qualquer referência na literatura quanto a diferenças de comportamento de títulos, na reação de Sabin-Feldman, de soros guardados congelados, como por nós observado. Vários pesquisadores reconhecem a existência em soros ditos normais, de fatores modificadores de toxoplasmas, diversos dos anticorpos termoestáveis. Assim, WESTPHAL & MÜHLPFORDT⁶⁰ (1950) encontraram em alta percentagem de soros normais, não inativados, atividade modificado-

ra de toxoplasmas que tendia a aumentar de intensidade com o envelhecimento dos soros, mantidos estéreis à temperatura ambiente por alguns dias. Tal atividade, atribuída à “estrutura coloidal dos soros” (também por eles denominada “Dispersitätsgrad des Serum”), era nitidamente termolábil, desaparecendo inteiramente pela inativação a 56° C. Além disso, era evidenciável somente em soros não diluídos.

JETTMAR²⁸ (1954) descreveu uma “propriedade hostil para toxoplasmas (*Toxoplasmafeindlicher Qualität*),” presente em soros normais, capaz de modificar a coloração dos parasitas. Encontrou títulos de até 1/64 para essa atividade, que se caracterizava tanto pela termolabilidade, inativável em 15 minutos, a 56° C, como pela estabilidade, a 4° C, sendo perfeitamente conservada em soros mantidos em geladeira.

GRÖNROOS²⁴ (1955) retomou as experiências de Jettmar e demonstrou que essa atividade hostil está relacionada, ao menos em parte, com a properdina, inativável a 56° C ou removível pelo “Zimosan”.

Nossas observações parecem orientar-se para um fenômeno totalmente diverso, desde que a atividade modificadora por nós verificada não tem a termolabilidade referida pelos pesquisadores citados e não se conserva em soros congelados a -20°C como acontece para o fator acessório, que Grönroos também identifica, ao menos parcialmente, com a properdina.

Parece-nos, portanto, que ao menos em alguns soros humanos há uma atividade modificadora de toxoplasmas, nas condições da reação de Sabin-Feldman, termorresistente ao menos em parte, em geral muito lábil em soros congelados, desaparecendo dos mesmos em períodos variáveis, provavelmente no mais das vezes em menos de 48 horas, mas podendo permanecer nesses soros excepcionalmente por uma semana ou mesmo mais e que se distingue da atividade modificadora habitualmente encontrada nos soros reagentes não apenas pela labilidade, mas também pela não reatividade na reação de imunofluorescência. Serão necessárias investigações cuidadosas para melhor caracterização do fenômeno; os dados disponíveis permitem apenas afirmar a sua existência e entrever alguns aspectos curiosos como, por exemplo, a presumível maior frequência em soros de crianças.

V — RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho procuramos estudar comparativamente os resultados das reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman em 1 000 soros humanos, bom como expor em minúcias as técnicas utilizadas.

Até hoje a reação de Sabin-Feldman tem sido considerada por muitos como reação padrão para a pesquisa de anticorpos antitoxoplasma, em vista da alta sensibilidade e especificidade de seus resultados. Entretanto, é de execução difícil, o que limita sua divulgação como método sorológico de rotina. As técnicas de realização mais simples, aplicáveis à sorologia da toxoplasmose, como a fixação do complemento e a hemaglutinação, ainda não apresentam níveis de sensibilidade ou de reprodutibilidade que recomendem seu uso, a não ser como complemento da reação de Sabin-Feldman.

A técnica de imunofluorescência indireta, pela facilidade de execução e sensibilidade, surge como nova alternativa no diagnóstico da toxoplasmose.

Na parte I deste trabalho, fizemos revisão da literatura sobre aplicações das técnicas de imunofluorescência ao estudo da toxoplasmose, referindo inclusive nota prévia do autor que, comparando os resultados das reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman, em 140 soros, encontrou grande concordância nas duas provas quanto a soros reagentes e não reagentes.

Na parte II, referimos o material de estudo — 1 000 soros humanos não selecionados — e os métodos utilizados, discutindo ao mesmo tempo os motivos da escolha de alguns deles. Descrevemos minuciosamente as técnicas das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta. Para esta última, estudamos o preparo dos toxoplasmas e das lâminas usadas na reação e, em seguida, analisamos o conjugado antiglobulina humana-isotiocianato de fluoresceína quanto a seus constituintes, soro imune e fluorocromo, e quanto à técnica de preparo. Para a marcação das globulinas imunes preferimos o método da diálise, a fim de se conseguir marcação homogênea das moléculas de anticorpo, procurando afastar colorações inespecíficas, em grande parte decorrentes de marcação excessiva. Descrevemos o estudo das características do conjugado quanto à intensidade da marcação, indicada pelas proporções res-

pectivas de proteínas e de fluorocromo, e quanto às atividades corantes específica e inespecífica.

Na parte III, estudamos a reprodutibilidade da reação de imunofluorescência em 84 soros para, em seguida, compararmos os resultados das duas reações nos 1 000 soros incluídos no trabalho. Houve concordância nos resultados qualitativos, havendo 786 soros reagentes em ambas as provas e 225 não reagentes também em ambas. Nenhum soro negativo na imunofluorescência foi positivo na prova do corante, de Sabin-Feldman. Somente 7 soros, negativos nesta, reagiram na prova da imunofluorescência, mas com títulos de apenas 1/16. Quanto aos resultados quantitativos, houve concordância de títulos, dentro da variação de uma diluição de razão 2 ou 4, em 97,7% dos soros reagentes, os 2,3% restantes mostrando diferenças de duas diluições. Não houve discordância maior do que esta. Em 52,5% dos soros reagentes houve mesmo identidade de títulos. A maioria dos soros com resultados diferentes em ambas as reações apresentou títulos mais elevados na prova de imunofluorescência, (83,7%) e somente nos 16,3% restantes eram mais altos os títulos na reação de Sabin-Feldman. Isto indica, com significância estatística, maior sensibilidade, ainda que ligeira, da reação de imunofluorescência indireta sobre a reação de Sabin-Feldman.

A execução paralela das duas reações permitiu evidenciar, em raros soros, atividade modificadora de toxoplasmas na reação de Sabin-Feldman, com características diversas daquelas já descritas na literatura. Além de corresponder a reações de fluorescência totalmente negativas, tal atividade mostrou-se pouco estável, tendendo rapidamente para a negatividade.

Na parte IV, tecemos considerações sobre o emprêgo da reação de imunofluorescência na rotina sorológica da toxoplasmose e analisamos de maneira sumária o comportamento anômalo de alguns soros, anteriormente referido.

Concluimos que:

1) O estudo comparativo entre as reações da Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta fornece resultados semelhantes, com títulos coincidentes ou apenas pouco mais ele-

vados nesta última. A reação de imunofluorescência pode substituir a reação de Sabin-Feldman e com nítidas vantagens quanto à exequibilidade.

2) A discordância flagrante entre os resultados das duas reações observada em apenas 12 dos 1 000 soros estudados não vem modificar a conclusão acima, não somente pela pequena freqüência com que ocorreu, mas principalmente pelas características anômalas apresentadas. Estas sugerem a existência de atividade modificadora de toxoplasmas de natureza diversa daquela associada aos anticorpos habitualmente encontrados que, além de reagirem de maneira idêntica nas duas reações, mostram-se estáveis em soros congelados.

RESUMO

Compararam-se as reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman para a toxoplasmose, em 1 000 soros humanos. Encontrou-se estreita concordância quanto a reatividade ou não reatividade dos soros. Quanto a títulos, em 97,7% dos 775 soros reagentes verificou-se concordância ou diferenças de somente uma diluição. Nos demais 2,3% de soros reagentes, estas diferenças não excederam de duas diluições. Em raros soros, entretanto, observaram-se divergências entre os resultados, negativos na reação de imunofluorescência e reagentes na de Sabin-Feldman. Porém tal reatividade apresentou-se instável, tendendo a desaparecer rapidamente desses soros, embora mantidos congelados a -20°C , em contraste com a estabilidade de títulos observada habitualmente nos soros reagentes.

Sugere-se a presença de fator modificador de citoplasma, de natureza inespecífica, para os soros de reatividade instável, diverso do fator específico presente no comum dos soros reagentes.

Agradecimentos — Ao Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, a confiança em nós depositada, propiciando-nos ambiente de estudo e pesquisas no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, bem como o estímulo e auxílio constantes na elaboração deste trabalho; ao Prof. Dr. Walter Leser, a assistência na análise dos dados obtidos; aos Drs. Maria P. Deane e José Lopes Netto, as críticas e sugestões apresentadas; ao Sr. Waldomiro Siquei-

ra Jr., a confecção de gráficos e tabelas; aos colegas e técnicos do I.M.T., o estímulo, amizade e auxílio que nos prestaram e à Srta. Hermínia Muzanek, o cuidado e o interesse demonstrados na datilografia deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLDECH, V. & JIRA, J. — Bemerkungen zur Methodik und Auswertung der Komplexbindungsreaktion mit den Toxoplasmaantigenen. Z. Tropenmed. Parasit. 12:385-409, 1961.
2. CAMARGO, M. E. — Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 6:117-118, 1964
3. CAMARGO, M. E. — Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescence serological titrations. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 7:39-40, 1965.
4. CATHIE, J. A. B. — An appraisal of the diagnostic value of the serological tests for toxoplasmosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 51:104-110, 1957.
5. CHADWICK, C. S.; Mc ENTEGART, M. G. & NAIRN, R. C. — Fluorescent protein tracers: a simple alternative to fluorescein. Lancet 1:412-414, 1958.
6. CLARK, H. F. & SHEPARD, C. C. — A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. Virology 20:642-644, 1963.
7. COONS, A. H.; CREECH, H. J. & JONES, R. N. — Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47:200-202, 1941
8. COONS, A. H. & KAPLAN, M. H. — Localization of antigens in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 91:1-13, 1950.
9. CURTAIN, C. C. — Electrophoresis of fluorescent antibody. Nature, 182:1305-1306, 1958.
10. DALLENBACH, F. & PIEKARSKI, G. — Über der Antikörper (Methode nach COONC). Vir-Gewebe mit Hilfe markierter fluoreszierender Antikörper (Methode nach COONS). Virchows Arch. Path. Anat. 333:607-618, 1960.
11. DESMONTS, G. — Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Path. et Biol. 8:109-125, 1960.
12. EMMART, E. W. — Observations on the absorption spectra of fluorescein, fluorescein derivatives and conjugates. Arch. Biochem. 73:1-8, 1958.
13. FROMMHAGEN, L. H. & SPENDLOVE, R. S. — The staining properties of human serum proteins conjugated with purified fluorescein isothiocyanate. J. Immun. 89:124-131, 1962.
14. FULTON, J. D. & VOLLER, A. — Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection of specific Toxoplasma antibodies. Brit. Med. J. 2:1173-1175, 1964.
15. GARIN, J. P. & AMBROISE-THOMAS, P. — Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (technique indirecte). Presse Méd. 71:2485-2488, 1963.
16. GOLDMAN, M. — Observations on some problems encountered in the routine performance of the dye test for toxoplasmosis. J. Clin. Path. 9:55-58, 1956.
17. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. I. The reaction in smears of peritoneal exsudate. J. Exp. Med. 105:549-556, 1957.
18. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. I. The new serologic test for antibodies to Toxoplasma based upon inhibition of specific staining. J. Exp. Med. 105:557-573, 1957.
19. GOLDMAN, M. & CARVER, R. K. — Microfluorimetry of cells stained with fluorescent antibody. Exp. Cell. Res. 23:265-280, 1961.
20. GOLDMAN, M.; GORDON, M. A. & CARVER, R. K. — Comparison of titers of dye and fluorescence-inhibition tests in the serologic diagnosis of toxoplasmosis. Amer. J. Clin. Path. 37:541-550, 1962.
21. GOLDSTEIN, G.; SLIZYS, J. & CHASE, M. W. — Studies on fluorescent antibody staining. I. Non-specific fluorescence with fluorescein coupled sheep antirabbit globulins. J. Exp. Med. 114:89-110, 1961.
22. GOLDWASSER, R. A. & SHEPARD, C. C. — Staining complement and modifications of fluorescent antibody procedures. J. Immunol. 80:122-131, 1958.
23. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-766, 1949.
24. GRÖNROOS, P. — The action of properdin on *Toxoplasma gondii*. Ann. Med. Exp. Fenn. 33:310-315, 1955.
25. HULDT, G. — The dye test and complement fixation test in toxoplasmosis: a comparative investigation. Acta path. microbiol. Scand. 43:141-156, 1958.
26. JACOBS, L. & COOKS, K. — Variations in the dye test for toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. 3:860-867, 1954.
27. JACOBS, L. & LUNDE, M. N. — A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit. 43:308-314, 1957.
28. JETTMAR, H. M. — Zum Nachweis toxoplasmafeindlicher Qualitäten im Menschenserum. Wien Klin. Wschr. 66:276 1954.

CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reacções de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmoze, em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:1-26, 1964.

29. KABAT, E. A. & MEYER, M. M. — Experimental Immunochemistry. 22. Estimation of protein with the Folin-Ciocalteu phenol reagent. Springfield, Charles C. Thomas, c 1961. p. 556-558.
30. KABELITZ, H. J. — Die diagnostische Bedeutung und Klinische Beurteilung der Toxoplasma-Seroreaktionen und des Toxoplasmin-Hauttest. Z. Tropenmed. Parasit. 11: 287-298, 1960.
31. KABELITZ, H. J. — Untersuchungen über unespezifische Mitreaktionen und Titterschwankungen in den Toxoplasma-Seroreaktionen. Klin. Wschr. 38:602-606, 1960.
32. KELEN, A. E.; AYLLON-CLEINDL, L. & LABZOFFSKY, N. A. — Indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. Canad. J. Microbiol. 8:545-554, 1962.
33. KNIERIM, F.; NIEDMAN, G. & THIERMANN, E. — La reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de la toxoplasmosis. Bol. Chil. Parasit. 15:48-50, 1960.
34. KRAMARZH, I. A. — Use of the fluorescent antibody method in the serological diagnosis of toxoplasmosis. Med. Parazit. (Mosk). 32: 454-460, 1963.
35. LACAZ, C. S. — Contribuição para o estudo dos anticorpos bloqueadores através da prova de Coombs, Mourant e Race. São Paulo, 1953. Tese Prof. F.M.U.S.P.
36. LEWIS, V. J. *et alii* — Technical considerations in the preparation of fluorescent antibody conjugates. Appl. Microbiol. 12:343-348, 1964.
37. LEWIS, W. P. & KESSEL, J. F. — Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis. Arch. Ophthalm. 66:471-476, 1961.
38. LUNDE, M. N.; JACOBS, L. & WOOD, R. M. — Comparison of dye and hemagglutination tests on sera of suspected cases of toxoplasmic uveitis. Arch. Ophthalm. 69:10-12, 1962.
39. MCKINNEY, R. M.; SPILLANE, J. T. & PEARCE, G. W. — Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. J. Immunol. 93: 232-242, 1964.
40. MALONEY, E. D. & KAUFMAN, H. E. — The rapid and convenient detection of Toxoplasma antibodies using formaldehyde-treated human erythrocytes. Amer. J. Ophthalm. 50: 945-950, 1960.
41. MANDRAS, A.; VANINI, G. C. & CIARLINI, E. — La reazione di immunofluorescenza per la dimostrazione degli anticorpo contro "*Toxoplasma gondii*". Ig. Mod. 56:636-644, 1962.
42. MARSHALL, J.D.; EVELAND, W.C. & SMITH, C.W. — Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:898-900, 1958.
43. MAYERSBACH, H. & SCHUBERT, G. — Die unespezifischen Reaktionen zwischen markierten Seren und Geweben bei der immunohistologischen Technik. Acta Histochem. 10: 44-82, 1960.
44. MEIRA, J. A. *et alii* — Resultados de reacções sorológicas para o diagnóstico da Toxoplasmoze efetuados com soros de pacientes com protozooses. Hospital 55:691-698, 1959.
45. MITCHELL, R. G. & GREEN, C. A. — The hemagglutination test for Toxoplasma antibodies. J. Clin. Path. 13:331-335, 1960.
46. NICHOLS, R. L. & Mc COMB, D. E. — Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. J. Immun. 89:545-554, 1962.
47. PORTNOY, I. & GARSON, W. — New and improved antigen suspension for rapid reaction in test for syphilis. Pub. Hlth. Rep. 75: 985-988, 1960.
48. REUSS, K. — Untersuchungen zur Hämagglutinationsreaktion auf Toxoplasmoze nach Jacobs und Lunde. Z. Immun. Forsch. 121: 75-90, 1961.
49. RIGGS, J. L. *et alii* — Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. Amer. J. Path. 34:1081-1097, 1958.
50. RUBIN, M. — Studies on Toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. 7:358-364, 1958.
51. RUCKERBAUER, G. M. *et alii* — Toxoplasmosis. I. Studies by the fluorescein-labelled antibody technique. Canad. J. Comp. Med. 27:27-33, 1963.
52. SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. — Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 108:660,663, 1948.
53. STADTBAEDER, S.; TELLIER-VERHEYDEN, N. & WEBER, E. M. — Diagnostic serologique de la toxoplasmoze par l'immunofluorescence. Acta Clin. Belg. 19:161-166, 1964.
54. THALHAMMER, O. — Apud BOZDECH & JIRA, 1: 1961.
55. THIERMANN, E.; KNIERIM, F. & NIEDMANN, G. — Vergleichende Untersuchungen über die Sabin-Feldmanreaktion und den Haemagglutinationstest bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii*. Z. Bakt. Parasikde. 192:230-260, 1964.
56. VAN SOESTBERGEN, A. A. 1956 — Apud VAN THIEL, 1958.
57. VAN SOESTBERGEN, A. A. — The titration of toxoplasma antibody. J. Hyg. (Lond.) 60:333-339, 1962.
58. VAN THIEL, P. H. — Das Problem der Spezifität des Sabin-Feldman Farbtestes. Antonie v. Leeuwenhoek. 24:113-133, 1958.

CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1.000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:1-26, 1964.

59. WELLER, T. H. & COONS, A. H. — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 86:789-794, 1954.
60. WESTPHAL, A. & MÜHLPFORDT, H. — Untersuchungen über wesen und fehlerquellen des Toxoplasmose-Serofarbtstes nach Sabin und Feldman. Z. Hyg. Infekt. Kr. 131:423-439, 1950.
61. WITTMER, R.; ROTH, W. & FAORO, N. — Die Toxoplasmose-Haemagglutination. Ophthalmologica (Basel) 141:402-409, 1961.
62. ZARDI, O. — Gli anticorpi fluorescenti nella diagnostica per la Toxoplasmosi. Nuovi Ann. Ig. 14:585-612, 1963.

Recebido para publicação em 1 de setembro de 1965.

GRUPO PROVIDENCIA PREVALÊNCIA DOS BIOGRUPOS EM SÃO PAULO, BRASIL

PROVIDENCIA GROUP. PREVALENCE OF BIOGROUPS IN
SÃO PAULO, BRAZIL⁽¹⁾

ETTORE RUGAI⁽²⁾
RACHEL TEIXEIRA RUGAI⁽²⁾

SUMMARY

A biochemical classification was carried out on 113 samples of *Providencia* isolated in São Paulo, Brazil.

It was found that 112 of them belonged to the bio-group I and only one to the bio-group II, what shows that group I is strongly predominant in São Paulo, according to the results of this research.

INTRODUÇÃO

EWING, TANNER & DENNARD¹ dividiram o grupo *Providencia* em dois biogrupos, baseados no comportamento com a inosita, adonita e glicose, de acordo com o quadro I:

QUADRO I

Sub-Grupos	Glicose	Inosita	Adonita
I	Ag	—	A
II	A	A	—

A — ácido
Ag — ácido e gás

Essa classificação foi adotada pela Sub-comissão Internacional de Enterobactérias².

Nosso trabalho obedece ao mesmo critério.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS — Empregamos 113 amostras de germes colhidas na Seção de Bacte-

riologia do Instituto Adolfo Lutz, durante os anos 1962-1964, sendo a maioria proveniente da Capital.

IDENTIFICAÇÃO — As amostras foram classificadas bioquimicamente pelos seguintes meios de diagnóstico:

Indol — Água peptonada e reativo de Erlich.

L-aminoácido desaminase — Método de SINGER & VOCANI³ e método por nós descrito⁴ (página 30 deste volume).

V. P. e *V. M.* (vermelho de metila) — Meio de Clark & Lubs.

Fermentação de carboidratos — Meio semi-sólido com fenol vermelho, em tubo com rólha parafinada e observação, durante 20 dias, a 37° C. Com a inosita foi feita a observação também a 30° C.

Urease — Meio de Christensen.

H₂S — Meio com gelatina e cloreto ferroso, recomendado por LE MINOR⁵.

(1) Trabalho realizado na Seção de Meios de Cultura da Diretoria dos Serviços Técnicos e Auxiliares do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

KCN e *malonato* — Meios recomendados pela Subcomissão Internacional de Enterobactérias².

Citrato — Meio de Simmons.

Mobilidade — Água peptonada em temperatura ambiente.

RESULTADOS

Comportamento bioquímico das amostras

Tôdas as amostras deram reação positiva para indol, l-aminoácido desaminase, V.M., sacarose, citrato (Simmons), KCN e apresentaram odor característico; apresentaram reação negativa para urease, lactose, H₂S, malonato. V.P., dulcita, salicina e gelatina.

Em relação á adonita, inosita, gás em glicose, manita e mobilidade, as amostras não apresentaram uniformidade.

Com relação à inosita, adonita e gás em glicose, base para a classificação dos sub-grupos bioquímicos, o comportamento está expresso no quadro II.

QUADRO II

N.º de Amostras	Glicose	Adonita	Inosita
100	Ag	A	—
12	A	A	—
1	A	—	A

A — ácido
Ag — ácido e gás

De acôrdo com êsse comportamento, as amostras distribuíram-se da seguinte maneira:

Subgrupo I 112 amostras

Subgrupo II 1 amostra

Cem amostras do Sub-grupo I deram reações típicas do biogrupo e 12 amostras foram anaerogênicas.

A amostra do Sub-grupo II deu reações típicas do biogrupo.

A produção de gás em glicose, pelo Sub-grupo I, não é primordial, conforme os trabalhos de Tanner & Dennard.

Para o biogrupo II, entretanto, a ausência de gás é obrigatória.

CONCLUSÕES

Em São Paulo, predomina quase exclusivamente o biogrupo I. Ewing, Tanner & Denard, estudando 611 amostras, encontram 86,5% de predominância do biogrupo I.

SINGER e BAR-CHAY⁶, estudando 86 amostras, encontraram 100% de predominância do biogrupo II.

RESUMO

Foi feita classificação bioquímica de 113 amostras de *Providencia* isoladas em São Paulo, Brasil. Enquadraram-se no biogrupo I 112 amostras e apenas uma amostra no biogrupo II. O subgrupo I tem predominância quase absoluta em S. Paulo de acôrdo com os dados colhidos para o nosso trabalho.

Agradecimentos — Agradecemos ao Dr. Augusto E. Taunay, às Sras. Maria José Faraco, Amair Araujo, Ethel Sandoval Peixoto e Neusa Brandani Fonseca pela colaboração que nos deram na elaboração dêste trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EWING, W. H., TANNER, K. E. & DENNARD, D.A. — The Providence group: an intermediate group of enteric bacteria. J. Infect. Dis. 94:134-140, 1954.
2. Report of the Enterobacteriaceae Subcommittee of the nomenclature committee of the International Association of Microbiological Societies. International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy 8(1): 25-70, 1958.
3. SINGER, J. & VOLCANI, B. E. — An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus-Providencia* group from other enterobacteriaceae. J. Bact. 69:303-306, 1955.
4. RUGAI, E. & RUGAI, R. — Meio de cultura para diferenciar o grupo *Proteus* e *Providencia* de outras enterobactérias pelo l-triptofano desaminase. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24: 29-32, 1966.
5. LE MINOR, L. — Le diagnostic de laboratoire des entérobactéries. 2. ed. St. Mandé Seine). Tourelle, 1962. p. 148.
6. SINGER, J. & BAR-CHAY, J. — Biochemical investigation of *Providencia* strains and their relationship to the *Proteus* group. J. Hyg. 52(1):1-8, 1954.

Recebido para publicação em 30-12-64.

**MEIO DE CULTURA PARA DIFERENCIAR O GRUPO *PROTEUS* E
PROVIDENCIA DE OUTRAS ENTEROBACTÉRIAS PELA
L-TRIPTÓFANO DESAMINASE (1)**

CULTURE MEDIUM FOR DIFFERENTIATION OF *PROTEUS* AND
PROVIDENCIA GROUPS FROM OTHER ENTEROBACTERIA BY
THE L-TRYPTOPHAN DESAMINASE

ETTORE RUGAI (2)
RAGHEL TEIXEIRA RUGAI (2)

SUMMARY

A culture medium with l-tryptophan was studied in order to differentiate the groups *Proteus* and *Providencia* from other enterobacteriaceae. By testing 642 samples of microorganisms using this culture medium both groups *Proteus* and *Providencia* developed a yellow-brownish colour after 18 hrs. of incubation at 37°C.

The enterobacteriaceae of other groups determines no change upon the culture medium.

The reliability of this method was proved by comparing with the Singer & Volcani technique giving the following results: 144 samples of *Proteus* and 113 of *Providencia* gave positive desaminase reaction with both techniques; 385 samples of enterobacteriaceae of other groups showed negative desaminase reaction with both techniques. Twenty one (21) samples of *Serratia* showed negative reaction with the Singer & Volcani method and a faint positive reaction with the studied technique. Such a faint reaction can be considered as negative for desaminase.

The technique proved to be sensitive and specific.

INTRODUÇÃO

A produção de cetoácidos a partir de l-aminoácidos, como característica dos grupos *Proteus* e *Providencia*, já foi consagrada como de grande valor taxionômico. Para o grupo *Proteus*, é superior à prova da urease.

A fenilalanina e o l-triptófano são os aminoácidos mais úteis pela cor intensa que desenvolvem os respectivos cetoácidos quando tratados por um sal de ferro.

Vários métodos foram descritos para pesquisar esses cetoácidos^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}. Todos

esses métodos dependem da adição ulterior de um reativo ao meio de cultura ou à emulsão do germe. EDWARDS & EWING⁹ descreveram um meio de cultura que encerra dl-fenilalanina e ferro, permitindo a leitura direta após 2-6 horas de incubação. Entretanto, com incubação mais prolongada, a especificidade fica prejudicada.

Na técnica que estudamos, o meio de cultura dá reação direta com 18 horas e mantém a especificidade após muitos dias de incubação.

(1) Trabalho realizado na Seção de Meios de Cultura da Diretoria dos Serviços Técnicos e Auxiliares do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio de cultura

Triptona (1)	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato dissódico anídrico	2 g
L-triptófano (2)	1 g
Ágar (3)	15 g
Água destilada q.s.	1 000 ml
pH. 7,4	

Dissolver a peptona, o cloreto de sódio e o fosfato dissódico em 800 ml de água. Adicionar o ágar e ferver para dissolvê-lo. Completar até um litro e ajustar o pH a 7,4. Adicionar o triptófano e distribuir 3 ml em tubos de 12 x 120 mm. Esterilizar a 120° C, durante 20 minutos. Inclinare para solidificar com pouca base. Controlar a esterilidade.

Semeadura — Semear em tôda a superfície e incubar a 35-37° C.

Leitura — Pode ser feita desde de 18 horas de incubação. As bactérias desaminase positivas desenvolvem coloração amarelo-acastanhada, na parte inclinada. A base permanece inalterada. As bactérias desaminase negativas não alteram o meio ou o fazem de maneira insignificante.

Germes utilizados — Na prova de eficiência do meio, foram utilizadas as seguintes amostras: *Arizona* 2, *Cloaca* 51, *Serratia* 21, *Shigella* 48, provenientes da coleção de culturas deste Instituto; *Shigella* 59, classificada sorolôgicamente pelo Dr. Augusto E. Taunay; *Citrobacter* 24, *Escherichia* 62, *Proteus* 144 e *Providencia* 113 classificadas bioquimicamente (vide rodapé pág. 31) por nós.

RESULTADOS

O estudo foi feito comparativamente com a técnica de SINGER & VOLCANI², conforme demonstração do quadro seguinte:

Comparação entre a técnica em estudo e a técnica de Singer & Volcani²

Enterobactérias	n.º de amostras	Técnica em estudo		Técnica de Singer & Volcani	
		Reação Positiva	Reação Negativa	Reação Positiva	Reação Negativa
Arizona	2	0	2	0	2
Citrobacter	24	0	24	0	24
Cloaca	51	0	51	0	51
Escherichia	62	0	62	0	62
Klebsiella	74	0	74	0	74
Proteus	144	144	0	144	0
Providencia	113	113	0	113	0
Salmonella	44	0	44	0	44
Serratia	21	0	21	0	21
Shigella	107	0	107	0	107
Totais	642	257	385	257	385

(1) Difco ou Oxoid ou similar.

(2) Ou dl-triptófano . . . 2 g.

(3) Difco ou Oxoid ou similar.

CONCLUSÕES

A técnica em estudo demonstrou sensibilidade e especificidade que permitem seu emprêgo com segurança.

A reação deve-se provávelmente à formação do cetoácido 3-indol-pirúvico que se oxida em presença do oxigênio do ar, produzindo a substância colorida.

RESUMO

Foi estudado um meio de cultura com a l-triptófano para diferenciar os grupos *Proteus* e *Providencia* de outras enterobactérias, empregando-se 642 amostras de germes. Neste meio de cultura os grupos *Proteus* e *Providencia* desenvolvem coloração amarelo-acastanhada após 18 horas de incubação. As enterobactérias de outros grupos não alteram o meio. A avaliação deste método foi feita pela comparação com a técnica de Singer & Volcani, com os seguintes resultados: 144 amostras de *Proteus* e 113 de *Providencia* deram reação de desaminase positiva com ambas as técnicas. As amostras de enterobactérias de outros grupos, num total de 385, deram reação de desaminase negativa com ambas as técnicas, sendo que 21 amostras de *Serratia* deram reação negativa com a técnica de Singer & Volcani e levíssima reação positiva com a técnica em estudo, não apresentando dificuldades para considerá-la como de desaminase negativa. A técnica mostrou-se sensível e específica.

Agradecimentos — Agradecemos ao Dr. Augusto E. Taunay que nos franqueou a Secção de Bacteriologia para a colheita de amostras de enterobactérias e às Senhoras Maria José Faraco, Filomena Magaldi Jordão, Amair Araujo, Etel Sandoval Peixoto, Neuza Brandani Fonseca e aos funcionários da Secção de Meios de Cultura e Esterilização, pelo auxílio que nos prestaram na elaboração deste trabalho.

Técnicas utilizadas: *Indol* — água peptonada e reativo de Erlich. *l-aminoácido desaminase* — método de Singer & Volcani² e método por nós descrito¹⁰ na pág. 30 deste vol. *V.P.* e *V.M.* (vermelho de metila) meio de Clark & Lubs. *Fermentação de carboidratos* — meio semi-sólido com fenol vermelho, em tubo com rôlha parafinada e observação durante 20 dias, a 37°C. Com inosita foi feita a observação também a 30°C, com resulta do idêntico ao resultado a 37°C. *Urease* — meio de Christensen. *H₂S* — meio com gelatina e clorô to ferroso, recomendado por LE MINOR, L.¹². *KCN* e *malonato* — meios recomendados pela Subcomissão Internacional de Enterobactérias¹¹. *Citrato* — meio de Simmons. *Mobilidade* — água peptonada, em temperatura ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. HENRIKSEN, S. D. — A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and urease test in the differentiation of *Proteus* from other enteric organism. J. Bact. 60:225-231, 1950.
2. SINGER, J. & VOLCANI, B. E. — An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus-Providencia* group from other Enterobacteriaceae. J. Bact. 69:303-306, 1955.
3. SHAW, C. & CLARKE, P. H. — Biochemical classification of *Proteus* and *Providencia* Cultures. J. Gen. Microbiol. 13(1): 155-161, 1955.
4. BUTTIAUX, R., MORIAMEZ, J. & PAPA-VASSILLIHO, J. — Method simplifiée d'identification des Enterobacteriaceae n'attaquant pas rapidement la lactose. Ann. Inst. Pasteur. 90:133-143, 1956.
5. HAMIDA, F. B. & LE MINOR, L. — Une méthode rapide de recherche de la transformation de la L-phényl-alanine en acide phénylpyruvique. Ann. Inst. Pasteur. 90: 671-673, 1956.
6. FALKOW, S. — A screening method for enteric organisms, using a ferric chloride test. Am. J. Clin. Path. 28:99-102, 1957.
7. STEWART, D. J. — The phenylalanine test on Kligler's iron agar for the identification of *Proteus*. Nature (London) 183:1537-38, 1959.
8. BACHRACH, V. — A simple and rapid technique for the identification of *Proteus-Providencia* strains. J. Clin. Path. 13:525-526, 1960.
9. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — Identification of Enterobacteriaceae. 2.* ed. Minneapolis, Burgess Publ., c1962.p.252-253.
10. RUGAI, E. & RUGAI, R. T. — Grupo *Providencia*: Prevalência dos biogrupos em S. Paulo, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 24: 27-28, 1964.
11. Report of the Enterobacteriaceae Subcommittee of the International Association of Microbiological Societies. Internationale Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy 8(1): 25-70, 1958.
12. LE MINOR, L. — Le diagnostic de laboratoire des entérobactéries. 2e. ed. St. Mandé (Seine), Tourelle, 1962. p. 148.

Recebido para publicação em 30-12-64.



OBSERVAÇÕES SÔBRE O EMPRÊGO DO CARBONATO DE BÁRIO COMO PLANORBICIDA (1)

NOTES ON THE USE OF BARIUM CARBONATE AS A PLANORBICID

LUIZ DOS SANTOS (2)

SUMMARY

It was studied the planorbicidal effect of barium carbonate upon snails (*Biomphalaria tenagophilus*) subjected to different times of exposure to the drug and its residual effect on the algae, fishes, mice and guinea-pigs. After being exposed to the drug for 24 hours, 268 out of 500 snails (53,6%) were dead; the death rate increased progressively to 70,4%, 85,4% and 87% and within 48 hours all the planorbids were dead. The residual effect of the drug was evidenced by the death of 100 planorbids, after 72 hours, left in contact with the residual barium carbonate left in the aquarium. Mice and guinea-pigs which were given orally only a solution of barium carbonate, and some fishes, protozoa, algae and plants tested, were not affected by it. It is suggested barium carbonate as a molluscicid, in the dosage of 150 p.p.m, with 48 hours of direct contact.

INTRODUÇÃO

Tendo verificado a utilidade do clorêto de bário como moluscocida¹, resolvemos verificar também a ação do carbonato de bário, já referida por DESCHIENS, AYAD & CORROLER² que, entretanto, não fornecem, em seu artigo, dados seguros sôbre como foi empregado, qual a dosagem utilizada e em que condições foram feitas as suas experiências.

Nosso trabalho visou em primeiro lugar testar, em condições estabelecidas em laboratório, o efeito letal do carbonato de bário sôbre os planorbídeos (*Biomphalaria tenagophilus*) transmissores da esquistossomíase mansônica em tôda a região do Vale do Paraíba (Estado de São Paulo). Procuramos observar, também, sua ação sôbre a fauna e a flora aquáticas e o seu efeito residual e possivelmente seletivo sôbre os caramujos.

MATERIAL E MÉTODOS

As experiências foram feitas em dois tanques de cimento do mesmo tamanho e preparados de maneira igual, sendo um deles utilizado como aquário de prova e o outro apenas para contrôlo da experimentação.

A capacidade dos tanques, depois de preparados com uma camada de terra de aproximadamente 5 cm, era de 440 litros. Suas dimensões eram: comprimento, 1,47 m; largura, 0,88 m; altura do nível de água, 0,34 m.

Em cada aquário colocamos alguns ramos de hidrocaritácea (*Elodea canadensis*) e ainda algumas fôlhas de *Eichhornia crassipes*, repletas de cápsulas ovíferas de caramujos, alguns peixes, sendo 3 tilapias (*Tilapia melanopleura*), 1 mandi (*Pimelodella brasiliensis*), 3 guarus (*Phalloceros caudamaculatus*) e, finalmente, 500 planorbídeos (*Biomphalaria tenagophilus*) jovens e adultos.

(1) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Taubaté).

(2) Do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Regional de Taubaté).

À vista dos resultados obtidos em nosso trabalho anterior¹, com o clorêto de bário, resolvemos empregar nestas experiências iniciais, com o carbonato de bário, apenas a concentração de 150 p.p.m., fazendo variar, no entanto, os tempos de contacto dos caramujos com a droga, que foram de 24, 48 e 72 horas.

Com a finalidade de testar o efeito letal de carbonato de bário sobre alguns animais, efetuamos também observações de sua ação sobre peixes e mamíferos (cobaias e camundongos).

Amostras de água de ambos os tanques foram sempre coletadas, antes e depois da colocação do planorbicida. Eram examinadas ao microscópio para observação e identificação de sua microfauna e flora e para avaliar de seu comportamento após a adição do carbonato de bário à água dos aquários.

RESULTADOS

Experiência n.º 1 — Carbonato de bário, 150 p.p.m. — 24 horas.

Empregamos inicialmente o carbonato de bário na concentração de 150 p.p.m., deixando os caramujos em contacto direto com a droga, durante 24 horas.

As amostras de água, colhidas antes da coloração do moluscocida, permitiram-nos assinalar a presença de vários protozoários (*Stentor*, *Paramecium*, *Dilopus*, *Euplotes*, *Stylonychia*), numerosas algas diatomáceas, clorofícias e do grupo das conjugadas, além de alguns microcrustáceos (*Cyclops*, *Cypris* e *Daphnia*) e larvas de nematóides e de insetos (*Culex*).

A seguir, colocamos no tanque de prova quantidade suficiente de carbonato de bário

(66 gr) para se obter uma concentração de 150 p.p.m.

Para a colocação do carbonato de bário no tanque, a substância era pesada e depois colocada em gaze dobrada quatro vezes e amarrada com um cordão, formando um pequeno saco; êste, seguro pelo cordão, era arrastado em diversas direções, por toda a superfície do tanque. Conseguimos, dêste modo, obter uma dispersão mais ou menos homogênea do moluscocida. Após 24 horas, colhemos amostras de água dêste tanque para dosagem colorimétrica do teor de carbonato de bário, empregando o método de SAULNIER & DESCHIENS³, e para a observação da fauna e flora aquáticas.

A dosagem do bário, feita pelo método de comparação colorimétrica, acusou apenas 100 p.p.m. Isto se deve provavelmente à sedimentação e infiltração do clorêto de bário na lama do fundo do tanque e, ainda, segundo Deschiens, à combinação com o gás carbônico da água e sua posterior transformação em bicarbonato de bário, que é solúvel, de acôrdo com a seguinte reação: $\text{Co}_3\text{Ba} + \text{Co}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ba}(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ba}$.

Em seguida, o tanque foi esvasiado para a coleta dos caramujos. Dêste modo, pudemos recolhê-los sobre a lama ou nela enterados. Os planorbídeos foram então colocados em um cristilizador grande com água limpa, a fim de se contarem os vivos e os mortos.

Foram recolhidos 232 caramujos vivos e 268 mortos, após as 24 horas de contacto direto com a droga, com a taxa de letalidade de 53,6%.

Os planorbídeos vivos foram colocados em água limpa, que era renovada diariamente.

Taxas de letalidade e sobrevivência de caramujos submetidos ao contacto de 24 horas com carbonato de bário (150 p.p.m.)

Planorbídeos (500 exemplares)	Em contacto com carbonato de bário		Em água limpa, renovada diariamente					
	Após 24 h		Após 48 h		Após 72 h		Após 96 h	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
Mortos	268	53,6	352	70,4	427	85,4	435	87,0
Vivos	232	46,4	148	29,6	73	14,6	65	13,0

Após 96 h, não mais morreram caramujos. Os peixes do aquário nada sofreram.

Pode-se observar, portanto, o acentuado efeito residual do carbonato de bário, sendo o seu efeito letal, nas condições da experiência, seletivo para os planorbídeos, o que foi verificado pelo exame da água do tanque após 24 h da adição do carbonato de bário, que não revelou a supressão e nem mesmo diminuição dos microrganismos anteriormente citados, bem como nada sofreu a planta *Elodea canadensis*.

No aquário controle não houve caramujos mortos.

Experiência n.º 2 — Carbonato de bário, 150 p.p.m. — 48 horas:

Para esta experiência, utilizamos o mesmo processo anterior. No tanque de prova, com capacidade para 440 litros, foram colocados 16 moluscos — *Prosobranchia* (*Ampullariidae*, *Ampullaria* sp.) e 500 planorbídeos da espécie *Biomphalaria tenagophilus* todos adultos, além de vários peixes: 3 tilapias (*Tilapia melanopleura*) 3 guarús (*Phalacroceros caudamaculatus*) 1 mandi (*Pimelodella brasiliensis*) já utilizados na experiência anterior.

Decorridas 24 h, colhemos amostras da água do aquário, para o cálculo da dosagem do bário, feita pelo método de Saulnier & Deschiens. Tal como já havíamos observado antes, encontramos diferenças entre a dosagem calculada e a dosagem existente. De fato, a taxa de bário foi de 75 p.p.m. para a amostra colhida na superfície e 100 p.p.m. para a amostra do fundo do tanque, após a agitação da água.

Os peixes e plantas da água (*Elodea canadensis*) encontravam-se normais e em boas condições de vida. Após as 48 h de contato direto dos planorbídeos com o CO_3Ba , o tanque foi esvasiado para a avaliação dos resultados.

Todos os 500 caramujos anteriormente colocados no tanque estavam mortos. A taxa de letalidade foi, portanto, de 100% para os planorbídeos.

Das 16 ampulárias, 8 estavam mortas (50%) e 8 estavam vivas (50%). Estas foram colocadas em água limpa que era renovada diariamente. Após 72 h, em água

limpa, morreram mais 5 ampulárias. Ficaram vivas, portanto, apenas três. Assim, para estes moluscos, a taxa de letalidade foi de 81,2%. Entretanto, todos os peixes e plantas da água apresentavam-se normais.

O exame da água revelou a presença de numerosos protozoários, algas e microcrustáceos todos vivos e movimentando-se naturalmente.

Experiência n.º 3 — Poder residual do CO_3Ba

Após 3 dias da experiência anterior, efetuamos nova experimentação com a finalidade de testar o poder residual do carbonato de bário.

O tanque foi esvasiado e a água renovada, sendo mantida no fundo a camada de lama originalmente usada. O volume de água no tanque foi de cerca de 220 litros, ou seja, a metade da sua capacidade total. Não se adicionou qualquer quantidade de carbonato de bário à água.

A seguir, colocamos no aquário 100 caramujos (*Biomphalaria tenagophilus*) adultos.

Depois de 3 dias (72 h), o tanque foi esvasiado para a coleta dos caramujos. A dosagem de uma amostra de água acusou uma taxa de carbonato de bário de 85 p.p.m. Isto indica, portanto, que houvera precedentemente infiltração de bário na lama do fundo do tanque, pois não havíamos adicionado qualquer quantidade de moluscocida à água do tanque. Todos os 100 caramujos submetidos à experimentação estavam mortos. A taxa de letalidade foi, portanto, de 100%.

Esta experiência permite-nos constatar o forte poder residual do carbonato de bário, pois os planorbídeos foram mortos apenas pela ação da droga que se depositou na lama do fundo do tanque, uma vez que a água tinha sido totalmente renovada.

Experiência n.º 4 — Ação sobre mamíferos e peixes

Ao lado da experimentação da droga como moluscocida, efetuamos também a verificação de sua ação sobre peixes e alguns mamíferos (roedores) usados em laboratório.

Desta forma, utilizamos 3 camundongos aos quais demos de beber exclusivamente, durante 13 dias, uma solução de carbonato de bário (300 p.p.m.). Os animais, após o término da experiência, apresentavam-se normais, alimentando-se perfeitamente.

Concomitantemente, efetuamos o mesmo tipo de experiência com 4 cobaias adultos, aos quais demos de beber, durante 10 dias, apenas uma solução de carbonato de bário (300 p.p.m.). Após esse tempo, verificamos que os animais apresentavam-se bem, sem qualquer sintoma anormal.

Experimentação feita com os peixes (7 exemplares, dos quais 3 tilápias — *Tilapia melanopleura*, 1 mandi — *Pimelodella brasiliensis*, e 3 guarus — *Phalloceros caudamaculatus*) que ficaram durante 10 dias no tanque com solução de carbonato de bário 150 p.p.m., mostrou nada terem sofrido, continuando a movimentar-se e alimentar-se normalmente.

DISCUÇÃO E CONCLUSÕES

Destas experiências, podemos tirar algumas conclusões alentadoras. O carbonato de bário revelou-se um excelente planorbicida, quando usado na concentração de 150 p.p.m. O tempo de contacto com a droga, no entanto, tem influência, pois verificamos que a taxa de letalidade foi de 87% quando os caramujos permaneceram 24 horas em contacto direto com o moluscocida e de 100% quando permaneceram 48 horas no tanque com CO_3Ba , à mesma concentração.

É digno de registro também o forte efeito residual demonstrado pelo carbonato de bário, pois a taxa inicial de letalidade, que foi de 53,6% nas primeiras 24 horas de contacto, elevou-se gradativamente nas horas seguintes, mesmo com os caramujos colocados em água limpa e renovada, até atingir os 87% finais (vide quadro, pg. 34).

Focou comprovado ainda que, nas condições das experiências efetuadas, o carbonato de bário é um moluscocida de ação seletiva. De fato, o exame da água dos tanques, antes e após a colocação desse sal, não evidenciou diminuição ou supressão de qualquer espécie do plancto aquático. A ação letal foi exclusiva sobre os caramujos. Nem mesmo as plantas de organização superior, como as salvinias e elódeas, sofreram qualquer dano. A observação, ao

microscópio, das algas e das elódeas mostrou que se encontravam normais e com os cloroplastos perfeitos, apresentando, nas últimas, movimentos de ciclose. Assinala-se, ainda, que os peixes e mamíferos testados também nada sofreram sob a ação do CO_3Ba .

Este fato e mais a ótima ação letal sobre os caramujos permitem-nos sugerir o carbonato de bário como um dos mais promissôres moluscocidas a ser empregado pelo homem na sua luta contra a esquistossomose.

Realmente, quase todos os moluscocidas ainda em uso são altamente tóxicos, para moluscos, mas também o são para algas, plantas, peixes, aves e mamíferos. Isto, portanto, torna difícil o seu emprego em focos abertos, onde se não pode fazer um controle das águas, ainda mais com a possibilidade de causar dano a animais domésticos, peixes utilizados na alimentação, plantas de cultura ou mesmo crianças.

Em artigo posterior serão referidas pesquisas de campo, em focos de planorbídeos que confirmaram as presentes observações em laboratório.

RESUMO

É estudado o efeito do carbonato de bário sobre caramujos (*Biomphalaria tenagophila*), empregando-se diferentes períodos de contacto. É também estudado o seu efeito residual, bem como sua ação sobre algumas plantas, peixes e animais. Após 24 horas de contacto com a droga, foi verificada a morte de 268 (53,6%) dos 500 caramujos submetidos à experimentação, e o aumento progressivo da porcentagem de mortalidade nas horas subsequentes. Com 48 horas de contacto direto, todos os caramujos estavam mortos. Foi evidenciado o efeito residual do carbonato de bário deixado nos tanques de experiência. Camundonos e cobaias, aos quais foi administrada apenas a droga em solução, e alguns peixes, protozoários, algas e plantas superiores não foram afetados. É sugerido o carbonato de bário como moluscocida, na dose 150 p.p.m. e com períodos de contacto de 48 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SANTOS, L., BRANDÃO, C. S. H. & CALAZANS, S. C. — Observações sobre o emprê-

SANTOS, L. — Observações sobre o emprego do carbonato de bário como planorbicida. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:33-37, 1964.

- go do cloreto de bário como planorbicida. I. A. L. — Boletim do Instituto Adolfo Lutz 2(1): 32-36, 1962.
2. DESCHIENS, R., AYAD, N. & LE CORROL-
LER, Y. — Molluscicides à action élective
et mulluscicides de contact dans la pro-
phylaxie des bilharzioses. Organization Mon-
diale de la Santé, Comité d'Experts de la
Bilharziose (Molluscicides). Genève, 26 sep-
tembre — 1^{er} octobre 1960 (WHO/Bilharz/59:
12 septembre 1960).
 3. SAULNIER, J. & DESCHIENS, R. — Appré-
ciation colorimétrique des doses de chlorure
de baryum dissoutes dans les eaux douces
(actions molluscicides en prophylaxie bilhar-
zienne). Bull. Soc. Path. Exot. 53(5):802-806,
1960.
 4. DESCHIENS, R. & TAHIRI, M. — Dispositif
pratique pour la appréciation colorimétrique
dans les eaux douces des doses de chlorure
de baryum utilisées en action molluscicide
dans la prophylaxie Bilharziens. Bull. Soc.
Path. Exot. 54(2):184-187, 1961.

REAÇÃO DE SCHLÖR PARA DIAGNÓSTICO DA GRAVIDEZ. FIXAÇÃO DO COMPOSTO RÓSEO EM PAPEL DE FILTRO (1)

SCHLÖR REACTION FOR PREGNANCY DIAGNOSTIC. FIXATION OF THE
PINK COMPOUND ON FILTER PAPER

ETTORE RUGAI (2)
RACHEL T. RUGAI (2)

SUMMARY

It was described a technique for fixation on Whatman n.º 3MM filter paper of the pink colour compound formed by treating urine of pregnant women with iodine for the Schlör reaction.

It was shown that the Whatman paper strongly fixes the compound thus increasing the sensibility of the reaction but the specificity decreases. Since the sensibility was increased through its fixation on paper it was possible to show that the substance responsible for the reaction is present not only in the urine of pregnant women but also in urines of non pregnant women, men and children of both sexes.

By carrying out the regular Schlör reaction and the technique here presented on 104 urine samples of women suspected of being pregnant and comparing the results of both with the Galli-Mainini's test it was found no agreement between them and false positives with both regular Schlör reaction and the technique above described.

It was shown as well that the substance responsible for it is increased during pregnancy, although sometimes even in its absence.

INTRODUÇÃO

A reação de Schlör¹, para diagnóstico da gravidez, tem despertado, pela sua simplicidade, grande interesse entre os pesquisadores do assunto, resultando a publicação de numerosos trabalhos de repetição com a técnica original^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10}, e outros, com modificações pelo emprêgo de amido^{11, 21, 13, 14, e 15}. Esses trabalhos porém são controvertidos quanto às conclusões.

A simplicidade, rapidez e economia do método despertaram nosso interesse para o presente trabalho.

Em virtude da fugacidade da reação corada, a leitura nem sempre pode ser feita com precisão, motivo pelo qual procuramos

desenvolver um processo para sua fixação, o que foi obtido pelo emprêgo de papel de filtro, de algodão hidrófilo e de lã. Demos preferência ao papel de filtro pela constância dos resultados obtidos, pela facilidade de manuseio e por permitir mais fácil comparação com o padrão.

O estudo foi feito comparativamente com a reação de Schlör original e com a prova de Galli-Mainini¹⁶. Foram também feitas provas para determinar algumas propriedades do composto responsável pela cor fixada pelo papel, assim como para determinar se a adrenalina e a noradrenalina são as responsáveis por essa cor, conforme o trabalho de BERTONE¹⁵.

(1) Da Secção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Da Diretoria de Serviços Técnicos e Auxiliares do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Urina

Urina de primeira micção matutina, recente, ajustada ao pH 5,5 — 5,8, com ácido acético a 10%.

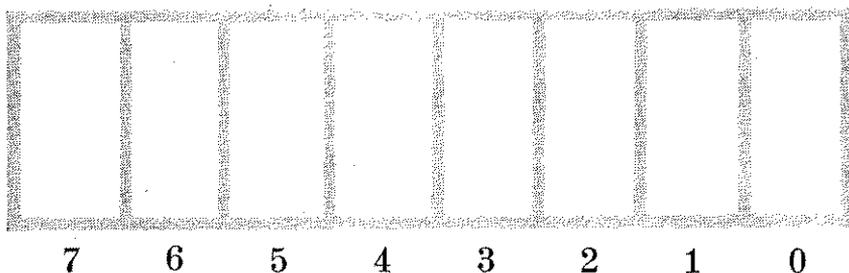
Técnica utilizada

1. Reagentes

- | | | | |
|------------|---|----------------------|--------|
| a) Reativo | { | Iôdo | 5 g |
| | | Iodeto de potássio . | 10 g |
| | | Água destilada q.s. | 100 ml |
- b) Fixador — Papel Whatman n.º 3MM, em tiras de 1,5 x 4,0 cm.
- c) Solução de fosfato monopotássico a 10%

2. Padrão

Fazer uma solução de fucsina básica a 1 p. 1000 em água destilada. Colocar em uma estante 8 tubos de 20 mm de diâmetro. Adicionar ao 1.º tubo 19 ml de urina citrina de homem ou mulher, filtrada, e nos tubos seguintes, 10 ml da mesma urina. Adicionar ao 1.º tubo 1 ml da solução de fucsina e passar sucessivamente 10 ml da mistura, do 1.º ao 7.º tubo. Desprezar os últimos 10 ml. O 8.º tubo conterá urina pura. Em cada tubo colocar uma tira de papel Whatman. Deixar em contacto durante 24 horas, ao abrigo da luz direta. Esgotar o líquido e lavar três vezes com água destilada. Retirar os papéis, secá-los com papel filtro e terminar a secagem ao ar e ao abrigo da luz direta. Numerar os papéis de 7 a 0, a começar da concentração mais forte, conforme o seguinte padrão:



3. Técnica da reação

- Urina com pH 5,5 — 5,8 10,0 ml
 Reativo 0,6 ml
 Papel Whatman n.º 3MM uma tira

Colocar a urina em um tubo de 20 mm de diâmetro e adicionar o iôdo. Agitar, e mergulhar uma tira de papel na mistura. Aquecer e banho-maria a 37°C* durante 40 m. Veter a urina, substituí-la por água destilada, renovando-a até retirar o excesso de iôdo do papel. Mergulhar o papel na solução de fosfato monopotássico a 10% por 1 a 2 minutos. Enxugar com papel de filtro e, enquanto úmido, comparar a sua côr com a dos padrões. Para guardar o papel, secá-lo ao ar, ao abrigo da luz. Para comparações posteriores, molhar o papel com água destilada.

Reação de Schlör original

Foi empregada a técnica de acôrdo com o autor¹. À reação, foi dado por nós o valor de 1 a 4 cruces, conforme a intensidade da côr.

Prova de Galli-Mainini

Foi empregada a técnica de acôrdo com o autor¹⁶.

RESULTADOS

O método descrito foi comparado com a prova de Galli-Mainini e com a reação de Schlör, através do exame de urina de 104 mulheres com suspeita de gravidez.

Os resultados comparativos analisados por grupos, de acôrdo com a intensidade da côr rósea no papel constam dos quadros I, II, III e IV.

(*) A reação se processa tanto em baixa temperatura como à fervura. A velocidade da reação aumenta com o aumento da temperatura.

QUADRO I

Resultados de amostras de urina com reação em papel correspondente ao padrão n.º 5

Urinas	Reação de Schlör *	Prova de Galli-Mainini
1	++++	Positiva
2	++++	Positiva
3	+++	Positiva
4	++	Positiva
5	++	Positiva
6	+	Positiva
7	+	Positiva
8	++++	Positiva
9	+	Positiva
10	++++	Positiva
11	++++	Positiva
12	++++	Positiva
13	++++	Positiva
14	+++	Positiva
15	++	Positiva
16	++	Positiva
17	++	Positiva
18	++	Positiva
19	++	Positiva
20	++	Positiva
21	++	Positiva
22	+	Positiva
23	+	Positiva
24	—	Positiva
25	++	Positiva
26	+++	Positiva
27	++	Positiva
28	++	Positiva
29	+++	Positiva
30	++++	Negativa
31	++++	Negativa
32	++	Negativa
33	++	Negativa
34	++	Negativa
35	+	Negativa
36	+	Negativa

* A intensidade da reação foi expressa em cruces (1 a 4) pelos autores deste trabalho. As reações com menos de 3 cruces não significam necessariamente positividade para gravidez, porquanto Schlör, em seu trabalho, refere-se apenas ao aparecimento da cor rósea bem evidente, sem estabelecer uma escala de intensidade.

QUADRO II

Resultados de amostras de urina com reação em papel correspondente ao padrão n.º 4

Urinas	Reação de Schlör *	Prova de Galli-Mainini
1	+	Positiva
2	+	Positiva
3	+	Positiva
4	—	Positiva
5	++	Positiva
6	++	Positiva
7	++	Positiva
8	++	Positiva
9	+	Positiva
10	+	Positiva
11	—	Positiva
12	++	Positiva
13	—	Positiva
14	—	Positiva
15	+++	Positiva
16	+++	Positiva
17	—	Positiva
18	—	Positiva
19	—	Positiva
20	+++	Positiva
21	+	Negativa
22	+	Negativa
23	+	Negativa
24	+	Negativa
25	—	Negativa

QUADRO III

Resultados de amostras de urina com reação em papel correspondente ao padrão n.º 3

Urinas	Reação de Schlör *	Prova de Galli-Mainini
1	++	Positiva
2	—	Positiva
3	—	Positiva
4	++++	Positiva
5	+++	Positiva
6	+++	Positiva
7	—	Positiva
8	+	Positiva
9	+	Positiva
10	+	Positiva
11	—	Positiva
12	—	Positiva
13	—	Positiva
14	—	Positiva
15	++	Negativa
16	++	Negativa
17	+++	Negativa
18	+++	Negativa
19	+	Negativa
20	—	Negativa
21	—	Negativa
22	—	Negativa
23	—	Negativa
24	—	Negativa

QUADRO IV

Resultados de amostras de urina com reação em papel correspondente ao padrão n.º 2

Urinas	Reação de Schlör *	Prova de Galli-Mainini
1	—	Positiva
2	—	Positiva
3	+	Positiva
4	—	Positiva
5	—	Positiva
6	—	Positiva
7	+	Negativa
8	—	Negativa
9	+	Negativa
10	—	Negativa
11	—	Negativa
12	—	Negativa
13	—	Negativa
14	—	Negativa
15	—	Negativa
16	—	Negativa
17	—	Negativa
18	—	Negativa
19	—	Negativa

Pelos quadros apresentados verifica-se que:

a) O papel de filtro apresenta-se sempre róseo e com a intensidade variável entre os padrões n.º 2 e 5.

b) Os resultados não concordam com a prova de Galli-Mainini.

c) O papel de filtro, mesmo computando-se como positivas somente as reações intensas que correspondem ao padrão n.º 5, apresenta reações positivas falsas.

d) A percentagem de reações positivas falsas, com o papel, aumenta à medida que se consideram como positivas as reações mais fracas.

e) A reação com papel de filtro é mais sensível e menos específica do que a reação de Schlör original.

A substância responsável pela cor fixada pelo papel é dializável em celofane e resiste à fervura em pH ácido.

A adrenalina e a noradrenalina, tratadas pelo iodo, desenvolvem cor rósea que, entretanto, não se fixa no papel.

A coloração rósea apresentada pela urina imediatamente após a adição de iodo, e a frio, pode correr por conta da adrenalina e noradrenalina. Esta cor, que se mantém

após o aquecimento, pode ser interpretada erroneamente como Schlör positiva. Em nosso trabalho, encontramos essa reação em urina de mulher não grávida, e de homem.

DISCUSSÃO

A fixação do composto róseo em papel tornou a reação de Schlör mais sensível e menos específica.

Pelo aumento da sensibilidade foi possível verificar que a substância responsável pela coloração existe na urina da mulher não grávida, em concentrações variáveis e tão altas às vezes como na urina da mulher grávida.

Provas feitas com urina de homens e crianças de ambos os sexos (não constam nos quadros) deram sempre reação em papel correspondente aos padrões n.º 1, 2 ou 3.

CALVO⁵, MANDARINO⁹ e OLIVEIRA¹⁰ também encontraram reações positivas falsas com urina de mulheres não grávidas e com urina de homens.

Encontramos urinas de mulheres e de homens que manifestaram a cor rósea imediatamente após a adição de iodo, e a frio. Nestes casos, a reação pode correr por conta da adrenalina ou noradrenalina.

CONCLUSÕES

1) A técnica descrita não oferece segurança para diagnóstico gravidez, porque dá falso-positivos.

2) Pelo aumento da sensibilidade da reação de Schlör, foi possível verificar que a substância responsável pelo composto róseo existe normalmente na urina de mulheres, homens, e crianças de ambos os sexos.

3) A referida substância aumenta na gravidez e, às vezes, na sua ausência.

4) É interessante estudar o papel dessa substância ou seu precursor.

SUMÁRIO

Foi descrita uma técnica para fixação, em papel de filtro Whatman n.º 3MM, da coloração rósea do composto formado tratando a urina de mulheres grávidas com iodo.

Mostrou-se que o papel Whatman n.º 3MM fixa fortemente o composto, aumentando assim a sensibilidade da reação, porém a especificidade decresce.

Com êste aumento de sensibilidade da reação através da sua fixação em papel, foi possível mostrar que a substância responsável pela reação está presente não só na urina de mulheres grávidas como também na urina de mulheres não grávidas, de homens e de crianças de ambos os sexos.

Empregando-se a reação de Schlör original, e também a técnica aqui apresentada, em 104 amostras de urina de mulheres com suspeita de gravidez e, comparando se os resultados de ambos com o teste de Galli-Mainini, não foi achada concordância entre êles, encontrando-se resultados positivos falsos tanto com a reação de Schlör, como com a técnica acima descrita.

Mostrou-se também que a substância responsável por essa reação aumenta na gravidez, embora às vezes tal aconteça independentemente dessa circunstância.

Agradecimentos — Agradecemos à Dra. Laura Taborda e Dr. José Lopes Neto pela colaboração prestada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHLÖR, W. — Adsorptionsverbindungen von Jodein Schwangerschaftstest. Deutsch Med. Wschr. 75:1666-1667, 1950.
2. GOLD, B. — Contribución al estudio de una reacción para el diagnóstico del embarazo. Dia. Med. 23(82):3798-799, 1951.
3. AGUIAR, A. D., Jr. & MACHADO FILHO, R. — Contribuição ao estudo de novo teste bioquímico para diagnóstico precoce da gravidez. Rev. Paul. Med. 43:349-351, 1953.
4. RIESS, H. & REITINGER, J. — Prova química rápida e simples para diagnóstico precoce da gravidez. Fich. Med. "Labofarma". 15:63-1040, 1953.
5. CALVO, L. S. — Evaluation of Schlör test. Arch. Med. Exper. 16:99-107, 1953.
6. RASPINI, J. — A propósito de un reacción para el diagnóstico precoz del embarazo. Dia. Med. 26(57):1643-646, 1954.
7. CASTRO, C. A. — Reacción de Schlör. Dia. Med. 27(6):152-153, 1955.
8. CARVALHO, J. S. — Nossa experiência com o teste de Schlör. Arch. Bras. Med. Nav. 17(59):4667-4674, 1956.
9. MANDARINO, E. — O teste de Schlör no diagnóstico da gravidez. Rev. Bras. Med. 15:153, 1958.
10. OLIVEIRA, A. — O Laboratório no diagnóstico da gravidez. Rev. Bras. Med. 17(1):14-27, 1960.
11. FERREIRA, A. A. & PRADO, P. A. — Reação "Flamínio Fávero" para o diagnóstico precoce da gravidez. Arch. Soc. Med. Leg. Crim. S. Paulo 23:15-61, 1954.
12. MISISCHIA, N. — Use of lugol's solution and starch in testing for pregnancy: experimental use. J. Int. Coll. Surg. 29:179-185, 1958.
13. MONTÈTE, P. — Test au lugol dans le diagnostic chimique de la grossesse. Press Med. 66(77):1730, 1958.
14. D'ANDREA, A. — La reazione allo iodio per la diagnosi di gravidanza. Riv. Ostet. Ginec. Prat. 42:640-643, 1960.
15. BERTONE, E. — La soluzione del Lugol come test per l'accertamento precoce della gravidanza. Minerva Med. 54(72):2577-2578, 1963.
16. GALLI-MAININI, C. — El diagnostico del embarazo com batracios machos. Buenos Aires, Artecnica, 1948.

Recebido para publicação em 12-3-65.



SURTO EPIDÊMICO DE MENINGITE POR *SALMONELLA CRUMPENSIS* (1)

OUTBREAK OF MENINGITIS CAUSED BY *SALMONELLA GRUMPENSIS*

AUGUSTO DE ESCRAGNOLE TAUNAY (2)

CARLOS DE OLIVEIRA BASTOS (3)

HÉLIO MARTINS (2)

SUMMARY

The authors described an outbreak of meningitis caused by *Salmonella grumpensis* in 24 children aged 5 days to 3 months (70% with less than 30 days) of which 22 died.

The children developed symptoms of meningitis at home, after being discharged as apparently well from a maternity hospital in which they had been born, where infection persisted at least from May 1961 to October 1962. All of them were interned in other hospitals.

The maternity hospital was unaware of it due to the fact that newborns stayed in it only 3 to 4 days.

The sequence of events caused by a very uncommon type of salmonella called the attention of the Typing Salmonella Center of the State Health Laboratory. If it were not for this fact, the outbreak would probably go without coming to the attention of the State Health Department.

Salmonella grumpensis became established in the obstetrical unit and was recovered in two instances from dust in the wards but not from the hospital staff.

Two factors contributed to the spread of the infection: bad nursing and overcrowded nurseries.

Closing the maternity during 18 days and disinfecting with formaldehyde was the only way to prevent the continuation of the outbreak.

INTRODUÇÃO

As infecções humanas por salmonelas têm uma história variada e, de todas as infecções causadas por enterobactérias, são as únicas que, de acordo com EDWARDS¹, têm sua frequência aumentada em vez de diminuída, apesar do emprego de melhores métodos de higiene e controle. O mesmo fato, assim como sua importância como problema de Saúde Pública, foi muito bem ressaltado

em editoriais do "The Journal of the American Medical Association" dos anos de 1950² e 1964³.

Várias revisões sobre o assunto têm sido feitas. BORNSTEIN⁴, SAPHRA & WINTER⁵ e recentemente BOWMER⁶ analisaram vários aspectos do problema, admitindo o último, como parte importante da infecção, a transmissão por via aérea, fato que já foi bem

(1) Trabalho realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Do Hospital do Isolamento Emílio Ribas.

comprovado tanto experimentalmente como através de observação clínica.

Assim é que CLEMMER *et alii*⁷, trabalhando com pintos, e DARLOW *et alii*⁸, com camundongos, mostraram que a infecção por via aérea representa uma maneira ideal de infecção experimental, uma vez que um número reduzido de germes pode provocar infecção respiratória com ou sem invasão hematogênica ou passagem para o intestino. Ainda Darlow *et alii* verificaram que o número de germes necessário para provocar no animal uma pneumonia primária específica ou mortal era muito menor do que o necessário para obter os mesmos resultados por via digestiva, sendo aproximadamente equivalente à dose intraperitoneal.

As observações de DATTA & PRIDIE⁹, descrevendo uma epidemia por *Salmonella typhimurium* entre os doentes de um hospital geral, que durou 20 semanas e deu lugar a 102 casos de enterite, com 150 eliminadores assintomáticos de germes, mostram evidência de que não estava ligada à via alimentar, sendo sido o agente específico encontrado na poeira de uma das enfermarias. Na mesma publicação está relatado que numa enfermaria de doenças pulmonares, após terem sido admitidos dois pacientes com diarreia, no fim de algum tempo foram isoladas salmonellas de escarro de 5 doentes, sem que a mesma bactéria estivesse sendo eliminada pelas fezes.

BATE & JAMES¹⁰ descrevem num hospital infantil 7 surtos epidêmicos de gastroenterite num período de 11 meses, causados por *S. typhimurium*, sem que se pudesse evidenciar portadores humanos ou contaminação de alimentos, sendo finalmente descoberto o foco da infecção no saco de pó de um aspirador.

As verificações de ROGERS¹¹ e de LAURELL¹² com *Escherichia coli* do grupo G.E.I., assim como com outros coliformes, demonstram que numa enfermaria o ambiente se torna pesadamente contaminado em 18 horas e que os colibacilos (G.E.I.) permanecem vivos na poeira pelo menos durante 27 dias.

Mais recentemente, VAN OYE *et alii*¹³ descreveram epidemia num serviço de Pediatria onde isolaram *E. coli* 0111 e *S. typhimurium* de doentes e da poeira do quarto dos prematuros e do corredor central, sugerindo que a poeira contaminada pode provocar

maior número de infecções por via respiratória do que por via digestiva.

NETER¹⁴ mostrou a facilidade com que pode haver contaminação por salmonelas no momento do parto, servindo o recém-nascido como introdutor de infecção no berçário e que, se precauções não forem tomadas, facilmente poderá haver um surto epidêmico hospitalar, sabendo-se que a criança, e particularmente o recém-nascido, por uma combinação de fatores peculiares à idade, não oferece resistência a êsse tipo de infecção, dada a possibilidade de um número pequeno de bactérias iniciarem o processo infeccioso.

Não é pois de estranhar a possibilidade de ocorrerem epidemias dessa natureza sempre que se estabeleçam condições de contaminação do ambiente, epidemias essas que podem assumir caracteres muito graves quando o germe incriminado tem tendência a metástase extra-intestinal, que foi o que observamos nos casos presentes.

MATERIAL

No dia 4-5-1961 recebemos para identificação uma cultura de *Salmonella* isolada do pus meníngeo de uma criança necropsiada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e que foi classificada como *Salmonella grumpensis*. Em agosto do mesmo ano, o mesmo germe foi isolado em um caso de recém-nascido com meningite, internado no Hospital do Isolamento "Emílio Ribas". Tal fato não despertou atenção, uma vez que a ocorrência de casos isolados de meningite primária ou secundária por salmonelas não é rara e os registros da Seção de Bacteriologia dêste Instituto mostram que nos últimos 10 anos foram diagnosticados 28 casos de meningite por salmonela, compreendendo 10 tipos diferentes.

No entanto, no período de setembro de 1961 a abril de 1962 foram diagnosticados mais 14 casos em crianças cujas idades variavam de 8 dias a 3 meses, isolando-se sempre o mesmo germe (TAUNAY *et alii*⁵), mostrando de maneira clara a ocorrência de uma epidemia por *S. grumpensis*, restando descobrir o seu foco. A hipótese de o Hospital "Emílio Ribas" ser o responsável foi imediatamente afastada, uma vez que as crianças eram encaminhadas para êsse nosocômio com sintomas de infecção e lá pun-

cionadas, já se podendo evidenciar a presença no líquido cefalorraquidiano de bacilos Gram-negativos.

Nas fichas clínicas do Hospital "Emílio Ribas" não constavam dados esclarecedores além da sintomatologia da doença e da residência dos responsáveis pela criança; em todos os casos, ao ser completado o exame bacteriológico, já havia ocorrido êxito letal, o que dificultava uma entrevista com os mesmos. Considerando uma cidade como São Paulo, onde as ruas dos bairros periféricos são muitas vezes de difícil identificação e de onde provinha a quase totalidade dos casos, não foi fácil estabelecer contacto com os familiares.

Organizamos um pequeno inquérito epidemiológico onde procuramos verificar, entre outros dados, o local de nascimento, assistência pré e pós-natal, assim como se a meningite fôra precedida de disenteria ou se havia casos de disenteria entre os familiares.

Conseguimos localizar 13 familiares e desde logo verificamos um dado comum a todos os casos, que foi o de tôdas as crianças terem nascido numa mesma maternidade.

Com a ida de um de nós à citada maternidade, verificamos não poder contar com nenhum elemento esclarecedor; não encontramos referências a casos de infecção meningea e os quadros intestinais não eram em número maior do que o que habitualmente ocorre em hospitais desse tipo.

Sugerimos aos responsáveis pela maternidade que fossem enviadas ao Instituto "Adolfo Lutz" amostras de fezes de tôdas as enfermeiras e do pessoal atendente que de qualquer modo estivessem ligados aos cuidados dos recém-nascidos, o que foi feito em 13-7-1962, quando procedemos ao exame das fezes de 32 enfermeiras e atendentes, com resultado negativo, a não ser o de uma enfermeira que era portadora de *Salmonella newport*, não podendo, portanto, ser a responsável.

Indagando qual o tempo de permanência de uma parturiente na maternidade, fomos informados de que a média era de três dias, portanto insuficiente para que a doença se manifestasse. No entanto, observamos, ao visitar um dos berçários, uma prática por parte da enfermagem, que consiste em jogar no chão de ladrilhos as fraldas servidas de recém-nascidos, o que nos levou a solicitar

para exame a varredura dos berçários. Com êsse material, não só em sementeira direta como após enriquecimento em meio de selenito, isolamos uma salmonela que foi identificada como *Salmonella grumpensis*, esclarecendo o foco da epidemia e o mecanismo de transmissão.

Posteriormente, em 8-8-1962, das fezes de um prematuro isolamos *S. grumpensis*, apesar das medidas acauteladoras, de melhor enfermagem, postas em prática, e do cuidado em não se jogarem fraldas usadas no chão. Nôvo exame da poeira, em 10-8-1962, não revelou a presença do germe, mas a repetição do exame, em 17-8-1962, mostrou que a bactéria ainda estava no meio ambiente. Nessa altura, o número de casos já ascendia a 20; insistindo junto à direção da Maternidade, para melhor cuidado nos berçários, tivemos um período de 2 meses nos quais não foram observados casos novos; entretanto, no período de 25-10 a 26-11-62, pudemos verificar mais 4 casos, em recém-nascidos cuja idade variava de 8 a 30 dias, mostrando que as medidas tomadas tinham sido insuficientes.

Uma vez verificado o foco da epidemia, mantivemos informados os órgãos superiores da Secretaria da Saúde Pública e da Assistência Social, através da Diretoria do Instituto Adolfo Lutz, para quem transferimos o problema, sugerindo que providências drásticas fossem tomadas para evitar o prosseguimento do surto epidêmico, o que foi feito imediatamente, tendo o Secretário da Saúde Pública e da Assistência Social determinado que fosse fechada a maternidade em questão e removidos seus pacientes, e que o Serviço de Epidemiologia realizasse rigorosa desinfecção no local. Durante um período de 18 dias o Hospital esteve fechado, sendo todo êle desinfectado com formol e sua reabertura só foi permitida quando os exames bacteriológicos das sementeiras do pó dos berçários não revelou a presença de enterobactérias, o que ocorreu após a segunda aplicação do formol.

DADOS CLÍNICOS

Todos os casos, excluindo dois de autópsia, apresentaram líquido purulento com elevado número de neutrófilos. A maioria das crianças tinha menos de 30 dias (70%). Algumas das crianças apresentaram diarréia antes dos sintomas meníngeos.

De todos os 24 casos, só dois não tiveram êxito letal.

O germe isolado, em todos os casos, foi *Salmonella grumpensis*.

O registro da Seção de Bacteriologia do Instituto "Adolfo Lutz", em 1961, assinalou a primeira vez em que êsse tipo de salmonela foi encontrado em São Paulo. No ano de 1962 foi isolado, de fezes, 9 vezes, para desaparecer no ano seguinte.

Na literatura consultada não encontramos nada de especial sobre o papel patogênico desse tipo de salmonela, no homem, a não ser o fato de ter sido isolado no Uruguai por HORMAECHE, PELLUFO & PEREIRA¹⁶.

Por informação pessoal de PELLUFO¹⁷ tivemos conhecimento de que essa salmonela fôra pela primeira vez isolada de um cobaio enviado de Buenos Aires por Sordelli, e de que nunca mais foi encontrada no Uruguai, como também não há referências a seu achado em outros países.

COMENTÁRIOS

O aparecimento de surtos epidêmicos de meningite por salmonelas já foi assinalado em outros países (CURBELO & MARTINEZ *apud*¹⁹; LEEDER²⁰), cabendo-nos atualmente a primazia de apresentar o número mais elevado de casos.

Do modo pelo qual o germe foi introduzido no bercário, nada pudemos concluir. Sua presença, pelo menos por um período de 18 meses, deve ter sido a consequência de má enfermagem e o fato de a maternidade não ter notado o que se estava passando foi, possivelmente, devido à curta permanência dos pacientes na mesma, não havendo tempo para o aparecimento dos sintomas. Não fôra o tipo especial de salmonela, rara entre nós, e a seqüência dos casos de meningite, provavelmente teria passado despercebida a todos.

Esta trágica ocorrência servirá para chamar a atenção sobre um problema ao qual não se tem dado o devido apêço, ou seja, o do perigo da introdução de uma enterobactéria patogênica num bercário.

Leeder, fazendo um estudo de epidemia semelhante à nossa, mostrou quanto tempo pode uma criança ser portadora de salmonelas, atuando como foco de infecção. Se levarmos em conta o número de crianças nascidas na referida maternidade, durante o período em

que a bactéria esteve presente na pocira dos bercários, podemos suspeitar de que grande número delas se tenham contaminado, apresentando quadros intestinais, ou tornando-se simplesmente portadoras de germes; ainda, podemos concluir que êste foi um dos maiores focos de salmonela, e talvez a razão de um número elevado de achados desse tipo particular de salmonela, no ano de 1962 (9 casos), conforme consta do registro do Laboratório de Coprocultura do Instituto Adolfo Lutz.

RESUMO

Os autores relatam um surto epidêmico de meningite por *Salmonella grumpensis*, que atingiu 24 crianças cuja idade variava de 5 dias a 3 meses (70%) com menos de 30 dias), tendo havido 22 óbitos.

Os casos se sucederam por um período de 18 meses, com aparente ligação uns com os outros e, não fôra a localização anômala de uma salmonela rara, o surto epidêmico teria passado despercebido. A repetição do mesmo achado indicava a existência de um foco comum que foi localizado, através de inquérito num maternidade onde haviam nascido tôdas as crianças e onde foi possível demonstrar o agente infeccioso na pocira dos bercários assim como nas fezes de um recém-nascido que apresentava diarreia. Entre o pessoal da enfermagem não foi possível evidenciar portadores de geremes.

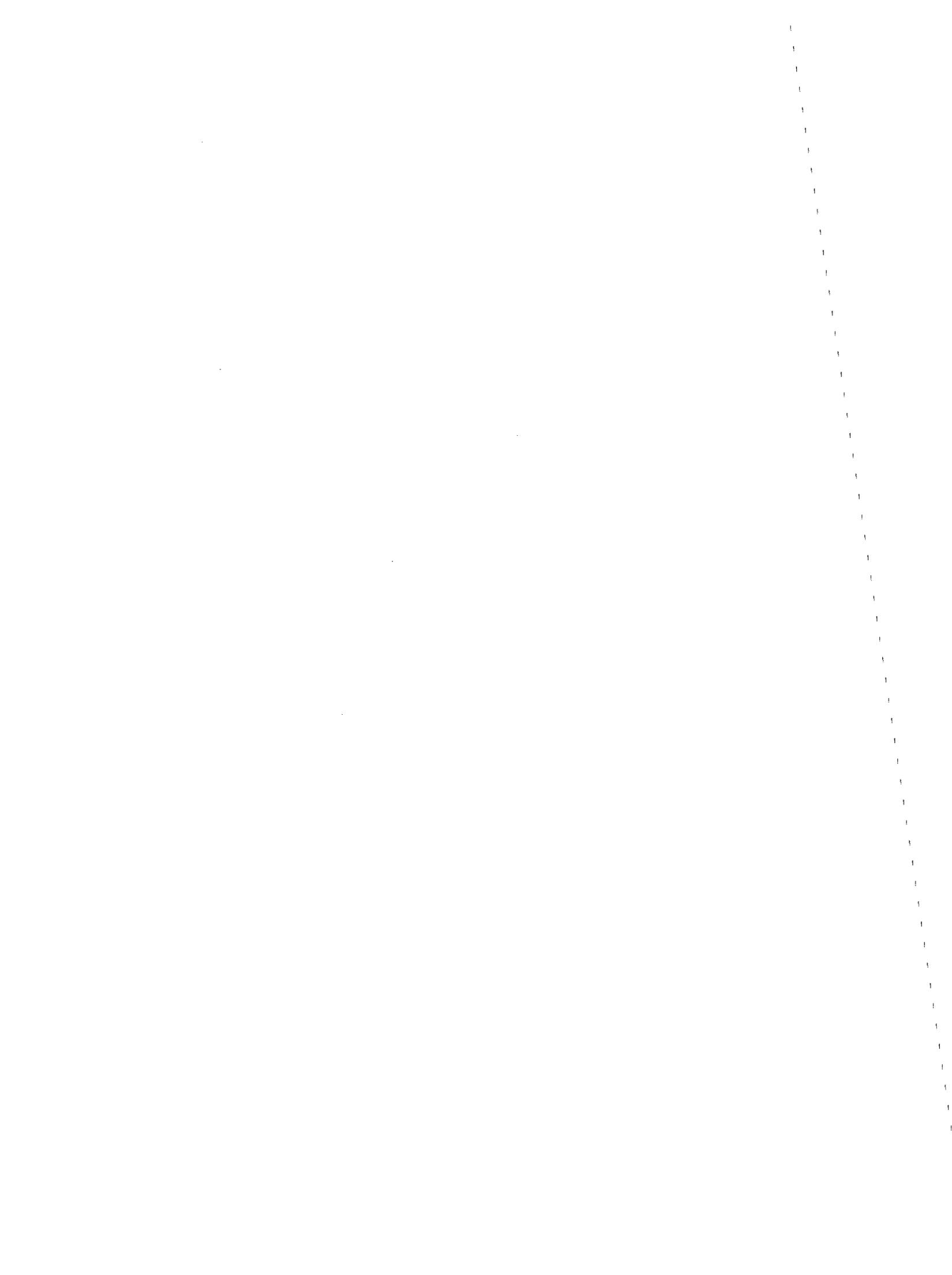
O fato de a maternidade não se ter dado conta do que ocorria certamente se deve à curta permanência (3 a 4 dias após o parto) dos recém-nascidos, ali, insuficiente para o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos. Avisada a direção da maternidade do que se estava passando, foram tomadas medidas que não foram suficientes para evitar o aparecimento de casos novos, o que só foi conseguido com o fechamento da mesma por um período de 18 dias, sendo tôda ela desinfetada com formol e sua reabertura só permitida quando os exames bacteriológicos do pó dos bercários não revelou a presença de enterobactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EDWARDS, P. R. — Salmonellosis: observations on incidence and control. Ann. N. Y. Sci. 70:598-613, 1958.

2. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION — The salmonella problem. JAMA 142(14): 1078, 1950. Editorial.
3. AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION — Salmonella control. JAMA 180(9):691, 1964. Editorial.
4. BORNSTEIN, S. — The state of the salmonella problem. J. Immun. 46:439-496, 1943.
5. SAPHRA, I. & WINTER, J. W. — Clinical manifestations of salmonellosis in man. An evaluation of 7.779 human infections identified at the New York Salmonella Center. New Engl. J. Med. 256:1128-134, 1957
6. BOWMER, E. J. — The challenge of salmonellosis major public health problem. Am. J. Med. Sci. 247:467-501, 1964.
7. CLEMMER, D. I. *et alii* — Bacteriologic studies of experimental air-borne salmonellosis in chicks. J. Infect. Dis. 106:197-210, 1960.
8. DARLOW, H. M., BALE, W. R. & CARTER, G. B. — Infection of mice by the respiratory route with *Salmonella typhimurium*. J. Hyg., Camb. 59:303-308, 1961.
9. DATTA, N. & PRIDIE, R. B. — An outbreak of infection with *Salmonella typhimurium* in a general hospital. J. Hyg., Camb. 58: 229-241, 1960.
10. BATE, J. G. & JAMES, U. — *Salmonella Typhimurium* infection dust-borne in a children's ward. Lancet 2(2):713-715, 1958.
11. ROGERS, K. B. — The spread of infantile gastro-enteritis in a cubicle ward. J. Hyg., Camb. 49:140-151, 1951.
12. LAURELL, G. — Airborne infections. VIII & IX. Coliforme organisms in the upper respiratory tract of children. Acta Path. Microbiol. Scand. 31:99-123, 1952.
13. VAN OYE, E. *et alii* — Role probable des poussières dans une épidémie hospitalière par entérobactéries (*Salmonella* et *Escherichia coli* pathogènes). Presse Méd. 71:2241-43, 1963.
14. NETER, E. — Observations on the transmission of salmonellosis in man. Am. J. Publ. Hlth 40:929-933, 1950.
15. TAUNAY *et alii* — Meningite por *Salmonella grumpensis*. Estudo clínico de 14 casos. XI Congresso Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, junho de 1962.
16. HORMAECHE, E., PELUFFO, C. A. & PEREYRA, V. R. — A new salmonella type, salmonella carrau, with special reference to the 1,7... phases of the Kauffmann-White classification. J. Bact. 47:323-326, 1944.
17. PELLUFO, C. A. — Informação pessoal.
18. CURBELO, A. & MARTINEZ CRUZ, J. A. — *Apud* HENDERSEN, L. L.²⁹.
19. HENDERSEN, L. L. — *Salmonella* meningitis. Report of three cases and review of one hundred and forty-four cases from the literature. Am. J. Dis. Child. 75:351-375, 1948.
20. LEEDER, F. S. — An epidemic of *Salmonella panama* infections in infants. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66:54-60, 1956.

Recebido para publicação em 11-10-65.



COLITE ULCERATIVA CRÔNICA POR ESTRONGILOÍDE (1)

CHRONIC ULCERATIVE COLITIS DUE TO *STRONGYLOIDE STERCORALIS*

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS (2)

SUMMARY

A fatal case of chronic ulcerative colitis seemingly due to *Strongyloide stercoralis* is described. The clinical and histologic pictures were very similar to amebic dysentery. Abundant larvae of *S. stercoralis* were found in the feces. In sections of the ascending colon foreign body like granulomas were observed and larvae were found in the submucosa.

INTRODUÇÃO

Grande é a disseminação da estrongiloidose na população brasileira, evidenciada pelos resultados dos exames usados para o seu diagnóstico, quer pelo método de Baermann, como preceitua MORAIS³, quer pelo de RUGAI *et alii*⁵ de maior facilidade, segundo a experiência dos técnicos do Instituto Adolfo Lutz, e com resultados idênticos aos obtidos pelo método de Baermann.

A Seção de Parasitologia deste Instituto tem demonstrado o alto grau de infestação dessa verminose na Capital de São Paulo, com base em exames de fezes realizados pelos métodos comuns de rotiga geral no I.A.L. — direto e de sedimentação. Em 1965, dentre 32 532 exames de fezes, foram diagnosticados 1 917 casos positivos de estrongiloidose, na cidade de São Paulo e adjacências.

FLEURY² assinalou caso com grande infestação e evolução fatal, em criança procedente de Santo Amaro (arredores de S. Paulo).

O tipo de lesão, raridade na localização, evolução fatal e sintomatologia extremamente semelhante à da disenteria amebiana motivaram a apresentação deste trabalho.

OBSERVAÇÃO ANATOMO-CLÍNICA

Trata-se de um doente do sexo masculino, de 43 anos, natural do interior do Estado de São Paulo, cujos sintomas duravam há mais de 12 anos, constantes de evacuações líquidas com muco e sangue, acompanhadas de puxos e tenesmo, várias vezes ao dia, alternando-se com períodos de prisão de ventre, sintomas êsses que se exacerbaram após 7 anos. Acompanhando as crises diarréicas, apareciam estados vertiginosos, enjoos e gôsto amargo na boca. Mais recentemente, apareceram pirose e abundante ensalivação após alimentação gordurosa e edema dos membros inferiores. Não havia referência a fenômenos cutâneos (lesão urticariforme, eritema, edema ou prurido) que, na realidade, são inconstantes e nem tampouco o paciente fazia menção a sinais bronco-pulmonares. O que predominava na sintomatologia eram sinais gastro-intestinais, fazendo lembrar a disenteria amebiana, pela diarréia com sangue, puxos e tenesmo; constipação intestinal intermitente. Apareceram então, nitidamente, os sinais de "dispepsia nervosa".

(1) Trabalho realizado na Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (Dr. Evandro F. Campos) e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da U.S.P. (Prof. C. Mignone).

Subvencionado, em parte, pela verba 63/393/C. Med. da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

O exame geral do doente mostrou um adiantado estado de caquexia, com infiltração edematosa, anemia e hipotrofia muscular. Para o lado do aparelho circulatório, apenas se constatou abafamento de bulhas e o exame do abdomen revelou em ambas as fossas ilíacas cordão mole, fino, doloroso e gargarejante; intestino delgado, gargarejante o doloroso. Paciente sem febre. No restante do exame clínico nada se observou digno de nota. O exame de fezes revelou larvas de *Strongyloide stercoralis*, não acusando *Entamoeba histolytica*.

A necrópsia revelou caquexia, palidez e infiltração edematosa dos tecidos e mucosas, discreto edema cerebral, sufusões hemorrágicas da mucosa da faringe, laringe e traquéia, hidrotórax, áreas de colapso no pulmão direito, congestão e edema no pulmão esquerdo e dilatação global do coração. Ascite de 2 litros. Atrofia simples do fígado e baço. Os rins apresentavam uma atrofia arteriosclerótica e a bexiga, hipertrofia da camada muscular.

De acôrdo com os achados da necrópsia, o indivíduo se encontrava em adiantado estado de carência orgânica.

As lesões mais importantes foram verificadas para o lado do *intestino grosso*; os colons ascendente, transversal descendente,

e o sigmóide e reto apresentavam-se, em tôda sua extensão, de paredes espessadas e mucosa bastante edemaciada. Em tôda a extensão da mucosa notavam-se numerosas ulcerações superficiais arredondadas, pequenas, de limites nítidos, medindo em geral 1 a 1,5 mm em seus maiores diâmetros, isoladas, ou confluentes dando a impressão de úlceras maiores. Uma fina camada necrótica recobria algumas dessas ulcerações e em outras verificava-se embebição sulfo-hemoglobínica. O aspecto sub-minado pôde ser pesquisado em algumas úlceras. Uma fina camada de exsudato catarral recobria quase tôda a extensão do intestino grosso. No sigmóide, notava-se ainda uma pequena formação polipóide do tamanho de um grão de ervilha. No intestino delgado, observavam-se essas ulcerações com os mesmos caracteres, porém em número muito reduzido (Fig. 1).

O apêndice encontra-se livre de aderências, sem sinais de inflamação aguda, de calibre muito aumentado, paredes espessadas e luz ampla, contendo no seu interior material fecalóide amarelado.

O exame, em conjunto, do intestino grosso enquadrrou-se perfeitamente no quadro macroscópico de colite ulcerativa crônica, do tipo amebiano, tanto pelo aspecto das ulce-

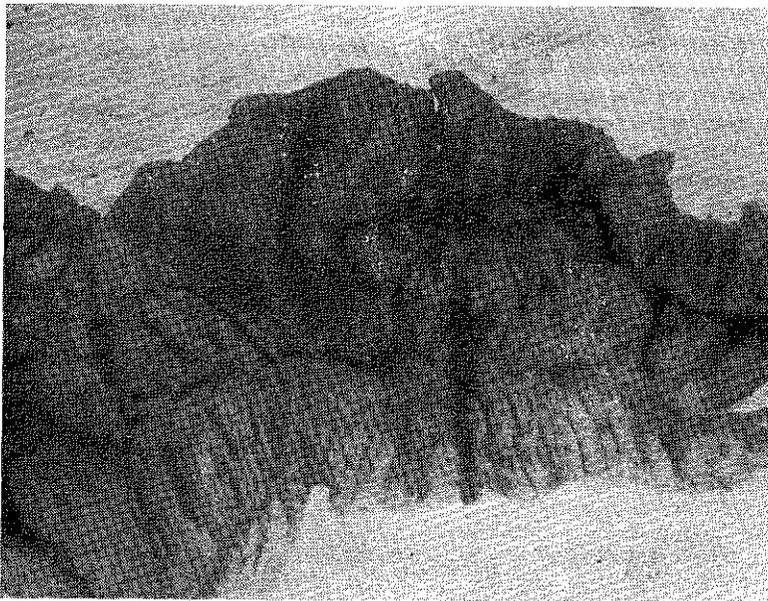


Fig. 1 — Intestino grosso. Edema acentuado, ulcerações pequenas disseminadas.

rações como pela sua localização. O exame histopatológico demonstrou a etiologia das lesões, pela presença de grande número de *Strongyloide stercoralis*. Notamos uma gran

de infestação por larvas localizadas na mucosa e submucosa do intestino grosso, ao lado de ulcerações pequenas com destruição da mucosa e parte da sub-mucosa. As larvas, na

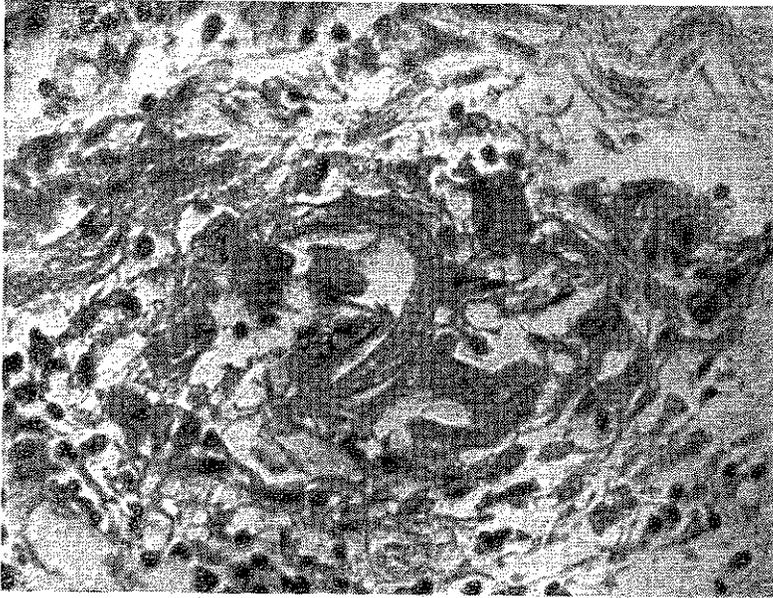


Fig. 2 — Corte histológico de intestino grosso, na submucosa, presença de larva e granuloma tipo corpo estranho: gigantocitos, células histiocitárias, plasmocitos e linfócitos (raros eosinófilos).

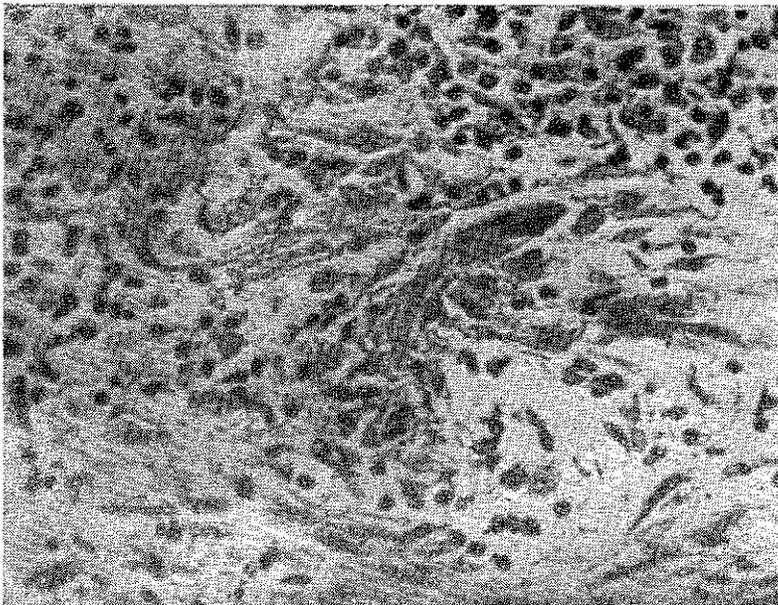


Fig. 3 — Corte de intestino grosso. Presença de larva, com reação inflamatória tipo crônico. Ausência de gigantocitos.

forma filarióide, constituíam na parede intestinal, em grande número de lesões, um granuloma do tipo de corpo estranho, ocupando o centro da lesão, circundadas por grandes células histiocitárias, por gigantocitos com 3 e 4 núcleos, grandes células mononucleares e plasmocitos, raros eosinófilos e mais

na periferia, linfocitos em quantidade relativamente grande, ao lado de uma proliferação do tecido conjuntivo adjacente (Fig. 2 e 3). A parede apendicular apresentava o mesmo tipo de lesão na sub-mucosa e sua luz; em meio do material fecalóide, numerosas larvas de *estrongilóide* (Fig. 4 e 5).



Fig. 4 — Corte histológico de apêndice, focalizando o conteúdo da luz, com grande número de larvas.



Fig. 5 — Aumento maior da fig. 4, com maior detalhe.

COMENTÁRIO

Strongyloide stercoralis é considerado como agente não produtor de úlcera no intestino grosso⁴. O "habitat" normal do parasita fêmea, que é partenogenético, é o duodeno (Fig. 6) e as porções superiores do jejuno, onde põe seus ovos, que dão nascimento às larvas rãbitóides. Em casos raros, o parasita é encontrado na espessura do intestino grosso; as larvas têm capacidade de penetração através da parede e atingem vários pontos do organismo através do sistema venoso. Normalmente, deixam as criptas intestinais, descem para o intestino grosso e são eliminadas com as fezes. No solo, transformam-se em larvas filarióides infectantes. Estas penetram no homem através da pele e mucosa da mesma forma que o ancilóstomo, com idêntica sintomatologia cutânea.

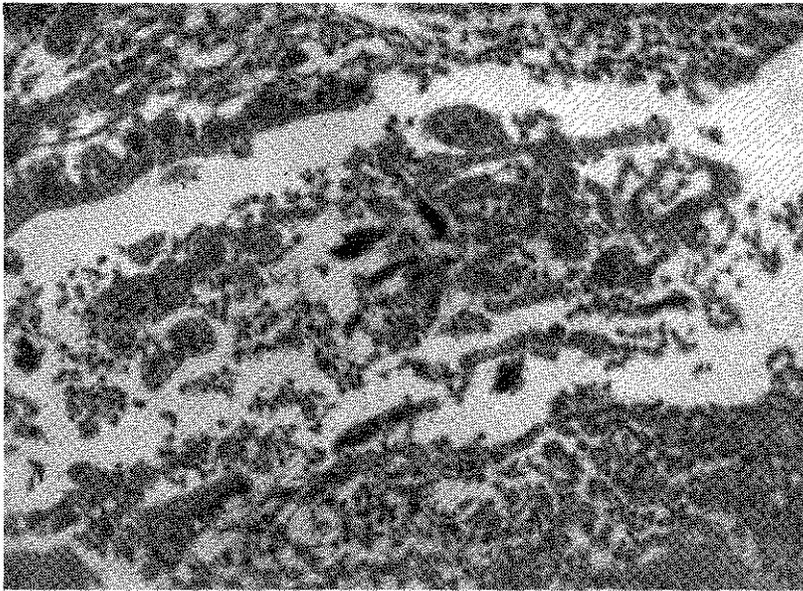


Fig. 6 — Corte de duodeno. Criptas com larvas seccionadas de *estrongilóide*. Processo inflamatório crônico associado, rico em eosinófilos.

Na *estrongiloidose*, podemos ter a auto-infestação de duas maneiras: 1.º) Quando são impróprias as condições para a vida da larva rãbitóide no intestino, ela sofre uma metamorfose e se transforma em larva filarióide que, penetrando na mucosa do intestino, alcança a veia cava e daí, o coração e pulmões. 2.º) Quando a própria larva rãbitóide penetra na mucosa intestinal e vai ao pulmão, produzindo novas reinfesta-

ções. Neste caso, explicar-se-iam os casos de longa duração, semelhantes ao que apresentamos, próprios de indivíduos com baixa resistência.

A larva rãbitóide pode penetrar na pele da região anal durante as evacuações e, aí, metamorfosear-se também em larva filarióide. A biópsia do intestino delgado, segundo a técnica de ARANTES *et alii*², é meio seguro para o seu diagnóstico, além dos outros métodos (coprológico, escarro e lavado gástrico e duodenal).

CONCLUSÕES

1. A *estrongiloidose* pode ocasionar sintomatologia semelhante à da disenteria amebiana.

2. A colite ulcerativa crônica pode ter como agente etiológico, além da *Entamoeba histolytica* e do *Balantidium coli*, o *Strongyloides stercoralis*.

3. A presença, no exame coprológico, das larvas rãbitóides de *S. stercoralis* e a ausência de *Entamoeba histolytica* ou *Balantidium coli* poderia firmar o diagnóstico etiológico de colite, por esse agente.

4. Os casos de decurso crônico, com sintomas durante muitos anos, provavelmente ocorrem em virtude de sucessivas reinfestações.

5. A parasitose é grave e, quando se manifesta por repetidas reinfestações não tratadas, conduz o indivíduo à caquexia e morte.

RESUMO

É apresentado um caso fatal de colite ulcerativa crônica, provocada por *Strongyloide stercoralis*, com sintomas e lesões semelhantes aos da disenteria amebiana.

Chama-se a atenção para a possibilidade de o *S. stercoralis* ocasionar sintomatologia semelhante à da disenteria amebiana, sob forma de colite ulcerativa, diagnosticável pelo encontro do parasita, podendo ocasionar a queda de resistência e a morte nos casos de grande infestação.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARANTES PEREIRA *et alii* — *Estrongilóide*. Estudo clínico, terapêutico, radiológico, biópsia e anátomo-patológico. Hospital 61(2):245-270, 1962.
2. FLEURY, C. T. — *Sobre um caso fatal de "Strongyloidiasis"*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 4:207-209, 1944.
3. MORAES, R. G. — *Determinação do espectro parasitário intestinal*. Hospital 66(4):735-745, 1964.
4. PINTO, C. *Parasitoses pulmonares*. Bahía, Progresso, 1957.
5. RUGAL, E. MATTOS, T. & BRISOLA, A. P. — *Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes — Modificação do método de Baermann*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 14(1):5-8, 1954.

Recebido para publicação em 30-12-65.