

VOLUME 25/27

1965/67

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

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

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY
Diretor do Instituto Adolfo Lutz

SECRETÁRIA

DEBORA D. E. REBOCHO

COMISSÃO DE REDAÇÃO

JOSÉ CARLOS ARMINANTE
JOSÉ PAULO G. LACERDA
LUÍS FLORÊNCIO SALLES GOMES
MÁRIO SCARPELLI
WALDOMIRO PREGNOLATO

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



REVISTA

DO

INSTITUTO

ADOLFO LUTZ

Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27, 1965/67

CONTEÚDO

	Pág.
Estudo sobre a imunogenicidade de amêndoas de cacau <i>Study on the immunogenicity of cocoa beans</i> YEHUDA LEVANON & STELA M. O. ROSSETINI	1
Estudos sobre a <i>Leptospira wolffii</i> em São Paulo <i>Leptospira wolffii in São Paulo, Brazil</i> MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA; SABURÓ HYAKU- TAKE; VAIL NATALE; PAULO A. AYROSA GALVÃO; HELIO DE ALMEIDA AGUIAR	11
Levantamento sorológico da doença de Chagas em 59 municípios da zona nordeste do Estado de São Paulo <i>Serological survey for Chagas' disease in 59 communities from the northeast part of the state of São Paulo, Brazil</i> OCTAVIO BARACCHINI; ARYOVALDO COSTA; JOÃO CAR- LONI; LINDOLFO CLEMENTE FERNANDES	27
Pneumonia intersticial plasmocitária pneumocística (Pneumonia pneu- mocística, Pneumocistiose ou Doença de Vanek & Jirovek). Apre- sentação de um caso <i>Interstitial plasma cell pneumocystis pneumonia (Pneumonia pneumo- cystis, Pneumocystiosis, Vanek & Jirovek Disease). Case report</i> EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS	33
Histopatologia do fígado na forma fatal fulminante da hepatite in- fectuosa <i>Histopathology of the liver in the fulminant fatal form of infectious hepatitis</i> EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS	47
Meio de cultura para <i>Trypanosoma cruzi</i> esterilizável pelo calor <i>A heat sterilizable culture medium for Trypanosoma cruzi</i> ETTORE RUGAI & RACHEL TEIXEIRA RUGAI	61
Concentrações das drogas em técnicas histológicas. 1. Estudo sobre Sudan IV <i>Reagents concentrations in histological techniques. 1. Study on Su- dan IV</i> EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS; NILZA BAPTISTA; ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI; MATHILDE TRIGO PIRES DE MESQUITA	65
Inibidores bacterianos no leite de consumo da Capital <i>Bacterial inhibitors present in milk of S. Paulo, Brazil</i> ALEXANDRE MELLO FILHO; LAURO ALBANO SANDOVAL; NELSON DOS REIS RODRIGUES; JOSÉ XIMENES	69

Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana encontrados no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. <i>Human fascioliasis in the Paraíba Valley. Considerations on the first seven cases described in the State of São Paulo, Brazil</i>	95
LUIS DOS SANTOS & TEREZA FREIRE VIEIRA	
Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre cortadores de cana de açúcar de alguns municípios do Estado de São Paulo <i>Leptospirosis among sugarcane cutters in São Paulo, Brazil; serological investigation</i>	
SABURÓ HIAKUTAKE; MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA; VAIL NATALE; MOACYR DA COSTA COUTO; ROMEU MAZZARI; ANINOEL PACHECO	111
<i>Determination of pantothenate in pharmaceutical preparations</i> Determinação de pantotenato de cálcio em medicamentos	
WALDOMIRO PREGNOLATTO & IONE IRULEGUI	115
Proteção " <i>in vitro</i> " conferida pela gama-globulina contra o vírus do sarampo <i>Protection in vitro by gamma globulin against the measles virus</i>	
ADELA ROTH; MARTA IRENE MALACHOWSKA; LUÍS FLORENCIO DE SALLES GOMES; CLÉLIA H. O. MARTINEZ	119

AOS COLABORADORES

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): BARBOSA, A. J. Quando a obra tem dois autores, mencionam-se ambos, na ordem em que aparecem na publicação, sempre o sobrenome antecedendo o prenome, ligados por "&": GOMES, J. A. & TOURAINE, M. M. A. Para mais de dois autores, quando a identificação da obra o exigir, mencionam-se todos, separados por ";": ROSENBERG, M.; YAKOVLEV, P. I.; van der HOEVE, J.; AMATO Neto, V.; VOGT, H. Quando a identificação da obra o não exigir, menciona-se o primeiro autor, seguido da expressão et alii: RACHOU, R. G. et alii.

No texto — serão numeradas, em ordem crescente, escritas em versal, com número alto ao lado do sobrenome do autor: ... segundo GOMES⁵.

Na lista de referências — serão ordenadas numéricamente, 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 (abreviaturas no "World List of Scientific Periodicals"), volume, número, página inicial e final e ano de publicação. Ex:

MALLORY, F. B. — Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. Bull. Johns Hopk. Hosp. 22:69-75, 1911.

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).

AMATO Neto, V.; CAMPOS, R.; FERREIRA, C. C. — Diagnóstico das parasitoses intestinais pelo exame de fezes. 2.^a ed. São Paulo, Atheneu, 1963. p. 125.

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 SÔBRE A IMUNOGENICIDADE DE AMÊNDOAS DE CACAU (1)

STUDY ON THE IMMUNOGENICITY OF COCOA BEANS

YEHUDA LEVANON (2)
STELA M. O. ROSSETINI (2)

SUMMARY

Beans and pulp of the cocoa fruit were submitted to laboratory fermentation reproducing farm processing conditions.

Comparing the extracts of fermented, partially fermented and fully fermented beans, it was observed a parallelism between the gradual decrease of the glycodes content and the progressive decrease of the immunological activity.

Glycide nature of the antigen was demonstrated by staining with Schiff reagent of the material submitted to gel-electrophoresis, chromatography and acid hydrolysis.

One of the antigens, "Fraction A" present in extracts of unfermented beans shows a 1-4 linkage while the other, "Fraction B" linkages are in position 1-6.

By dialysis it was shown that only antigen ("Fraction B") present in extracts of incompletely fermented beans is constituted by molecules smaller than "Fraction B" found in extracts of fermented beans.

Adequate beans for the chocolate industry do not show immunological components.

A rapid and simple ring test is proposed for determining the degree of fermentation (quality of the farm product) of the cocoa beans.

INTRODUÇÃO

LEVANON & MARTELLI¹ verificaram que extratos de amêndoas de cacau não fermentadas eram imunogênicos, ao contrário do das amêndoas adequadamente fermentadas. Com base neste achado, LEVANON² propõe um método sorológico para determinação do grau de fermentação das amêndoas de cacau. Este método é menos influenciado pela interpretação pessoal do analista, que os outros anteriormente empregados, os quais são baseados no aspecto físico das amêndoas ou na coloração de sua superfície de corte, e conduz a resultados precisos e reproduzíveis para o controle da qualidade do produto rural.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho apresenta novos estudos sôbre a imunogenicidade do cacau submetido aos processos rurais de fermentação.

Foram empregadas amêndoas das variedades "Forasteiro", "Catongo" e "Crioulo" de plantas de *Theobroma cacao*, cultivadas na Estação Experimental de Cacau, Uruçuca, Estado da Bahia, Brasil. Amostras de cada variedade foram colhidas separadamente, lavadas com água corrente para eliminar a polpa, sêcas a 37° C e conservadas a temperatura ambiente. Também foram utilizadas amostras comerciais obtidas de exportadores das cidades de Itabuna e

(1) Trabalho laureado com o Prêmio "Adolfo Lutz" de Ciências Biológicas, Bioquímicas e de Saúde Pública, de 1965.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

Ilhéus (Estado da Bahia) *. A determinação da qualidade das amêndoas foi feita de acordo com DE WITT³. Polpa do fruto (mel de cacau) foi coletada separadamente dos frutos de cada variedade em frascos Erlenmeyer e congelada a -45° C. A polpa descongelada apresentou valores de pH de aproximadamente 3,8. Uma amostra de *Saccharomyces* sp., isolada de caixa de fermentação na Estação Experimental de Cacau, Uruçuca, e mantida em meio de Sabouraud, foi empregada para as fermentações no Laboratório.

Porções de 200 cm³ de polpa foram esterilizadas por filtração em filtros Seitz, colocadas em frascos Erlenmeyer e incubadas durante 72 horas a 37° C para detecção de eventual turvação por indesejável crescimento microbiano. Duzentas amêndoas não fermentadas, previamente lavadas com solução de mertiolato a 1% e posteriormente com água destilada esterilizada, foram adicionadas a cada frasco. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente, com 1 cm³ da suspensão do levedo, cuja turvação era equivalente à do tubo n.º 3 da escala de McFarland. Durante a fermentação, foram retiradas amostras cada 24 horas e preparados antígenos que foram testados por imunoprecipitação. Quando indicado, os extratos de amêndoas foram concentrados por liofilização, sendo depois dissolvidos no volume requerido de solução fisiológica.

As preparações obtidas no laboratório foram marcadas: "F", as bem fermentadas; "PF", as parcialmente fermentadas; "NF", as não fermentadas; "OF", as excessivamente fermentadas. A proporção de amêndoas bem fermentadas (boa qualidade) contidas na amostra era representada por um número na parte superior da marca, enquanto que um número na parte inferior da mesma representava a duração da fermentação em horas. Por exemplo, PF⁷⁰₇₂ indica que esta preparação foi feita de uma amostra de amêndoas fermentadas durante 72 horas (fermentação parcial, incompleta) e contém 70% de amêndoas de boa qualidade.

Os polissacarídeos totais foram determinados pelo método da antrona, descrito por

TREVELYAN & HARRISON⁴; polifenóis, pelo método de permanganato, descrito por FORSYTH⁵ e nitrogênio, por processo micro-Kjeldhal, segundo ELEC & SÓBOTKA⁶. Substâncias gordurosas foram determinadas em amostras de 10g extraídas em Soxhlet e pesadas diretamente. Foram feitas cromatografias ascendentes em fitas de 36 x 11 cm de papel Whatman n.º 1, usando fenol-água (8:2) como solvente, que era adicionado de 0,01% de Triplex "Merk" (etilenodiamin-tetracetato de sódio) para evitar oxidação, empregando-se 0,01 cm³ de antígeno em estudo, deixando-se correr durante 24 horas. Após secagem a 90°C, os cromatogramas foram relevados com reagente de antrona, descrito por SUNDERWITH *et alii*⁷, ou com reagente de difenilaminofosfato de anilina, segundo GRI & NICAM⁸. As porções correspondentes às manchas previamente reveladas em 25 fitas foram cortadas e eluídas com 10 cm³ de água destilada, por agitação mecânica durante 24 horas, liofilizadas e finalmente dissolvidas em 0,5 cm³ de solução fisiológica.

Cromatografias em DEAE-celulose (dietilaminoetil-celulose) foram feitas em colunas de vidro de 30 x 2,7 cm. A coluna era lavada repetidamente com solução-tampão de fosfatos 0,02M até obtenção do líquido de lavagem, com pH 7,4. Quantidades de 5 cm³ das preparações de polpa de cacau eram colocadas na coluna, adaptada a um coletor de frações, colhendo-se quantidades de 6 cm³ pela adição da solução-tampão acima citada. Cada tudo era testado pelo reagente de antrona e o material dos tubos, apresentando reação positiva, era misturado e marcado como "Fração A". A seguir, a coluna era eluída com solução-tampão de citrato 0,02M, pH 3,8 e os tubos com reação de antrona positiva foram reunidos e marcados "Fração B". As "frações" "A" e "B" eram dialisadas separadamente contra água destilada, liofilizadas e redissolvidas em 5 cm³ de solução fisiológica.

Amostras de 10 ml das frações purificadas, contendo 500 mg de polissacaríde, foram submetidas a hidrólise pela adição de HCl 4M até concentração final 2M. Os tubos foram incubados em água fervente

(*) As amostras comerciais são constituídas por misturas de amêndoas de plantas de muitas variedades.

durante 6 horas e, após resfriamento, o pH acertado para 7,0, com NaCH a 40%. Fenilosazonas foram preparadas pela adição de 0,5 cm³ de fenilidrazina e 0,5 cm³ de ácido acético glacial a 2 cm³ da solução em prova, seguida pela incubação em água fervente por 30 minutos. Os cristais eram testados quanto ao seu ponto de fusão e forma.

Antígenos para inoculação de animais foram preparados a partir das amostras F₁₄₄, PF₇₂ e NF, pela adição de 90 cm³ da solução de NaCl 0,15M a 1g de amêndoas lavadas, homogenizando-se a mistura em liquidificador. Após centrifugação a 3 000 r.p.m. durante 20 minutos, o sobrenadante foi completado a 100 cm³ (solução a 1%). Antígenos da polpa foram obtidos por centrifugação de polpa não fermentada, 30 minutos a 3 000 r.p.m. e separação do sobrenadante claro, isento de fibras. Partes iguais de cada antígeno e do adjuvante de FREUND⁹ foram emulsionadas para inoculação em animais. Cada coelho foi inoculado com 0,5 cm³ e cada cobaio com 0,25 cm³ da emulsão em cada pata, em intervalos de sete dias, durante seis semanas. Dez dias após a última injeção, os animais foram sangrados e o soro separado e conservado em refrigerador, após adição de mertiolato a 1:10 000.

Precipitados específicos foram determinados, em alíquotas de 0,5 cm³ de antígeno, pela adição de anti-soro anti-NF, seguida por incubação a 37°C, durante 2 horas e, posteriormente, a 2°C, durante 18 horas. Os precipitados foram separados por centrifugação e feita uma prova de anel, usando-se várias diluições do anti-soro. Se o antígeno era ainda detectável, a absorção era repetida. Os precipitados eram lavados três vezes com solução fisiológica gelada e

dissolvidos em NaOH 0,1N. O teor de nitrogênio do complexo antígeno-anticorpo foi determinado por micro-Kjeldahl, segundo ELEC & SOBOTKA.

A absorção dos anti-sôros foi feita pela adição de extratos PF₇₂ seguida de incubação a 37°C, durante 2 horas e a 2°C, durante 18 horas. O precipitado era separado por centrifugação e o sobrenadante foi testado pela prova de anel, usando-se várias diluições de extrato como antígeno. Se anticorpos eram ainda detectáveis, a absorção era repetida.

As imunoprecipitações foram feitas de acordo com OUCHTERLONY¹⁰ e as imunoeletoforeses e gel-eletoforeses, de acordo com GRABAR & WILLIAMS¹¹, usando-se tampão de veronal pH 8,6 $\mu = 0,05$. As faixas foram coradas com reagente de Schiff, segundo URIEL & GRABAR¹².

RESULTADOS

Análise química das amêndoas

As determinações de nitrogênio total, gorduras, glicídios e polifenóis da variedade "Forasteiro" são apresentados no quadro abaixo. Dados obtidos a partir de amêndoas de outras variedades em estudo são essencialmente similares. Pode ser visto que o processo de fermentação não modifica apreciavelmente os teores de nitrogênio e lipídios até que atinja o estágio de fermentação excessiva quando há um significativo decréscimo do nitrogênio. Por outro lado, a fermentação determina uma queda progressiva do conteúdo de glicídios e polifenóis:

*Composição química de vários extratos de amêndoas de cacau **

Amostra	Nitrogênio	Gordura	Glicídios	Polifenóis	Outros
OF ₁₈₂	7,2	47,7	6,3	2,0	36,8
F ₁₄₄	12,0	49,0	10,8	2,4	25,8
PF ₇₂	12,0	50,7	15,3	7,2	14,8
NF	12,0	51,7	19,7	9,8	6,8

* Por 100 g.

Análise cromatográfica do extrato e polpa do fruto

A cromatografia em papel dos extratos de amêndoas NF e polpa do fruto não fermentado revelou duas manchas após tratamento com reagente de antrona, uma, com $R_f = 0,37$, foi denominada "Fração B" e a outra, com $R_f = 0,50$, "Fração A". Após coloração com difenilaminofosfato de anilina (Merck), a "Fração A" apresentou manchas azuis, indicando a existência de ligações 1-4, enquanto que a "Fração B" mostrou manchas marrom, indicando ligações 1-6. Após hidrólise, ambas as frações purificadas determinaram apenas uma mancha com $R_f = 0,41$, correspondente a d-glicose. Os eluatos das manchas cromatográficas correspondentes às duas frações apresentaram uma nítida prova de anel e, quando testados contra o anti-sôro em placas de Ouchterlony determinaram o aparecimento de linhas de precipitação correspondentes.

Separação do antígeno da polpa do fruto

Em virtude de a polpa conter maior proporção das frações "A" e "B" que as sementes, a separação destas frações antigênicas em forma purificada foi feita a partir da polpa "in natura". Preparações de polpa mostraram, em coluna de DEAE-celulose, conter duas frações antigênicas. A primeira fração foi eluída com solução tampão de fosfato, pH 7,4 e mostrou, em cromatografia em papel, um $R_f = 0,50$, igual ao da "Fração A". A segunda foi eluída com solução tampão de citrato, pH = 3,6 e determinou o aparecimento de mancha com $R_f = 0,37$, correspondente à "Fração B". Precipitação fracionada com etanol promoveu a separação dessas frações. Com etanol a 1,5%, foi precipitada a fração com $R_f = 0,50$ ("Fração A"), enquanto que, a 15%, foi precipitada a fração com $R_f = 0,37$ ("Fração B"). Este processo é, entretanto, inferior ao cromatográfico com referência à pureza das frações obtidas, pois que entre elas há ainda um certo grau de mistura.

Quando foram obtidas osazonas das frações "A" e "B", foram observadas duas diferentes formas cristalinas. A osazona da "Fração A" apresentou-se como pequenos cristais quadrangulares com ponto de fusão 183°C, enquanto que a osazona da "Fração

B" apresentou-se como cristais redondos com bordas indentadas com ponto de fusão 198, 5°C. Os hidrolizados das frações "A" e "B" apresentaram osazonas aculiformes correspondentes a glucosazona com ponto de fusão 204, 5°C. As frações "A" e "B" de extratos de amêndoas NF ou polpa de fruto não são dialisáveis contra solução fisiológica ou água destilada, enquanto que por diálise dos extratos PF $\frac{70}{72}$ verifica-se ser dialisada uma fração imunologicamente semelhante à "Fração B", mas com $R_f = 0,63$.

Teor de nitrogênio dos anticorpos nos precipitados específicos

O teor de nitrogênio dos anticorpos nos precipitados específicos de extratos de amêndoas não fermentadas decresceu em relação aproximadamente linear, quando aumentou o tempo de fermentação (Fig. 4). Precipitados de extratos fermentados durante 144 horas não mostraram presente nitrogênio dos anticorpos.

Análise imunológica dos extratos de amêndoas e da polpa do fruto

Coelhos inoculados com extrato NF produziram anti-sôros (anti-NF) que formaram em placas de Ouchterlony duas linhas de precipitação quando testados contra extratos NF, uma linha contra extrato PF e nenhuma contra extratos F ou OF. O extrato PF $\frac{70}{72}$ produziu uma linha de precipitação quando testado contra anti-sôro anti-NF. Esta linha corresponde a um dos componentes ("Fração B") do extrato NF ou da polpa do fruto (Fig. 3). A "Fração B" no extrato PF $\frac{70}{72}$ não difere imunologicamente da "Fração B" presente em extratos NF, a despeito dessas duas frações diferirem em R_f e no comportamento durante a diálise. A determinação do nitrogênio do anti-corpo anti-NF revelou 0,8 a 1,0 mg por cm^3 de anti-sôro quando a mistura de polissacarídeos purificados isolados da polpa do fruto foi utilizada como antígeno. A imunização de coelhos com preparação da polpa do fruto determinou a formação de um anti-sôro anti-M (anti-polpa do fruto) comportando-se similarmente com o anti-sôro anti-NF. O anti-sôro anti-M apresentou 0,8 mg de nitrogênio específico por cm^3 . Finalmente, extratos F e PF $\frac{70}{72}$ não provocaram a formação de anticorpos precipitantes.

A imunoeletroforese apresentou resultados (Fig. 2) em concord6ncia com os de imunodifus6o em placas de Ouchterlony (Fig. 3). Na presen7a de anti-s6ro anti-NF, o extrato NF mostrou duas linhas de precipita76o, o extrato PF, uma e o extrato F, nenhuma. Os dois arcos de precipita76o

observados na imunoeletroforese correspondem a duas faixas cor6aveis pelo reagente de Schiff encontradas em provas paralelas de eletroforese em agar. Uma das faixas localizava-se na origem e a outra orientada em dire76o ao anodo (Fig. 1).

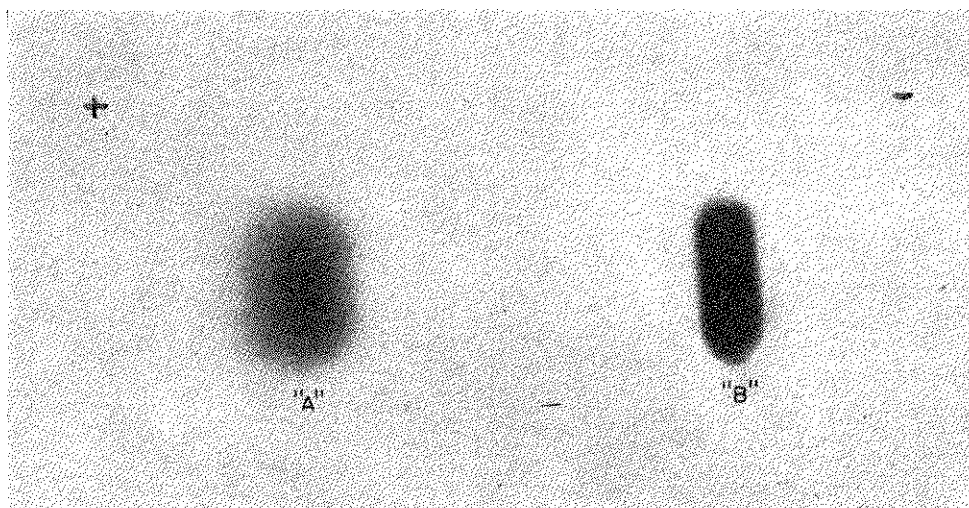


Fig. 1 — Eletroforese em gel de agar das fra76es imunol6gicamente ativas de cacau, reveladas pelo reagente de Schiff. A: "Fra76o A"; B: "Fra76o B". Tempo de migra76o eletrofor6tica, 120 min., 5V por cm.

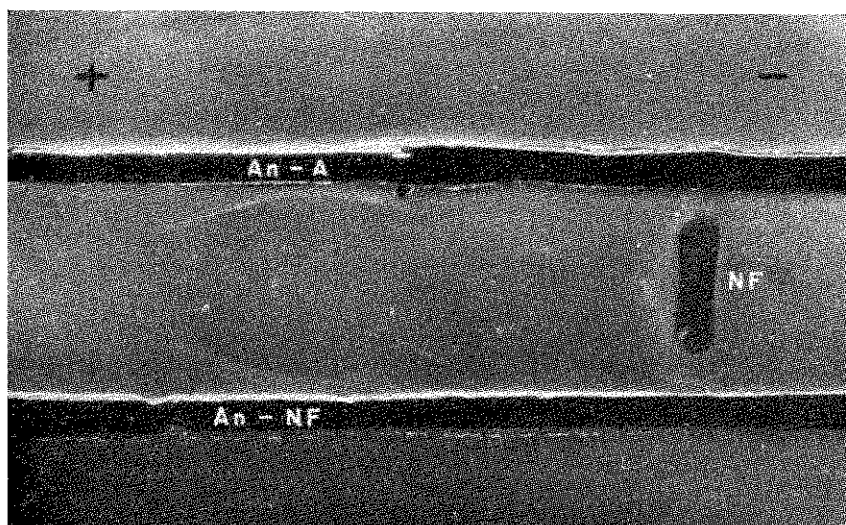


Fig. 2 — Imunoeletroforese de extratos de cacau n6o fermentado (NF). An-A: anti-s6ro anti-NF pr6viamente absorvido com extrato de cacau parcialmente fermentado (PF $\frac{70}{72}$). An-NF: anti-s6ro anti-extrato de cacau n6o fermentado. Migra76o eletrofor6tica, 120 min., 5V por cm.

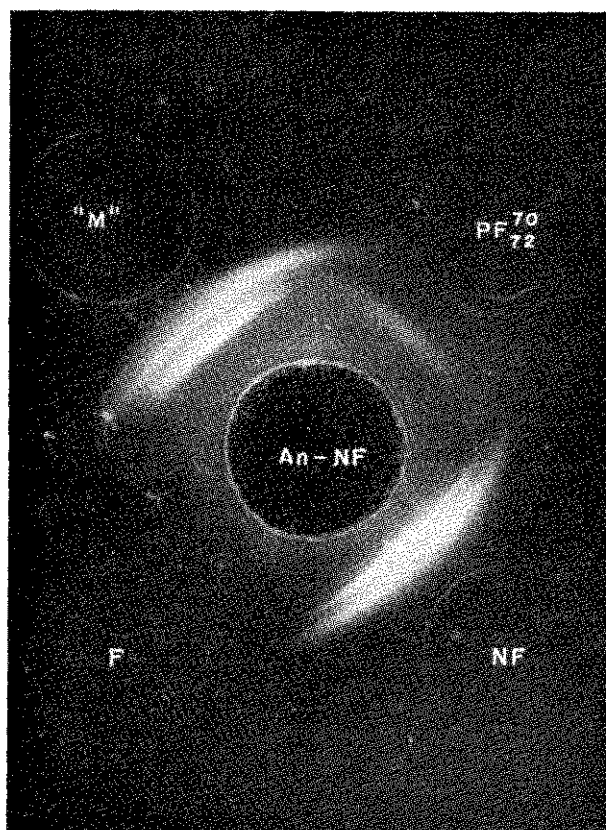


Fig. 3 — Imunodifusão em gel de agar de polpa de cacau e extratos de amêndoas fermentadas, parcialmente fermentadas e não fermentadas. *M*: polpa de cacau. *NF*: extrato de amndoas de cacau não fermentadas. *PF*⁷⁰₇₂: extrato de amêndoas de cacau parcialmente fermentadas. *F*⁷⁰₁₄₄: extrato de amêndoas de cacau fermentadas durante 144 horas. *An-NF*: anti-sôro anti-amêndoas de cacau não fermentadas.

Prova de anel para determinação do grau de fermentação de amêndoas e da polpa do fruto

Provas de anel (imunoprecipitação em tubo capilar) foram feitas por cuidadosa deposição de solução do antígeno sôbre anti-sôro anti-fração "A". O aparecimento de uma definida turvação na interfase foi considerado como resultado positivo. Uma prova de anel negativa indica ausência da "Fração A" e êste resultado foi interpretado como correspondendo a amêndoas de boa qualidade na classificação de De WITT¹,

em virtude dos resultados da análise imunológica das amêndoas e polpa do fruto. Anti-sôro anti-NF pode ser absorvido com extratos de amêndoas parcialmente fermentadas (PF), que prêviamente tenham exibido sômente uma linha em placas de Ouchterlony. Anti-sôro anti-NF absorvido com "Fração B" purificada determinou essencialmente os mesmos resultados, mas o processo é mais complicado. Anti-sôro anti-fração "A" pode ser obtido pela inoculação de "Fração A" purificada, tornando, assim, desnecessária a sua absorção.

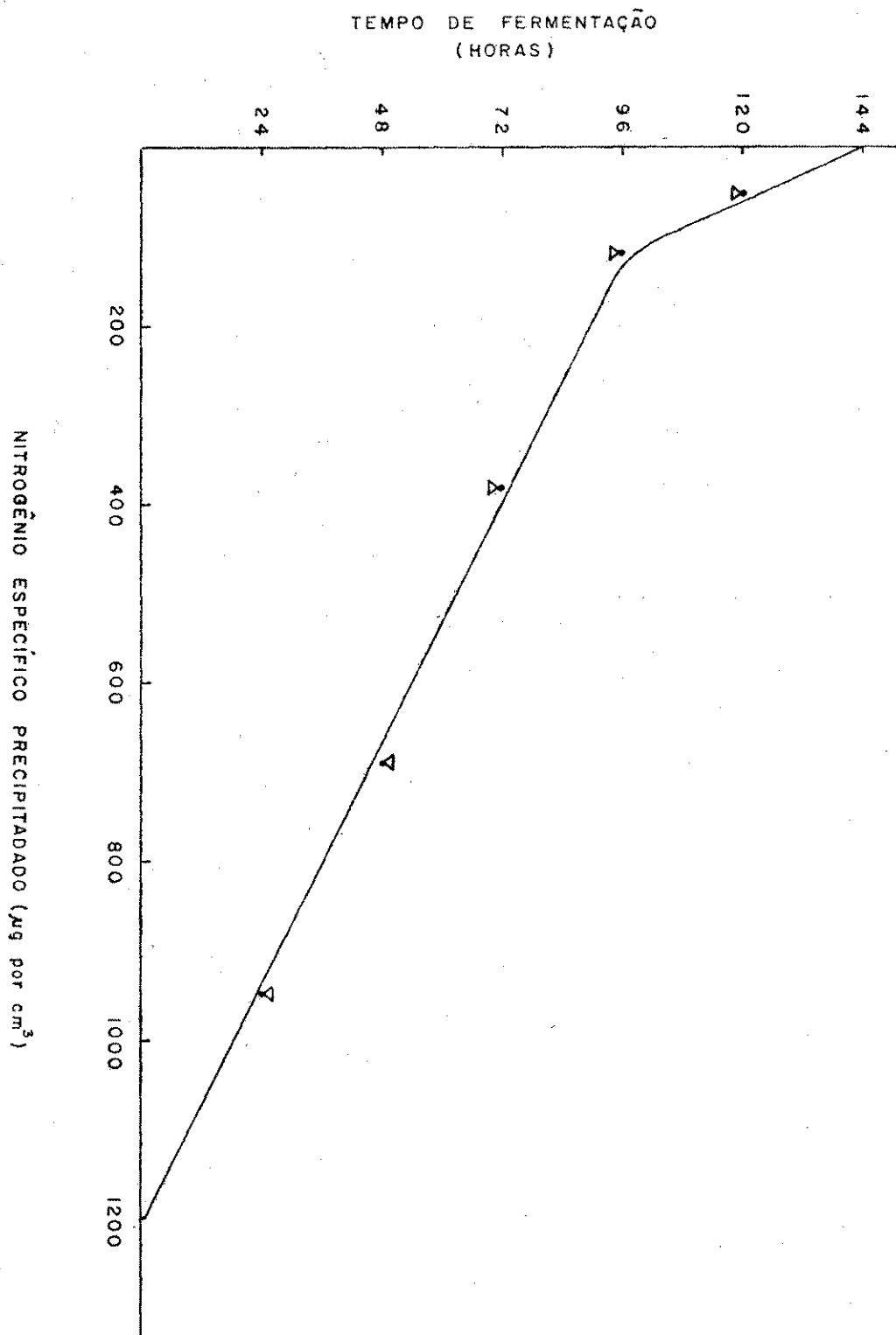


FIGURA 4

DISCUSSÃO

O teor de compostos glicídicos e polifenólicos decresce à medida que aumenta o grau de fermentação. O paralelismo entre o decréscimo gradual do teor de glicídios e a diminuição progressiva da atividade imunológica é explicável pela natureza polissacáridica dos antígenos. A natureza glicídica foi evidenciada por coloração específica com reagente de Schiff do material submetido a eletroforese em gel, por cromatografia e por hidrólise ácida.

A ausência de reações cruzadas entre os dois antígenos encontrados em extratos de amêndoas não fermentadas ou na polpa de fruta não fermentada pode ser atribuída ao fato de que um desses antígenos, denominado "Fração A", contém ligações 1-4, enquanto que o outro, "Fração B", contém ligações 1-6, a despeito de ambos serem polímeros de d-glicose, como demonstrado pela formação de osazonas e pela análise cromatográfica.

Por diálise, foi evidenciado que o único antígeno ("Fração B"), encontrado no extrato de amêndoas parcialmente fermentadas é constituído por moléculas menores que as da "Fração B" encontrado em extratos não fermentados.

Tal fato poderia explicar a incapacidade da "Fração B", presente nos extratos parcialmente fermentados, em provocar a formação de anticorpos precipitantes no coelho. Uma vez que a fermentação das amêndoas e da polpa do fruto resulta de ação enzimática, pode-se presumir que inicialmente há a despolimerização de uma macromolécula e o produto resultante na fase inicial deste processo não pode estimular a produção de anticorpos, embora, como um hapteno, possa dar reação de precipitação. Posteriormente, quando a fermentação foi completada, não se observa imunoprecipitação. Parece claro que a fermentação das amêndoas destrói as moléculas antigênicas e também modifica vários componentes das amêndoas e da polpa dos frutos. Esses componentes são necessários para o crescimento dos microrganismos responsáveis pela produção de enzimas que, agindo, produziram o sabor de chocolate, e a produção de ácido acético que permite a permeabilização do tegumento (LEVANON & ROSSETINI¹³).

É sabido que a fermentação excessiva das amêndoas produz NH_3 . Isto provavelmente acontece porque os principais fatores do crescimento microbiano são carboidratos (fermentação) e, quando exauridas estas substâncias, enzimas de adaptação passam a metabolizar nitro-compostos (putrefação). Esta hipótese é reforçada, no presente trabalho, pelo decréscimo do teor de nitrogênio nos extratos de amêndoas excessivamente fermentadas. O conteúdo antigênico das amêndoas decresce à medida que progride a fermentação. Primeiramente, a "Fração A" foi inativada do ponto de vista de imunoprecipitação e, posteriormente, também a "Fração B". Já foi descrito que extratos bem fermentados de amostras comerciais de amêndoas não contêm "Fração A", diferindo assim das insuficientemente fermentadas (Levanon & Martelli).

Parece que o desaparecimento do antígeno aqui denominado "Fração A" indica o término do estágio de biofermentação descrito por Levanon & Rossetini. Neste momento, as amêndoas estão no ponto de serem retiradas das caixas ou dos montes de fermentação e inicia-se a "cura". Parece, assim, que a presença ou a ausência da "Fração A" pode ser usada para determinar o grau de fermentação das amêndoas. Levanon & Martelli testaram partidas comerciais de amêndoas de boa qualidade e evidenciaram unicamente uma linha de precipitação em placas de Ouchterlony. O antígeno correspondente ("Fração B", de Levanon & Martelli) não estimulou a produção de anticorpos e era dialisável. Mesmo concentradas vinte vezes, as partidas de extratos bem fermentados testados no presente trabalho deixaram de apresentar o antígeno correspondente à "Fração A". É importante mencionar que boas amostras comerciais usadas por Levanon & Martelli eram constituídas por 70-90% de amêndoas bem fermentadas e que as amostras usadas no presente trabalho foram fermentadas no laboratório, obtendo-se, assim, produto de grau uniforme e conhecido de fermentação.

A imunoprecipitação em gel, proposta por Levanon & Martelli, requer tempo relativamente longo, cerca de 24 horas, enquanto que a prova de anel empregada no presente estudo requer somente alguns minutos. O citado teste pode ser útil em duas das fases da preparação comercial de amêndoas para uso industrial:

1. quando as amêndoas estão ainda nas caixas ou nos montes de fermentação, a prova em causa determina o término da fase de biofermentação;
2. as amêndoas “curadas” poderão ser testadas para determinar-se se a fermentação prévia foi suficiente, uma vez que a quimiofermentação não destrói os antígenos (Levanon & Martelli).

RESUMO

Amêndoas e polpa do fruto de cacau foram submetidas a fermentação em laboratório, reproduzindo-se as condições requeridas no processamento rural.

Comparando-se extratos de amêndoas fermentadas, de amêndoas parcialmente fermentadas e de amêndoas bem fermentadas, foi verificado paralelismo entre o gradual decréscimo do teor de glicídios e a progressiva diminuição da atividade imunológica.

A natureza glicídica dos antígenos foi evidenciada por coloração com reagentes de Schiff no material submetido a gel-eletroforese, por cromatografia e por hidrólise ácida. Um dos antígenos, “Fração A”, presente em extratos de amêndoas não fermentadas apresenta ligações 1-4, enquanto que o outro, “Fração B”, ligações 1-6.

Por diálise, verificou-se que o único antígeno (“Fração B”) encontrado em extratos de amêndoas incompletamente fermentadas é constituído por moléculas menores que a “Fração B” encontrada em extratos de amêndoas fermentadas.

Amêndoas adequadas para a indústria de chocolate não mostram componentes imunogênicos.

É proposta uma prova em anel simples e rápida, para determinação do grau de fermentação (qualidade do produto rural) de amêndoas de cacau.

Agradecimentos — Os autores agradecem o material fornecido pelo Dr. Nelson Maravilhas e Dr. Paulo T. Alvim, da CEPLAC, Itabuna, Bahia, e a ajuda na preparação deste manuscrito dada pelo Dr. Juan J. Angulo, do Instituto Adolfo Lutz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEVANON, Y. & MARTELLI, H. L. — Antigenic properties of non-fermented cocoa beans. *Biochim. Biol. Sper.* (Padova) 3, 3, 1964.
2. LEVANON, Y. — A serologic method for testing degree of fermentation in cocoa. *Biochim. Biol. Sper.* (Padova). No prelo.
3. De WITT, K. W. — The visual assessment of cured cocoa. *Trop. Agric. Trin.* 30: 228, 1953.
4. TREVELYAN, W. E. & HARRISON, J. S. — Studies on yeast metabolism. *Biochem. J.* 50, 298, 1952.
5. FORSYTH, W. G. C. — Cacao polyphenolic substances. *Biochem. J.* 51:516, 1952.
6. ELEC, A. & SOBOTKA, H. J. — The Kjeldahl-Pregl method applied to nitro compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* 48: 501, 1926.
7. SUNDERWIRTH, S. G.; OLSON, G. G. & JOHNSON, G. — Paper chromatography-anthrone determination of sugars. *J. Chromat.* 16:176, 1964.
8. GIRI, K. V. & NIGAM, V. N. — Separation of simple saccharides and oligosaccharides by circular paper chromatography. *Naturwissenschaften* 40:343, 1953.
9. FREUND, J. — Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.* 1:291, 1947.
10. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reaction in gels. *Ark. Kemi. Miner. Geol.* 26B, 14, 1949.
11. GRABAR, P. & WILLIAMS Jr., C. A. — Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta* 17:67, 1955.
12. URIEL, J. & GRABAR, P. — Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immunoelectrophorétique en milieu gélatiné. *Ann. Inst. Pasteur*, 90: 427, 1956.
13. LEVANON, Y. & ROSSETINI, S. M. O. — A laboratory study of the farm processing of cocoa beans for industrial use. No prelo.

Recebido para publicação em 3 de agosto de 1966.

ESTUDOS SOBRE A *LEPTOSPIRA WOLFFII* EM SÃO PAULO (1)

LEPTOSPIRA WOLFFII IN SÃO PAULO, BRAZIL

MARCELO OSWALDO ALVARES CORRÊA (2)

SABURÓ HYAKUTAKE (2)

VAIL NATALE (2)

PAULO A. AYROSA GALVÃO (3)

HÉLIO DE ALMEIDA AGUIAR (4)

SUMMARY

The occurrence of two cases of leptospirosis due to *Leptospira wolffii*, with the isolation of this organism from spinal fluid in one case is reported.

Six out of 150 sera from individuals living in the same area gave positive agglutination tests for *L. wolffii*. Serological examination results of animals caught in the area are presented.

Leptospira wolffii was isolated from the kidneys of one specimen of *Akodon arviculoides* and from one non-identified rodent; this is the first isolation of *L. wolffii* registered in the American continent.

I — INTRODUÇÃO

A *Leptospira wolffii* foi isolada em 1937 do sangue de um paciente por Wolff, em Sumatra, que a designou provisoriamente sob o n.º 3705, sendo identificada como uma nova leptospira por SCHÜFFNER, GISPEN & BOHLANDER¹ (1939) com a denominação de *L. wolffii*; sua constituição antigênica foi considerada semelhante à *L. saxkoebing* e *L. sejrøe*, integrando com numerosas outras o grupo "hebdomadis", o qual, de acordo com a mais recente publicação do "WHO Scientific Group on Research in Leptospirosis"² (1965), está assim constituído como o demonstra o quadro I.

A *L. wolffii* é de incidência restrita pois, até o presente momento, sua ocorrência tem sido registrada em raras ocasiões, apesar do enorme volume de estudos e pesquisas sobre leptospiroses que se efetuam em numerosos

países e nas mais diferentes regiões do mundo.

Com efeito, após o registro inicial de Wolff, em 1937, somente em 1954, TRIMBLE³, em artigo sobre "Leptospirosis in Malaya", relata a ocorrência de nova infecção humana causada pela *L. wolffii*; em 1957, o mesmo TRIMBLE⁴, oficial das forças armadas inglesas, publica "Clinical aspects of Leptospirosis in Malaya", ocasião em que, dentre o total de 236 casos observados, três foram causados pela *L. wolffii*, de acordo com as provas sorológicas efetuadas. Não houve possibilidade de se esclarecer se o caso, registrado em 1954 por Trimble, faz parte dos três que apresentou em 1957, mas tudo leva a concluir pela afirmativa. Em nenhum destes casos houve isolamento de nova amostra de *L. wolffii*.

(1) Trabalho leureado com o Prêmio "Adolfo Lutz" de Ciências Biológicas, Bioquímicas e de Saúde Pública, de 1966.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"

(4) Do Departamento Estadual da Criança.

QUADRO I

Grupo	Sorotipo	Sub-sorotipo	Amostra tipo
<i>hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>	<i>hebdomadis nona</i>	Hebdomadis
	<i>hebdomadis</i>		Nona
	<i>kambale</i>		Kambale
	<i>kremastos</i>		Kremastos
	<i>worsfoldi</i>		Worsfold
	<i>jules</i>		Jules
	<i>borincana</i>		HS-622
	<i>kabura</i>		Kabura
	<i>mini</i>		Sari
	<i>mini</i>		Szwajizak
	<i>mini</i>		LT 117
	<i>hardjo</i>		Hardjoprajitno
	<i>wolffii</i>		3705
	<i>medanensis</i>		Hong HC
	<i>sejroe</i>		M 84
	<i>sejroe</i>		1627 Burgas
	<i>maru</i>		CZ 285B
<i>saxkoebing</i>	Mus 24		
<i>saxkoebing</i>	Nero		
<i>haemolyticus</i>	haemolyticus		
<i>haemolyticus</i>	ricardi		
<i>perameles</i>	Richardson		
<i>polonica</i>	Bandicoot 343		
	493 Poland		

Em decorrência ainda de operações bélicas na Malaya, Tailândia e Bornéu de forças militares inglesas e norte-americanas, estudos foram efetuados por WISSEMAN *et alii*⁵ (1955), sendo as leptospiros então isoladas de doentes, de animais silvestres e domésticos enviados a ALEXANDER *et alii*⁶ do Walter Reed Army Medical Center", Washington, que as classificou, após minuciosos estudos sorológicos sobre as suas respectivas constituições antigênicas, encontrando, dentre as demais, cinco amostras de um biotipo incompleto da *L. wolffii* que designou, por tal motivo, por *L. wolffii* A, cuja amostra padrão é a denominada R7, sendo duas de origem humana e três provenientes de roedores (*Rattus mullerei* e *R. sabanus*). Em novo estudo de 110 amostras isoladas de doentes daquela mesma região — Malaya — ALEXANDER *et alii*⁷ (1957) encontraram sete amostras da mesma *L. wolffii* A.

ALSTON & BROOM⁸ (1958) informam que o principal vetor da *L. wolffii* é desconhecido, que ela teria sido isolada de cães da Indonésia, de acordo com SCHÜFFNER *et alii*¹ (1939) e que através de evidência sorológica haviam sido considerados infectados os animais *E. spelacea* e *R. whiteheadi*.

Na bibliografia existente, são apenas esses os registros que encontramos sobre a

ocorrência da *L. wolffii* no homem; a esse respeito, consultamos o próprio Prof. J. W. Wolff do "Institute of Tropical Hygiene and Geographical Pathology", Amsterdam, Holanda — o mesmo que a isolou em 1937, em Sumatra — ao que nos respondeu em carta datada de 1-12-65: "I do not know of other isolations of *L. wolffii* or serological indications for this serotype than those publications mentioned by you".

É bem compreensível, pois, o interesse que nos despertou a ocorrência de leptospirose por *L. wolffii* em dois pacientes, o que nos levou a proceder aos estudos clínicos e epidemiológicos relatados no presente trabalho.

II — MATERIAL E MÉTODOS

O nosso material é constituído originalmente por dois doentes e pelos contactos humanos e animais nos locais de possível aquisição da doença. Foi ainda pesquisada a existência de leptospira na água de uma das possíveis fontes de infecção.

Os métodos diagnósticos utilizados foram os seguintes:

1) *Isolamento de leptospira do líquido cefalorraquidiano* através de cultura em meio

de Fletcher e Korthof modificado e inoculação, de 2 ml, via intraperitoneal em cobaio jovem.

2) *Isolamento de leptospira da água suspeita*, após filtração em filtro Millipore n.º 17, com aspiração a vácuo, semeadura em meio de Fletcher e inoculação por via intraperitoneal em cobaio jovem.

3) *Sêro aglutinação para diagnóstico das leptospiroses* — Retirado o sangue do paciente por punção venosa e colocado em tubo de ensaio, após a retração do coágulo, procede-se à separação do sêro com o qual se prepara uma diluição a 1:50, em solução tampão de fosfatos, da qual se distribuem 5 gotas em cada escavação das placas de porcelana utilizadas neste processo. Como antígenos, usamos culturas em meio de Korthof modificado das seguintes leptospiroses, às quais se adiciona formalina, na proporção de 3 gotas para cada 3 ml de cultura:

QUADRO II

Sorotipo	Amostra padrão
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	RGA
" "	M 20
" "	N 3294
<i>L. grippotyphosa</i>	Moskva V
<i>L. canicola</i>	Hond Utrecht IV
<i>L. pomona</i>	Pomona
<i>L. australis</i>	Ballico
<i>L. bataviae</i>	Swart
<i>L. sejrøe</i>	M 84
<i>L. pyrogenes</i>	Salinem
<i>L. hyos</i>	Mitis Johnson
<i>L. saxkoebing</i>	Mus 24
<i>L. andamana</i>	C H 11
<i>L. autumnalis</i>	Akiyani A
<i>L. djasiman</i>	Djasiman
<i>L. sentot</i>	Sentot
<i>L. wolffii</i>	3705
<i>L. javanica</i>	Veldrat Batavia 46
<i>L. hebdomadis</i>	Pasteur

Colocam-se 5 gotas de cada antígeno na respectiva escavação onde já havia 5 gotas de sêro diluído a 1:50 de tal maneira que a diluição final é de 1:100, título êste eleito como de valor diagnóstico significativo. Colocam-se as placas em estufa a 28°C du-

rante 2 horas ao fim das quais se procede à leitura em campo escuro, retirando-se as amostras com alça de platina e colocando-as em lâminas.

A sêro-aglutinação é considerada positiva quando pelo menos cinqüenta por cento das leptospiroses do campo microscópico se apresentam aglutinadas.

Em fase ulterior, procede-se à titulação dos soros positivos para determinada leptospira, preparando-se diluições sucessivas do sêro a partir de 1:100, e usando como antígeno a cultura formolizada da leptospira que aglutinou na prova de triagem. O restante da técnica é igual à que foi descrita anteriormente.

4) *Isolamento de leptospiroses em rins de animais* — Após a captura por meio de armadilhas, os animais eram transportados ao laboratório onde, anestesiados pelo éter, eram sacrificados colhendo-se sangue por punção cardíaca para efetuar provas de sêro-aglutinação rotineiras emulsionadas em solução salina tamponada estéril, em suspensão a cerca de 10%, utilizando-se o método de semeadura de diluições progressivas aconselhado por MINETTE⁹ (1964).

5) *Métodos utilizados no estudo clínico* — Foram usados os seguintes métodos: *Proteínas totais e frações*, KINGSLEY¹⁰ (1942); *Prova de Hanger* (cefalina colesterol), HANGER¹¹ (1938); *Reação de citrato de ferro amoniacal*, ILCE, DODICA & IOANOVICI¹² (1938); *Fosfatase alcalina*, KING & ARMSTRONG¹³ (1934); *Colesterol*, SPERRY & WEBB¹⁴ (1958); *Bolirrubinas*, MALOY & EVELYN¹⁵ (1934); *Timol*, SHANK & HOAGLAND¹⁶ (1946); *Seromucóide*, WINZLER *et alii*¹⁷ (1948); *Transaminase glutâmico pirúvica*, WRONBLEWSKI & LA DUE¹⁸ (1956); *Uréia*, ADDLS *et alii*¹⁹ (1947); *Prova de Jirgl*, JIRGL²⁰ (1957).

III — ESTUDO CLÍNICO

CASO I — *Observação clínica* — Paciente A. L., sexo masculino, 42 anos de idade, casado, branco, motorista profissional, procurou-nos no dia 26/7/65, dizendo estar doente há 8 dias e tendo seus sintomas aparecido súbitamente. Tinha febre intensa e dores musculares generalizadas,

sendo estas mais intensas nos membros inferiores e quadris. Foi medicado com Indocid, tendo melhorado as dores. Teve a seguir "retenção urinária" e quadro diarrêico. Após 5 dias de doença notou que sua pele e olhos estavam amarelos e a urina vermelha. Como sua doença progredisse, procurou socorro médico.

Refere ter tido ferimento exposto no pé 3 semanas antes do início de seus sintomas, quando estava trabalhando em terreno de sua propriedade, aonde passa um córrego. Na parte baixa do terreno estava plantando

agrião. Já com o pé ferido entrou em uma coleção de água para retirar um preá morto que estava contaminando seu terreno.

Ao ser examinado pela primeira vez, apresentava bom estado nutritivo, tendo temperatura de 39,1°C, pressão arterial 130/90 e pulso 100/min.

Paciente com icterícia rubínica de pele e mucosas, tendo em algumas áreas sufusões hemorrágicas de pele. Mialgia discreta. Injeção conjuntival. Coração rítmico e com bulhas abafadas. Pulmões semiolôgicamente normais. O abdome era flácido

Caso I

EXAMES LABORATORIAIS	DATA			
	4/8	6/8	10/8	12/8
Séro-aglutinação para <i>Leptospira wolffii</i>	1/400	1/800	1/4 800	1/6 400
Reação de Sabin-Feldman	1/1024	...
SANGUE				
Reação de citrato de ferro amoniacal	Neg.		Pos. (++)	
Transaminase glutâmico pirúvica (u. S. F./ml)	72		60	
Serumocóide (mg/ml)	33,9		23,4	
Prova de Jirgl	Pos. (+++)		Neg.	
Bilirrubina direta imediata (mg/100ml)	1,8		0,4	
Bilirrubina direta total (mg/100ml)	4,2		1,6	
Bilirrubina indireta (mg/100ml)	1,6		0,8	
Bilirrubinas totais (mg/100ml)	5,8		2,5	
Fosfatase alcalina (U. K. A. %)	16,4		17,2	
Uréia (mg/100ml)	59		48	
Colesterol total (mg/100ml)	204		260	
Hanger (Cefalina-colesterol)	Neg.		Pos. (+++)	
Timol (u. Mac-Lagan)				
Turvação	2,1		5,0	
Floculação	Neg.		Neg.	
Proteínas totais (g/100ml)	6,1			
Albumina (g/100ml)	3,6			
Globulinas (g/100ml)	2,5			
Glóbulos vermelhos (mm ³)	4 000 000			
Hemoglobina (g/100ml)	12,5			
Leucocitos (mm ³)	12 000			
URINA				
Densidade	1 400			
Subst. redutoras	Neg.			
Proteínas	Pos.			
Hemácias/campo	2			
Leucocitos/campo	8			
Cilindros/campo				
Hialinos	2			
Granulosos	3			
Urubilinogênio	1/150			
Bilirrubina	Pos.			

... Exame não efetuado.

e discretamente doloroso à palpação profunda. O fígado era palpável a 2 cm abaixo do rebordo costal e o baço não era palpável nem percütível. Semiótica do sistema nervoso central era normal. O paciente evoluiu muito bem, tendo sido liberado para atividades moderadas, 15 dias após o início do tratamento, sem icterícia ou qualquer sintoma ou sinal de doença.

Durante os 15 dias de internação, teve diurese de 24 horas que variavam entre 1 900 ml e 3 250 ml. Após o 4.º dia, sua temperatura máxima passou a ser 37°C. O paciente foi medicado com penicilina, durante 14 dias.

O quadro clínico e laboratorial do presente caso, bem como sua evolução, seguem aquilo que temos usualmente encontrado em doentes com leptospirose na forma icterica, com fenômenos hemorrágicos discretos. O paciente sai da fase de oligúria, com diurese grande, até cessar o quadro de necrose tubular recorrente.

A preocupação terapêutica maior é de criar um bom estado de hidratação e administrar antibiótico ativo contra as leptospirosas (Penicilina ou tetraciclina).

CASO II — *Observação clínica* — Paciente D. A. M., sexo masculino, 135 anos

Caso II

EXAMES LABORATORIAIS	D A T A			
	11/10	15/10	21/10	28/10
Sôro-aglutinação para <i>Leptospira wolffii</i>	1/200	...	1/800	1/800
Reação de Widal	Neg.
Hemocultura	Neg.
LIQUOR				
Células/mm ³	5	10	50	40
Hemácias/mm ³	Incont.	3 200	310	445
Aspecto	Xantocr.	Xantocr.	Xantocr.	Xantocr.
Mononucleares (%)	...	100	100	100
Neutrófilos	0	0	0	0
Proteínas (mg/100ml)	110	142	57	55
Cloretos (mg/100ml)	...	700	710	650
Glicose (mg/100ml)	64	50	51	31
Uréia (mg/100ml)	...	34
Pandy	Pos.	Pos.	Opal.	Opal.
Pesquisa da leptospira em campo escuro	Pos.
Cultura da leptospira	Pos.
SANGUE				
Seromucóide (mg/ml)	...	15,1	24,9	15,9
Transaminase glutâmico pirúvica (u. S. F./ml)	12			
Bilirrubinas totais (mg/100ml)	0,2			
Uréia (mg/100ml)	27			
Colesterol total (mg/100ml)	218			
Hanger (Cefalina-colesterol)	Pos.			
Timol (u. Mac-Lagan)	5			
Turvação	Neg.			
Foculação	5			
Proteínas totais (g/100ml)	7,7			
Albumina (g/100ml)	4,6			
Globulina (g/100ml)	3,1			
Glóbulos vermelhos (mm ³)		4 780 000		
Hemoglobina (g/100ml)		15,0		
Leucocitos (mm ³)		6 000		

... Exame não efetuado

de idade, casado, branco, faxineiro do I. A. P. C., procurou-nos no dia 11/10/1966, dizendo estar doente há 8 dias, com febre e indisposição geral, que piorou após 4 dias quando teve forte cefaléia durante todo o dia, tendo perdido a consciência e caído por tempo que não pode precisar. Desde então vem tendo cefaléia, vômitos e febre alta. Com a queda, ficou com os olhos arroxeados.

O exame físico revelou paciente em bom estado geral, não icterico e com hematoma palpebral. A temperatura era de 38,5°C, pulso 110/min. e a pressão arterial 80/40. Pele com discreto exantema no rosto e parte alta do tórax. Corações e pulmões, normais. Fígado, a 4 cm do rebordo. Baço não palpado ou percutido. Paciente consciente, queixando-se de cefaléia, mas sem sinais de comprometimento do sistema nervoso central, tendo motricidade, sensibilidade, equilíbrio, coordenação, reflexos profundos e pupilares, conservados. Ausência de sinais indicativos de comprometimento meningeano. Tendo em vista a queixa de cefaléia, foi o paciente submetido a punção líquórica, que revelou liquor hemorrágico e levemente xantocrômico após centrifugação.

O paciente teve boa evolução clínica, sem sinais de comprometimento renal ou hepático, tendo apresentado discreta rigidez de nuca no 4.º dia de internação. Foi medicado com Penicilina durante 14 dias.

A forma meningea pura de leptospirose humana é menos comumente encontrada em nosso meio. O síndrome meningeano puro tem sido por nós encontrado associado a várias leptospirosas, sendo a mais comum a *L. canicola* e *L. icterohemorrhagiae*. A evolução dos pacientes é bastante favorável, não havendo normalmente sinais de comprometimento renal. O quadro líquórico normalmente se torna mais comprometido na segunda semana da doença. O presente caso não fugiu à regra, tendo uma evolução clínica boa, apesar da demora em normalizar o quadro líquórico, o que pode ser consequência do trauma craniano que sofreu posteriormente ao início da doença.

IV — LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

1. NA VILA IRACEMA ROSA

a) *Pesquisa de leptospira na água* — Relatou-nos o paciente A. L. que estava

construindo sua residência na Vila Iracema Rosa, à Rua Iracema Rosa, a qual termina em beco sem saída junto ao morro cujo espigão demarca a separação com o território do Hórto Florestal da Cantareira; no fundo do terreno passa um riachinho que desce do morro e do qual, através de desvio de parte da água, obteve o paciente a formação d'uma pequena coleção d'água para diversão das crianças. Informou, ainda, o paciente, após o interrogatório adequado, que num domingo, alguns dias antes de adoeecer, estivera com os pés dentro desse lago, procedendo à sua limpeza, ocasião em que cortou um dos pés, acrescentando que na água havia um animal morto, mais precisamente, uma preá, animal esse que retirou da água, jogando-o no mato vizinho. Procuramos então visitar o mais breve possível o local referido, constatando "in loco" as suas condições topográficas e sanitárias e cuidando de colhêr a água do pequeno lago do quintal, bem como deixar armadilhas adequadas para a captura de roedores e pequenos animais da mata.

Na tentativa de isolamento de leptospira da água e no meio de Fletcher, após três semanas, foi observado o crescimento de uma cêpa que, após as provas de soro-aglutinação cruzada com os séros padrão de que dispúnhamos, pareceu-nos ser semelhante à *L. pyrogenes*, enviando-a juntamente com as demais amostras isoladas, das quais daremos notícia posteriormente, ao Prof. B. Babudieri do Laboratório de Referências de Leptospiroses da O. M. S., do Instituto Superiore di Sanità, Roma, para sua identificação definitiva. Após a remessa de nôvo repique da amostra isolada da água, informou-nos o Prof. Babudieri, em carta datada de 28/12/66, que se tratava provavelmente, de uma leptospira saprófita da água.

b) *Inquérito sorológico em moradores da vila* — Em face da raridade da ocorrência da *L. wolffii* e ao mesmo tempo em que procedíamos à captura de possíveis animais transmissores daquela leptospira, no provável foco da Rua Iracema Rosa, procedemos a um inquérito sorológico entre os moradores dessa rua, ou melhor, da localidade em que o paciente A. L. estava construindo sua futura moradia. Conforme demonstram as fotografias, as residências se distribuem ao longo dos dois lados da rua e na encosta bem íngreme do morro em cujo espigão fica o limite do Hórto Florestal da

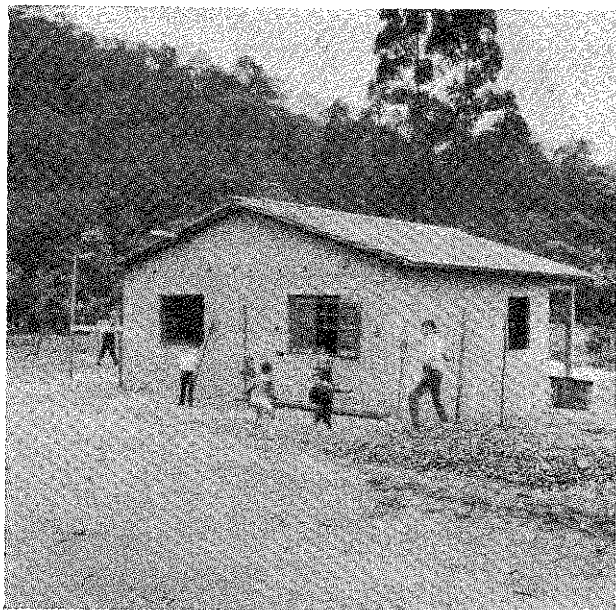


Fig. 1 — Residência em construção, do paciente A. L., na Rua Iracema Rosa. Ao fundo, as árvores que se continuam com a reserva florestal do Hórto.

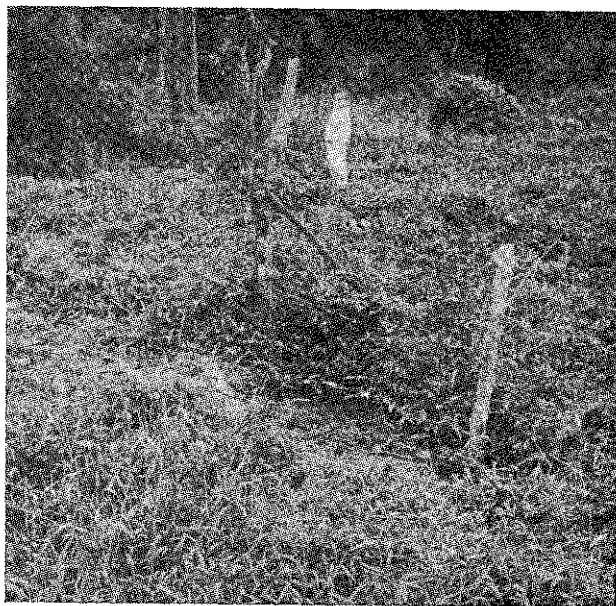


Fig. 2 — O riachinho que, descendo do morro, passa pelo fundo do terreno da residência de A. L. e com cujas águas foi feito um pequeno laguinho.

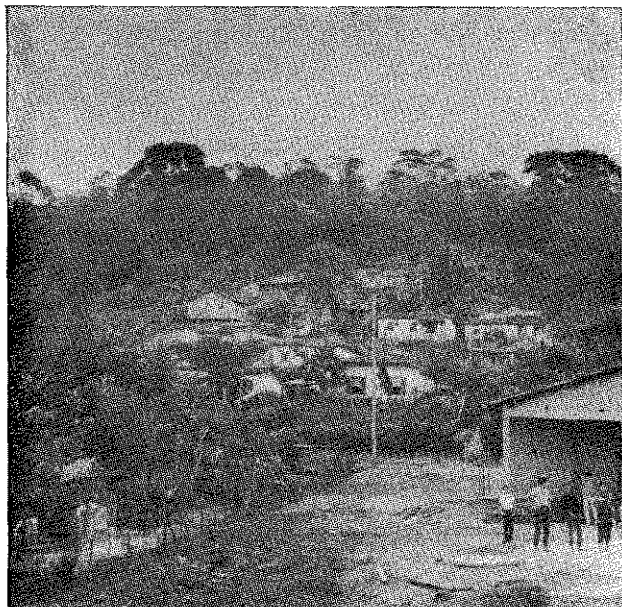


Fig. 3 — Fotografia tirada do fundo da casa de A. L.,
mostrando a distribuição de parte das casas na encosta
do morro em cujo espigão, coberto de arvoredo, passa a
divisa do Hôrto Florestal de S. Paulo.



Fig. 4 — Moradia de E. B. (11 anos) localizada na Rua
Iracema Rosa que aí termina, divisando-se a mata
próxima.

Cantareira. Existe, pois, contigüidade íntima entre a zona residencial e a zona florestal e, por conseguinte, contato íntimo entre a fauna florestal, os moradores e os animais domésticos da rua Iracema Rosa; acresce que as crianças e jovens com frequência incursionam as matas vizinhas. Existe ainda o riachinho que, provindo da floresta, desce o morro e passa pelos fundos da moradia de A. L.

Inicialmente fizemos provas de sôro aglutinação com material retirado da espôsa e dos seis filhos do paciente A. L., todos com resultados negativos; a cachorrinha da família (Diana) apresentou sôro-aglutinação positiva a 1:800 para *L. icterohaemorrhagiae*.

No quadro seguinte estão expostos os resultados do inquérito sorológico efetuado entre os moradores da Rua Iracema Rosa, num total de 72, pertencendo 41 ao sexo feminino e 31 ao sexo masculino:

QUADRO III

Grupo etário	Sôro-aglutinação para <i>L. wolffii</i>	
	Positiva	Negativa
até 6 anos	0	13
de 7 a 14 anos	3*	26
de 15 a 20 anos	0	4
de mais de 21 anos	2**	24
Total — 72	5	67

* Títulos positivos a 1:100.

** Títulos positivos a 1:200.

Registramos, pois, 5 pacientes em que a sôro-aglutinação foi positiva para *L. wolffii*, dos quais submetemos 4 a um breve exame clínico, que resumimos a seguir:

R. A. P. — 14 anos, branco, masculino; exame clínico em 2/9/65. Ficou doente há cerca de 3 meses, com febre, dor no corpo e vômitos; a côr da urina não se alterou. Não teve icterícia e esteve acamado por dois dias.

Ao mesmo tempo, seu irmão Jair adoeceu com sintomas semelhantes, tendo a sôro-aglutinação, efetuada em agosto de 65, sido

positiva para *L. sentot*, a 1:100. Bom estado geral, mucosas coradas. Bulhas cardíacas, normais. P. A. 110-70. Fígado palpável a 2 dedos do rebordo costal, doloroso. Baço e cólons, nada digno de nota. Sôro-aglutinação positiva para *L. wolffii*, a 1:200.

E. B. — 11 anos, branco, masculino. Em janeiro de 1966 teve um episódio febril com vômitos e diarréia, ocasião em que ficou com as escleróticas amareladas. Mucosas coradas. Bulhas cardíacas, normais. P. A., 110-70. Fígado palpável a 1 dedo do rebordo costal. Sôro aglutinação positiva para *L. wolffii*, a 1:200.

A. D. B. — 9 anos, branco, masculino. Nega qualquer antecedente doentio. Ao exame clínico, nada digno de nota. Sôro-aglutinação para *L. wolffii* positiva, a 1:100.

L. P. — 48 anos, branco, masculino, casado, tio de R., e J. A. P. Não se recorda de nenhum episódio febril ou infeccioso nos últimos meses; reside há 5 anos no local. Ao exame clínico, mucosas visíveis e bom estado geral. Bulhas cardíacas, normais. P. A., 140-80. Fígado, a 1 dedo do rebordo costal direito. Sôro aglutinação para *L. wolffii*, positiva a 1:100.

Não conseguimos examinar a paciente M. A. M. P., branca, feminina, cuja aglutinação foi positiva para *L. wolffii*, a 1:100. Houve ainda outro paciente, G. G., com 14 anos de idade, cuja sôro-aglutinação foi positiva para *L. icterohaemorrhagiae*, a 1:400.

c) *Pesquisa de leptospira e de sôro-aglutinação em animais* — Além do inquérito sorológico, impunha-se a pesquisa de leptospiros em animais capturados na Vila, pelas técnicas previamente descritas.

As carcaças dos animais foram enviadas ao Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura, para fins de classificação, onde três exemplares lamentavelmente se extraviaram, de um dos quais (rato n.º 3799) foi isolada uma leptospira que se comportou nos testes preliminares como sendo *L. wolffii*. Fato idêntico ocorreu com outra leptospira isolada de um *Akodon arviculoides*, tendo sido ambas, juntamente com a amostra de leptospira isolada do liquor do paciente D. A. M., enviadas por um portador ao Prof. B. Badudieri, em fins de novembro de 1965. Posteriormente, o Prof. Badudieri, do Laboratório de Referência de Leptospiroses da O. M. S., Istituto Superiore di Sa-

nitá, Roma, em carta datada de 14/2/66, comunicou-nos: "the strains, compared, using the agglutinins absorption test, with the strains 3705 and H7, look to be completely identical to these two strains. Consequently they belong to the serotipe *wolffii*".

No quadro IV estão expostos os resultados dos exames realizados nos animais capturados na Vila Iracema Rosa.

2. NO HÓRTO FLORESTAL DE S. PAULO (sede)

a) *Inquérito sorológico em moradores* — Em face dos resultados do inquérito soro-

logico, que constitue grande parte do Horto, em particular, dos guardas-florestais e suas famílias, bem como proceder à captura, exame sorológico e cultura de fragmentos de rim de animais que vivem nas matas dessa imensa área silvestre. Com efeito, os resultados que até então obtivemos estavam a indicar, a exemplo dos estudos efetuados na Malaia, que os animais vetôres e reservatórios da *L. wolffii*, em S. Paulo, têm seu "habitat" natural nas florestas e matas exuberantes e primitivas, tais como as encontradas no Hórto Florestal de S. Paulo (sede), situado no município da Capital.

QUADRO IV

Resultados dos exames realizados em animais capturados na Vila Iracema Rosa

Nome Popular	Espécie	Número de examinados	Cultura de rim em meio de Fletcher		Sêro-aglutinação para <i>Leptospira</i>	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Gambá	<i>Didelphis</i> sp.	4	0	4	0	4
Cuica	<i>Philander</i> sp.	3	0	3	0	3
Preá	<i>Cavia</i> sp.	7	0	7	5*	2
Rato	<i>Akodon arviculoides</i>	2	1	1	0	2
	<i>R. norvegicus</i>	1	0	1	0	1
	Não identificados	3	1	2	1**	0

* Preás: 4 apresentaram sêro-aglutinação positiva ao mesmo tempo para *L. javanica* e *L. ájasiman* e 1 para *L. icterohaemorrhagiae*.

** Rato (n.º 3799) não identificado: sêro-aglutinação positiva para *L. wolffii*.

lógico que revelou 5 outros casos de infecção progressa por *Leptospira wolffii* entre moradores da Vila Iracema Rosa, em face do isolamento da mesma leptospira de 2 roedores capturados nesse local e da contigüidade dessa região com a reserva florestal do Hórto Florestal de S. Paulo, tornou-se evidente que seria de interêsse proceder a idêntico inquérito sorológico entre os moradores da reserva florestal da Serra da Can-

Para melhor caracterização da reserva florestal em questão, enumeramos alguns dados que nos foram fornecidos pela Diretoria do Serviço Florestal, lá sediado: a área total é de 4 500 hectares dos quais cerca de 20%, ou sejam 900 hectares, são de mata virgem e cerca de 50%, isto é, 2 250 hectares, são de capoeirão com um ou dois cortes feitos na mata virgem há cerca de 40 anos; o restante da área é formado por ca-

poeiras que já sofreram três ou mais cortes, havendo ainda 3 alqueires (7,26 hectares) cultivados anualmente com milho e feijão no local denominado Chapada. Existem 20 casas de guardas florestais dispersas ao longo dos limites da área florestal com os mu-

nicípios vizinhos de Mairiporã, Guarulhos, Franco da Rocha e Parada de Taipas. A altitude é de 776 metros em média, o solo é de latosol vermelho-amarelo, fase rasa e o clima Csb (Köppen) temperado, de inverno seco.



Fig. 5 — Mata secundária da Serra da Cantareira na divisa com a Vila Iracema Rosa.



Fig. 6 — Mata secundária da Serra da Cantareira, interior do Hórto Florestal de São Paulo (sede).

No quadro V figuram os resultados do inquérito sorológico efetuado entre os moradores do Hórto, que trabalham e vivem em seu interior, predominando principalmente o grupo etário maior de 20 anos, na realidade constituído, em sua maioria, por pessoas acima de 30 anos de idade.

QUADRO V

Grupo etário	Sêro-aglutinação para <i>L. wolffii</i>	
	Positiva	Negativa
de 7 a 14 anos	0	10
de 15 a 20 anos	0	8
de mais de 20 anos	2	58
Total — 78	2	76

O total de pessoas examinadas foi de 78, pertencendo 28 ao sexo masculino e 50 ao sexo feminino, ocorrendo sêro-aglutinação positiva para *L. wolffii* aos títulos de 1:100 e 1:400 em 2 pacientes, respectivamente A. R. S. e P. A. S., sobre os quais damos breve notícia, a seguir:

A. R. S. — branco, masculino, 55 anos de idade, casado, residente na Fazenda Chapara. Nada relata que possa ser relacionado a uma infecção pregressa por leptospirosas e,

ao exame clínico, nada apresenta digno de menção.

P. A. S. — Branco, masculino, com 24 anos, solteiro, residente da Fazenda Chapada, em casa de pau-a-pique e barro. Relata que há cerca de um mês teve violenta gripe com cefaléia intensa, febre, cansaça e dores no corpo, “bambesa” nas pernas. A urina ficou de côr escura como chá forte, porém o paciente não deixou de trabalhar, embora com grande esforço. Ao exame físico, notamos mucosas visíveis coradas, bom estado geral, bulhas cardíacas normais, PA, 140-80. Fígado, baço e segmentos intestinais, nada digno de nota.

Registramos, ainda, a ocorrência de sêro-aglutinações positivas para *L. icterohaemorrhagiae* (a 1:200), *L. sentot* (1:100) e *L. seirõe* (1:100) em três moradores do Hórto.

b) *Pesquisa de leptospiroses em animais*
Com referência à pesquisa de leptospirosas em animais no Hórto Florestal de São Paulo, capturamos alguns, em armadilhas, sendo os bugios abatidos a tiro por caçador do próprio Hórto.

Os resultados obtidos estão discriminados no quadro VI.

Constatamos assim que não conseguimos isolar nenhuma leptospira dos rins dos 44 animais estudados, assinalando apenas que 7 bugios apresentavam sêro-aglutinações positivas, conjuntamente para *L. javanica*, *L. djasiman* e *L. ballum*, resultado êste que con-

QUADRO VI

Resultados dos exames realizados em animais capturados no Hórto Florestal de S. Paulo (sede)

Nome popular	Espécie	Número de examinados	Cultura de rim em meio de Fletcher		Sêro-aglutinação para <i>Leptospira</i>	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Bugio	<i>Alouata fusca</i>	20	0	20	7	13
Macaco	<i>Cebus</i> sp.	2	0	2	0	2
Preguiça	<i>Bradypus tridactylus</i>	1	0	1	0	1
Rato	<i>Oryzomys</i> sp.	11	0	11	0	11

trasta com o apresentado por MINETTE²¹ (1966) quando, em 74 macacos das Américas, examinados, encontrou apenas um com sôro-aglutinação positiva para *L. ballum*.

V — COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

Os dados expostos até o presente demonstraram claramente a ocorrência de um foco de leptospirose humana por *Leptospira wolffii* na região do Hôrto Florestal de São Paulo (sede), em particular nas adjacências da Vila Iracema Rosa.

O fato relatado pelo paciente A. L. de que, na pequena coleção de água que existia no quintal, havia uma preá morta, permitia se levantasse a hipótese de que teria sido esse animal o vetor da leptospira infectante; todavia, a pesquisa efetuada nos animais capturados nesse local não confirmou aquela presunção, embora revelasse alto índice de presumível infecção por outras leptospirosas, entre as preás, pois, dentre 7 examinadas, 4 mostraram sôro-aglutinações positivas para *L. javanica* e *L. djasiman*, e 1 para *L. ictero-haemorrhagiae*.

Foi o exame de roedores que possibilitou a identificação do verdadeiro vetor da *L. wolffii* então isolada nos rins de dois roedores; um, o de n.º 3835, identificado como exemplar macho de *Akodon arviculoides* e outro, o de n.º 3799, que não pôde ser classificado.

O inquérito sorológico procedido entre moradores da Rua Iracema Rosa e adjacências revelou a ocorrência de 5 infecções pregressas por *L. wolffii* entre 72 pessoas examinadas — incidência de 6,9%, bastante elevada pois — infecções estas que tiveram características de benignidade, pois praticamente passaram despercebidas, ou como uma "gripe" ou como uma indisposição passageira.

Apenas um paciente, E. B., relatou um episódio febril com vômitos e diarreia, em janeiro de 1965, ocasião em que teria tido icterícia, pois ficou com as escleróticas amareladas.

Faltava apenas isolar a *L. wolffii* de um paciente com leptospirose aguda, o que aconteceu logo depois, ao isolarmos a referida leptospira do líquido cefalorraquidiano do paciente D. A. M., episódio êste que se re-

vestiu de características interessantes. Com efeito, estávamos na expectativa do aparecimento de nôvo caso de leptospirose humana por *L. wolffii* para tentarmos então seu isolamento, quando a sôro-aglutinação desse paciente, consultante de ambulatório, foi positiva a 1:200 para *L. wolffii*. Imediatamente procuramos o colega de plantão naquele Hospital a quem, após encarecer a importância do caso, solicitamos providenciasse com urgência a remoção e internação do paciente D. A. M., recomendando-lhe que não fôsse feita medicação antibiótica alguma, para que pudéssemos no dia seguinte tentar o isolamento da *L. wolffii* da hemocultura e inoculação do sangue do cobaio. Todavia, ao ser internado cêrca das 21 horas do mesmo dia, o paciente apresentava estado geral grave, em face do que se impunha a imediata medicação, principalmente a administração de antibióticos, o que foi feito na dose de 10 milhões de unidades de penicilina em sôro glicofisiológico, gôta-gôta por via endovenosa.

Apresentando o paciente D. A. M. sintomatologia meníngea exuberante, impunha-se o exame do líquido cefalorraquidiano com o qual tentamos a cultura em meios de Fletcher e Korthof e a inoculação em cobaio. A nossa experiência pregressa havia ensinado que as possibilidades de isolamento de leptospirosas são maiores a partir do líquido do que do sangue, quando o paciente já recebeu medicação antibiótica, o que é de se compreender em face da resistência da denominada barreira hemo-liquórica à passagem de antibióticos.

E o resultado da cultura do líquido veio confirmar a nossa expectativa pois foi positiva para *L. wolffii*, conforme identificação posterior, comprovada e retificada pelo Prof. B. Badudieri, do Laboratório de Referência da O. M. S., de Roma. Foi esta a quarta ocasião em que a *L. wolffii* foi isolada do sangue de um paciente desde a sua individualização por Wolff em 1937, quando a isolou pela primeira vez, na Sumatra; a segunda e terceira ocasiões, quando dos estudos efetuados entre as forças armadas inglesas e norte-americanas em operações nas selvas da Malasia, Tailândia e Borneo, por Alexander *et alii* (1955 e 1957). Por outro lado, o isolamento da *L. wolffii* a partir do paciente D. A. M. ocorre pela primeira vez no Brasil e nas Américas, que se cons-

tituem no segundo continente em que sua existência é assinalada, já que até então só o fôra na Ásia. Pela segunda vez foi a *L. wolffii* isolada de roedores silvestres; um, não identificado; o outro, *Akodon arviculoides*.

A incidência da *L. wolffii* é realmente muito pequena pois, desde que a incluímos entre os antígenos de uso rotineiro, examinamos cerca de 8 120 soros humanos, dentre os quais apenas registramos com aglutinação positiva para *L. wolffii* os que assinalamos neste trabalho e mais um, relativo a uma paciente residente em uma fazenda no município de Ribeirão Preto, nove ao todo, por conseguinte.

Os dois doentes A. L. e D. A. M. apresentaram quadros clínicos completamente diversos, o primeiro com o clássico quadro de comprometimento hepatorenal da moléstia de Weil, o segundo com quadro de sintomatologia meningea predominante, mostrando mais uma vez a validade da teoria unitária da patogênese da doença no homem.

RESUMO

Os autores registram a ocorrência de leptospirose por *Leptospira wolffii* em dois pacientes, com isolamento da *L. wolffii* no líquido cefalorraquidiano de um deles. Procedendo a estudos epidemiológicos no local em que residia um dos pacientes (Vila Iracema Rosa e adjacências — sede do Hôtor Florestal de São Paulo, Brasil), efetuaram inquéritos sorológicos entre 150 pessoas, encontrando 6 com evidência sorológica de infecção pregressa por *L. wolffii*. Apresentam inquérito sorológico entre animais capturados nesses locais. Foi isolada *L. wolffii* dos rins de um exemplar de *Akodon arviculoides* e de outro roedor não identificado; esta é a primeira vez em que a *L. wolffii* é isolada no continente americano, segundo continente em que é registrada, sendo o primeiro, a Ásia; pela segunda vez é isolada de roedores silvestre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SCHOFFNER, W.; GISPEN, & BOHLANDER, H. — Voorgezette pogingen tot ordening der Leptospirae. Geneesk. T. Ned.-Ind. 79:2470-479, 1939.

2. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Classification of leptospirae and recent advances in leptospirosis. Bull. WHO 32(6):881-891, 1965. Memoranda. (Memorandum from a meeting of WHO Scientific Group on Research in Leptospirosis, Geneva, 1962. Not a official report.).
3. TRIMBLE, A. P. — Leptospirosis in Malaya. Proc. Alumni Ass. Malaya 7(3):182-188, 1954.
4. TRIMBLE, A. P. — Clinical aspects of Leptospirosis in Malaya. Proc. Roy. Soc. Med. 50:125-128, 1957.
5. WISSEMAN, C. L. et alii — Leptospirosis of man and animals in urban, rural and jungle areas of southeast Asia. Am. J. Trop. Med. 4:29-40, 1955.
6. ALEXANDER, A. D. et alii — Classification of leptospiral isolates from Malaya, Thailand and North Borneo. Am. J. Trop. Med. 4:492-506, 1955.
7. ALEXANDER, A. D. et alii — Leptospirosis in Malaya. II. Antigenic analysis of 110 leptospiral strains and other serologic studies. Am. J. Trop. Med. 6:871-889, 1957.
8. ALSTON, J. M. & BROOM, J. C. — Leptospirosis in man and animals. Edinburgh, Livingstone, 1958.
9. MINETTE, H. P. — Leptospirosis in rodents and mongooses on the island of Hawaii. Am. J. Trop. Med. 13: 826-832, 1964.
10. KINGSLEY, G. R. — The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. J. Lab. Clin. Med. 27:840-845, 1942.
11. HANGER, F. M. — Flocculation of cephalin-cholesterol emulsions by pathological sera. Trans. Ass. Am. Physns. 53:148-151, 1938.
12. ILCA, von S.; DODICA, C. & IOANOVICI, Z. — Eine spezifische Probe zum Nachweis von Schädigungen des Leberparenchyms. Z. Ges. Inn. Med. 16(15):652-653, 1961.
13. KING, R. J. & ARMSTRONG, A. R. — A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. Can. Med. Ass. J. 31:376-381, 1934.
14. SPERRY, W. M. & WEBB, M. — A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. J. Biol. Chem. 187:97-106, 1950.

15. MALLOY, H. T. & EVELYN, K. A. — The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol. Chem. 119:481-490, 1937.
16. SHANK, R. E. & HOAGLAND, C. L. — Modified method for quantitative determination of thymol turbidity reaction of serum. J. Biol. Chem. 162: 113-138, 1946.
17. WINZLER, R. J. *et alii* — Studies on the mucoproteins of human plasma. 1. Determination and isolation. J. Clin. Invest. 27:609-616, 1948.
18. WRÓBLEWSKI, F. & LADUE, J. S. — Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91:569-571, 1956.
19. ADDIS, T. *et alii* — The relation between the serum urea concentration and the protein consumption of normal individuals. J. Clin. Invest. 26: 869-874, 1947.
20. JIRGL, V. — Ein Test zur Differentialdiagnose des Verschlussikterus. Klin. Wschr. 35:938, 1957.
21. MINETTE, H. P. — Leptospirosis in primates other than man. Am. J. Trop. Med. 15(2):190-198, 1966.

Recebido para publicação em 1 de junho de 1967.



LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS
EM 59 MUNICÍPIOS DA ZONA NORDESTE
DO ESTADO DE SÃO PAULO

SEROLOGICAL SURVEY FOR CHAGAS' DISEASE IN 59 COMMUNITIES
FROM THE NORTHEAST PART OF THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

OCTAVIO BARACCHINI (2)
ARYOWALDO COSTA (2)
JOÃO CARLONI (3)
LINDOLFO CLEMENTE FERNANDES (3)

SUMMARY

In this paper are presented the results of complement fixation test performed in 8 455 sera obtained from unselected patients living in 59 communities in northeast of the State of São Paulo, Brazil. In this survey, 17,39% of the sera reacted with methanolic antigen of *Trypanosoma cruzi*. The referred antigen is a methanolic extract of *T. cruzi* heated at a temperature of 120° C., for 30 minutes. This antigen was found to keep its specific properties at room temperature and the isofixation curve with sera from proved cases of Chagas' disease is consistently of the type I; therefore, there is not a critical dose of antigen for complement fixation, permitting its use in a large and broad zone of dilutions. The *T. cruzi* were easily cultivated in a liquid and heated medium without red cells and protein precipitates. This medium gives good results in the cultivation of *T. cruzi* from infected animals.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho reúne um levantamento sorológico da doença de Chagas, realizado em 8 455 soros provenientes de 59 municípios, a maioria pertencendo à zona da Mogiana; um estudo de um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, que foi ajustado e experimentado, tendo sido estabelecidas as condições para um crescimento máximo de *Trypanosoma cruzi*; e a descrição de um extrato metanólico de *Trypanosoma cruzi*, aquecido a 120°C, previamente tratado pela acetona, que se mostrou apropriado para uso como antígeno em reações de fixação de complemento, sendo dotado de sensibilidade e especificidade para o diagnós-

tico da doença de Chagas. Essas características, acrescidas da sua estabilidade, mesmo em temperatura ambiente, recomendam-no para o uso em saúde pública.

GUERREIRO & MACHADO¹ foram os primeiros a empregar a reação de fixação de complemento como método sorológico para o diagnóstico da doença de Chagas. Esses autores empregaram como antígeno, primeiro, uma suspensão de tripanosomas obtida por centrifugação de sangue de animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*. Como esse método fornecia muito pouco antígeno e a obtenção era trabalhosa, os refe-

- (1) Trabalho laureado com o Prêmio "Adolfo Lutz" de Ciências Biológicas, Bioquímicas e de Saúde Pública de 1967.
Realizado no Instituto Adolfo Lutz (Lab. Regional de Ribeirão Preto) e na Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto.
- (2) Do Instituto Adolfo Lutz (Lab. Reg. Ribeirão Preto) e da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto.
- (3) Do Instituto Adolfo Lutz (Lab. Regional de Ribeirão Preto).

ridos autôres optaram pelo extrato de baço de cães infectados e rico em *Trypanosoma cruzi*. Desde então, vários outros antígenos também obtidos de extratos de órgãos de animais inoculados foram ensaiados (LEÃO², VILLELA & BICALHO³, LACORTE⁴ e PATTO⁵). Foi KELSER⁶ quem demonstrou o valor das culturas de *Trypanosoma cruzi* como antígeno para as reações de fixação de complemento. Após os trabalhos de KELSER e com a publicação de novos meios de cultura para o cultivo do *Trypanosoma cruzi in vitro*, meios difásicos (NOVY & MCNEAL⁷, BONACCI⁸, SENEKJIE⁹ e CHANG¹⁰), meios líquidos (LITTLE & SUBBAROW¹¹, SAMPATH & LITTLE¹², LITTLE & OLESON¹³, CITRI & GROSSOWICZ¹⁴, WARREN¹⁵, BONÉ & PARENT¹⁶, NEAL & MILES¹⁷, e BARACCHINI¹⁸), novos progressos foram alcançados e antígenos mais específicos, sensíveis e práticos foram descritos (ROMAÑA & DIAS¹⁹, DAVIS²⁰, ROMAÑA & GIL²¹, MUNIZ & FREITAS²², PEDREIRA DE FREITAS & ALMEIDA²³, CHAFFEE, FIFF & KENT²⁴, BATISTA & SANTOS²⁵ e BARACCHINI, COSTA & CARLONI^{26,27}).

MATERIAL E MÉTODOS

MEIO DE CULTURA

O meio de cultura que apresentamos é um meio quimicamente indefinido; na sua composição entram sangue e substâncias extraídas do cérebro, coração e fermentos.

Preparação do meio básico — Colocar 750 cm³ de água destilada no copo de um liquidificador. Acionar o aparelho e, aos poucos, adicionar 100 g de coágulos de sangue humano, previamente colocados sobre uma folha de papel filtro. Deixar funcionar o aparelho durante 20 minutos. A seguir, adicionar o conteúdo de um ovo de galinha à mistura de sangue e ligar o aparelho por mais 2 minutos. Passar o líquido para um balão de vidro de dois litros e autoclavar a 115°C, durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). Após a autoclavagem, filtrar a quente em papel e refiltrar as primeiras porções até a obtenção de um líquido pardo-avermelhado, transparente e sem depósito.

Meio de cultura — Meio básico: 1 000 cm³; infusão de cérebro e coração

(Oxoid ou Difco): 37g; extrato de levedura (Oxoid ou Difco): 5g. Deixar em repouso durante 10 minutos; agitar para dissolver. Distribuir 100 ml para cada frasco de Roux. Tamponar com algodão e autoclavar a 115°C durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). O pH deverá ser de 7.2 a 7.6. Usando-se produtos comerciais "Oxoid" ou "Difco", não será necessário acertar o pH. Os frascos de Roux receberam a nossa preferência pela superfície de aeração que oferecem.

Técnica de cultivo — Repicar o conteúdo de um tubo de cultura de qualquer meio difásico para 1 ou 2 frascos de Roux contendo, cada, 100 ml do meio descrito. Um bom rendimento de *Trypanosoma cruzi* começa a partir do 10.º dia de cultivo a 28°C, porém, esse rendimento é ainda maior a partir do 30.º dia. O repique de meio líquido para meio líquido deverá ser feito a partir do 7.º dia de incubação, na proporção de 10%.

Para o cultivo do *Trypanosoma cruzi* de sangue de animais ou humano, a semeadura na proporção de 10% também é a ideal.

ANTÍGENO

Preparo — O antígeno que descrevemos é preparado a partir de pó seco de *Trypanosoma cruzi*, amostra B. T., obtido do cultivo em meio de BARACCHINI¹⁸ e obedecendo à seguinte técnica:

1. Semear a cepa B. T. de *Trypanosoma cruzi* em meio de BARACCHINI¹⁸ e incubar na estufa a 28°C durante 10 a 30 dias.
2. Adicionar aos frascos de cultura sol. de mertiolate a 1/1000, na proporção de 5 ml para cada 100 ml de meio de cultura. Agitar e deixar em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas.
3. Decantar o sobrenadante e o restante centrifugar a 3 000 r.p.m. durante 15 minutos.
4. Lavar o sedimento com solução fisiológica, 3 vezes.
5. Tratar o sedimento com acetona. Agitar bem e centrifugar. Decantar o so-

- brenadante e secar o sedimento na estufa a 37°C.
6. Triturar o sedimento seco em gral de vidro.
 7. Colocar 200 mg de pó seco de *Trypanosoma cruzi* em um vidro resistente, de capacidade para 100 ml e adicionar 60 ml de metanol p.a.. Fechar o vidro com tampa de borracha, que deve ser fixada ao vidro com barbante forte ou mesmo arame.
 8. Aquecer na autoclave à temperatura de 120°C durante 30 minutos. Deixar esfriar e separar o sobrenadante, que constitui o antígeno.

Estudo — O estudo do antígeno foi realizado empregando-se a técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER²⁸, com 50% de hemólise. O controle da anticomplementariedade foi feito com 2 unidades de complemento 50%. As relações quantitativas entre soro chagásico, antígeno metanólico e complemento foram determinadas pelo método de isofixação de ALMEIDA²⁹. A curva encontrada pertence ao tipo I, significando não haver inibição de fixação de complemento tanto para excesso de soro, como para excesso de antígeno. Neste caso, o antígeno poderá ser usado em excesso (BARACCHINI, COSTA & CARLONI²⁶).

O antígeno metanólico em reações com soros chagásicos, parasitológicamente comprovados, mostrou-se específico e sensível, apresentando uma inclinação de maior valor na projeção de soro contra complemento, quando comparado com outros já descritos (ALMEIDA³⁰).

A sua estabilidade à temperatura ambiente não apresentou queda demonstrável de título e nem atividade anticomplementar, após 24 meses.

O antígeno metanólico, quando diluído e conservado em geladeira, não mostrou instabilidade apreciável.

Elementos da reação — Todos os elementos da reação empregados em nossas experiências, como: complemento, hemolisina, hemácias de carneiro, bem como o estudo da atividade anticomplementar do antígeno e as curvas de isofixação, obedeceram às

técnicas descritas por PEDREIRA DE FREITAS & ALMEIDA²³, PEDREIRA DE FREITAS³¹ e ALMEIDA²⁹.

Soros humanos — As amostras de sangue, num total de 8 455, que serviram para o levantamento que apresentamos, foram colhidas em 59 unidades sanitárias, de indivíduos suspeitos ou não de infecção chagásica, a maioria pertencendo à zona da Mogiana, num período compreendido de 1 de janeiro de 1966 a 31 de julho de 1967.

Os soros foram separados, inativados e examinados pela técnica de KOLMER³² 1/5, por ser a empregada na rotina dos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura descrito é um meio prático e que produz um rendimento apreciável de *Trypanosoma cruzi*. Pelo fato de ser um meio líquido e sem depósito, é um dos mais indicados para a obtenção de culturas de tripanosomas sem outras impurezas, fator importante na preparação de antígenos específicos. O sangue humano empregado, fácil de ser obtido em qualquer laboratório de sorologia, representa o aproveitamento de material que seria desprezado.

O referido meio pôde ser empregado com sucesso no isolamento de *Trypanosoma cruzi* de animais infectados tanto na fase aguda como crônica; resultados positivos obtêm-se a partir do 7.º dia da semeadura.

Antígeno — Dentre os métodos de laboratório que dispomos para o diagnóstico da doença de Chagas, a reação de fixação de complemento é o mais importante e prático. Assim, o emprego de antígenos altamente específicos, sensíveis e estáveis é do mais alto interesse à saúde pública.

À vista dos testes de anticomplementariedade, especificidade, estabilidade e curvas de isofixação (BARACCHINI, COSTA & CARLONI²⁶) e dos recentes resultados obtidos por ALMEIDA³⁰, com soros chagásicos parasitológicamente comprovados, o antígeno que descrevemos é o mais indicado para as reações de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da endemia chagásica e na titulação dos soros positivos.

Levantamento sorológico — As informações sobre as localizações e os índices das endemias que acometem as populações constituem importante contribuição às autoridades sanitárias, para os trabalhos de erradicação.

Certamente os dados numéricos apresentados não representam a real porcentagem da positividade da reação, seja por municípios, seja no total, dado ao fato da amostragem, como assinalado anteriormente, não ter sido obtida rigorosamente ao acaso.

Assim sendo, o nosso objetivo não teve outro sentido se não o de localizar e estabelecer o provável índice da endemia chagásica numa extensa e importante região do Estado de São Paulo, compreendida por 59 municípios.

Os resultados apresentados no quadro seguinte mostram que dos 8 455 soros examinados, 1 471 foram positivos na reação de fixação de complemento para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. O índice

de positividade foi de 17,39%, o que representa, com a ressalva acima mencionada, uma informação de mais alta importância às autoridades sanitárias do país. A doença de Chagas foi constatada sorologicamente em todos os 59 municípios dos quais recebemos sangue para exame.

Amostras examinadas	Não reagentes	Reagentes	Reagentes %
8 455	6 984	1 471	17,39

Apenas uma publicação de PEDREIRA DE FREITAS³³, com uma breve citação de 1 887 exames sorológicos realizados no interior de São Paulo, foi encontrada.

Abaixo apresentamos a relação dos municípios onde a endemia chagásica foi constatada sorologicamente.

Relação dos municípios

Altinópolis	Guariba	Restinga
Ariranha	Igarapava	Ribeirão Preto
Barretos	Ipuá	Rincão
Batatais	Ituverava	Sales de Oliveira
Bebedouro	Jaboticabal	Santa Adélia
Bento Quirino	Jardinópolis	Santa Lúcia
Brodosqui	Jeriquara	Santa Rita do Passa Quatro
Caconde	Miguelópolis	Santa Rosa do Viterbo
Cajobi	Mococa	Santo Antônio da Alegria
Cajuru	Monte Alto	São Joaquim da Barra
Cândia	Monte Azul Paulista	São José do Rio Pardo
Casa Branca	Morro Agudo	São Sebastião da Gramma
Colina	Novo Horizonte	Serrana
Cravinhos	Nuporanga	Sertãozinho
Descalvado	Orlândia	São Simão
Divinolândia	Patrocínio Paulista	Tambaú
Dumont	Pedregulho	Tapiratiba
Franca	Pitangueiras	Terra Roxa
Guaíra	Pontal	Vargem Grande do Sul
Guará	Pradópolis	

RESUMO

Neste trabalho são apresentados os resultados de um levantamento sorológico para a doença de Chagas, realizado em 8455 soros procedentes de 59 unidades sanitárias, obtidos de pessoas sem qualquer exame clínico prévio. O índice de positividade foi de 17,39%, e representa a contribuição às autoridades sanitárias do país, para o conhecimento da atual situação da endemia chagásica em 59 municípios do Estado de São Paulo.

Neste trabalho os autores estudam também o comportamento de um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, isento de precipitados de proteínas e hemátias, que pode ser empregado com bons resultados para a obtenção de culturas de *Trypanosoma cruzi* para o preparo de antígenos, bem como para isolamento de trypanosomas de animais inoculados ou naturalmente infectados.

Um antígeno metanólico de *Trypanosoma cruzi*, aquecido à temperatura de 120°C, é também estudado. Esse antígeno, nos testes de anti-complementariedade, especificidade, sensibilidade e estabilidade, mostrou-se superior aos já descritos, sendo, portanto, o antígeno mais indicado para as reações de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, tanto nos testes qualitativos como nos testes quantitativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Méd. 27:225-226, 1913.
2. LEÃO, A. E. ARÊA — Do diagnóstico das trypanosomoses pela reação de desvio do complemento. Cienc. Méd., R. de Janeiro. 1s126-234, 1923.
3. VILLELA, E. & BICALHO, C. — As pesquisas de laboratório no diagnóstico da moléstia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 16:13-191, 1923.
4. LACORTE, J. G. — A reação do desvio do complemento na moléstia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 20: 197-210, 1927.
5. PATTO, O. — Fixação do complemento no bócio endêmico. An. Fac. Med. Minas Gerais 2:95-103, 1930.
6. KELSER, R. A. — A complement-fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen. Amer. J. Trop. Med. 16(4):405-415, 1936.
7. NOVY, F. G. & MCNEAL, W. J. — On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis. 1:1-30, 1904.
8. BONACCI, H. — Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi*. Chagas, 1909. Rev. Inst. Bact., B. Aires 6: 242-247, 1934.
9. SENEKJIE, H. A. — Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Med. 23:523-531, 1943.
10. CHANG, S. L. — Studies of haemoflagellates. I. A semi-solid medium and fluid medium with a solid for growing various species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 80:164, 1947.
11. LITTLE, P. A. & SUBBAROW, Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. J. Bact. 50:57-60, 1945.
12. SAMPATH, A. & LITTLE, P. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi*, in liquid media. J. Bact. 57:265, 1949.
13. LITTLE, P. A. & OLESON, J. J. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi*. J. Bact. 61:709-714, 1951.
14. CITRI, N. & GROSSOWICZ, N. — A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 13:273-278, 1955.
15. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. J. Parasit. 46:529, 1960.
16. BONÉ, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31:261-266, 1963.
17. NEAL, R. A. & MILES, A. R. — Heated blood agar medium for the growth of *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. Nature (London) 198:210-211, 1963.
18. BARACCHINI, O. — Meio de cultura líquido esterilizável pelo calor para *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 22/23:91-92, 1962/63.

19. ROMANA, C. & DIAS, E. — Reação de fixação de complemento na doença de Chagas com antígeno alcoólico do *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37(1):1-10, 1942.
20. DAVIS, D. J. — An improved antigen for complement fixation in American Trypanosomiasis. Publ. Hlth. Rep. 58:775-777, 1943.
21. ROMANA, C. & GIL, J. — Reacción de fijación de complemento com antígeno de cultura de *S. cruzi* en 500 sueros humanos. An. Inst. Med. Reg. Tucumán 1(3):297-304, 1946.
22. MUNIZ, J. & FREITAS, G. de — Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 41:303-333, 1944.
23. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Hospital Rio de J. 35:787-800, 1949.
24. CHAFFEE, E. F., FIFF, E. H. Jr. & KENT, J. F. — Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement-fixation. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 5(5): 763-771, 1956.
25. BATTISTA, S. M. & SANTOS, U. M. — Antígeno de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, 1963.
26. BARACCHINI, O., COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor e do metanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 68(6):193-199, 1965.
27. BARACCHINI, O., COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor à temperatura de 120°C e do metanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 70(1):97-100, 1966.
28. WADSWORTH, A. B. — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department.
29. ALMEIDA, J. O. — Isofixation curve as a method of standardizing quantitative complement-fixation test. J. Immunol. 76:259-263, 1956.
30. ALMEIDA, J. O. — Comunicação pessoal. Resultados obtidos em Washington. O. M. S., 1967.
31. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Reação de fixação de complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. Archos. Hig. Saúde Públ. 16:55-94, 1951.
32. KOLMER & BOERNER — Approved Laboratory Technic. Copyright by D. AP-PLENTON. Century Co. Ind., New York, 1948.
33. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa: vantagens do método e sua aplicação em saúde pública. Hospital, Rio de J. 41(2):257-267, 1952.

Recebido para publicação em 31 de outubro de 1967.

PNEUMONIA INTERSTICIAL PLASMOCITÁRIA PNEUMOCÍSTICA

(PNEUMONIA PNEUMOCÍSTICA, PNEUMOCISTIOSE OU DOENÇA
DE VANEK & JIROVEK)

Apresentação de um caso

INTERSTITIAL PLASMA CELL PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA
(Pneumonia Pneumocystis, Pneumocystiosis, Vanek & Jirovek Disease)
Case report

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS

SUMMARY

A case of pneumocystic pneumonia is presented and a review of pertinent literature is made particularly of Chagas's work.

The clinical findings in this case are described and the histopathology of the lung is discussed. Considerations are made on the taxonomy and identifications of *Pneumocystis carinii*, and inclusion of pneumonia due to this protozoon among plasmocystic interstitial pneumonia is suggested.

I — INTRODUÇÃO

As pneumonias intersticiais são alterações do tecido pulmonar, até certo ponto específicas, apresentando um quadro histopatológico bem definido, variável de acordo com o agente, porém sempre com o mesmo aspecto para o mesmo agente, ainda que êle não seja identificado. Em geral, apresentam-se como uma alteração intersticial isolada, mas podem estar associadas às pneumonias e broncopneumonias bacterianas.

A *pneumonia intersticial plasmocitária pneumocística*, também simplesmente chamada pneumonia pneumocística ou pneumocistiose, foi bem estudada por VANEK & JIROVEK¹ que ligaram as alterações pulmonares verificadas em um grupo de crianças ao agente etiológico aqui estudado.

Doença própria do prematuro ou do recém-nascido débil, aparece até aos seis meses de idade, admitindo-se que seja epidê-

mica dentro dos berçários, visto serem encontrados, concomitantemente, vários casos nas maternidades. Admite-se, ainda, que seu contágio se faz através de alimentos contaminados por dejeções de ratos portadores ou pelo contágio direto, através da secreção brônquica dos afetados. Acreditamos que, existindo o parasito no conteúdo gástrico de crianças afetadas, como se demonstra aqui pela primeira vez, êle poderá ser eliminado com as fezes do portador, contaminando os berçários.

Apesar de ter sido visto o parasito primeiramente por CARLOS CHAGAS² (1909) e encontrado também por CARINI³ (1910), em roedores, foram os DELANOË⁴ que concluíram tratar-se de um nôvo parasito, dando-lhe o nome de *Pneumocystis carinii*. A constatação de sua presença em pulmões de prematuro, entre nós, se reduz a três ca-

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

tos, incluindo o presente, não acreditando nós, pois, que essa lesão, causando a morte, tenha passado despercebida aos brasileiros.

1. AGENTE ETIOLÓGICO

a) *Histórico de sua descoberta*

A pneumonia pneumocística é produzida por um protozoário de posição sistemática ainda não bem aceita. Baseados em seus caracteres, na classificação de CESAR PINTO⁵, esse agente — *Pneumocystis carinii* — é um protozoário pertencente à classe *Toxoplasmidia*, ordem *Toxoplasmidia* e família *Pneumocystidae*. A semelhança entre o *Toxoplasma gondii* e o *Pneumocystis carinii* permite sua inclusão em uma mesma classe ordem e família com dois gêneros, cada qual com sua espécie:

Classe *Toxoplasmidia* Pinto, 1955

Ordem *Toxoplasmidia* Pinto, 1955

Família *Toxoplasmidae* Pinto, 1955

Gêneros

- 1) *Toxoplasma* Nicolle et Manceaux, 1909

Espécie *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1908

- 2) *Pneumocystidae* Delanöe et Delanöe, 1912

Espécie *Pneumocystis carinii* Delanöe et Delanöe, 1912.

Este agente pode apresentar-se sob forma isolada, com único ou vários núcleos, ou sob forma de um quisto contendo até oito núcleos com envoltório próprio. Este último aspecto estaria ligado à sua multiplicação.

Foi CHAGAS² quem primeiro constatou esse agente em pulmão de cobaias; quando procedia aos estudos sobre a moléstia que depois levou seu nome, inoculando sangue de enfermos em macacos *calitrix* (*sagüi*) e cobaias, chegou à seguinte conclusão: "...no homem se observa a presença de tripanozomas no sangue periférico, livres e incluídos em hemátias, variando a forma e posição do blefaroplasto; no sagüi, se observa no sangue periférico o mesmo dimorfismo que no homem, notando-se ainda a mitose que precederia a divisão "esquizogônica" do parasita" (Fig. 1). Nas cobaias, cães e outros vertebrados em experimentação, verificou Chagas a dualidade de forma dos tripanossomos, para o macho e para a fêmea. Nos capilares pulmonares das cobaias infestadas constatou o que ele concluiu ser a "forma esquizogônica dos parasitos": êstes, perdendo o flagelo e a membrana ondulante e deslocando o núcleo, sofrem uma flexão, fundindo-se as extremidades, ficando esféricos; núcleo e blefaroplasto se fundem e entram em multiplicação ou, separadamente, se dividem, apresentando em fase final um aparente quisto, com oito "merozoítos" que, libertados, parasitariam as hemácias (Fig. 2 e 3).

Posteriormente, vários autores encontraram formas císticas semelhantes às encontradas por Chagas, em animais inoculados com outras variedades de tripanossomo.

Em agosto de 1910, CARINI³ comunica, em reunião, à Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo, haver encontrado no pulmão de animais de laboratório formas de esquizogonia do *Trypanosoma lewisii*, semelhantes àquelas descritas por Chagas.

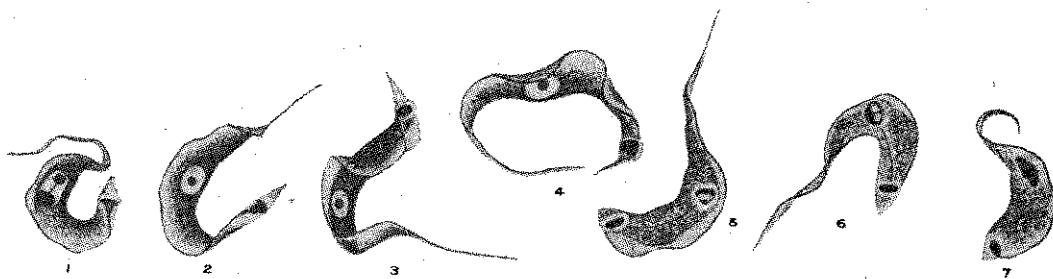


Fig. 1 — Formas de *Trypanosoma* no sangue periférico; em 1, 5, 6 e 7, mitose que precederia a divisão esquizogônica do parasito, segundo CHAGAS². Repröd. CHAGAS².

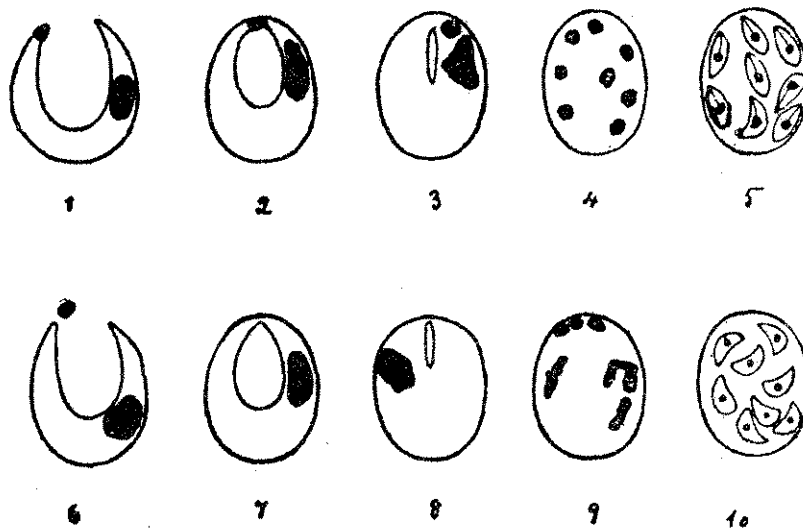


Fig. 2 — Formação de quistos, com 8 parasitos no seu interior; seria a reprodução esquizogônica, segundo CHAGAS². *Reprod.* CHAGAS².

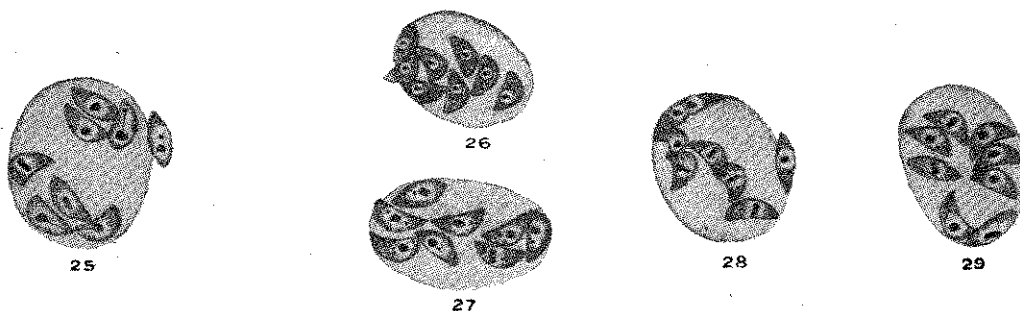


Fig. 3 — Quistos de parasitos, alguns ultrapassando a membrana envolvente. *Reprod.* CHAGAS²

Em fevereiro de 1911, GASPAR VIANA⁶ comunica haver encontrado, em esfregaços de pulmão de cobaias inoculadas com *Trypanosoma gambiense*, várias fases de esquizogonia, semelhantes às observadas por Chagas, formas diferenciáveis do *S. cruzi*. Em março de 1911, o mesmo pesquisador⁷ comunica o encontro de formas gametogônicas em esfregaços de pulmão de animais infestados por *Trypanosoma equineo* e em esfregaços de pulmão de ratos brancos infestados por *Trypanosoma congolense*.

Em 1912, Mr. & Mme. PIERRE DELANÔE⁴, referindó-se à comunicação de Carini sôbre o encontro de quistos em pulmões de ratos infestados por *Trypanosoma lewisi*, os quais Carini, da mesma maneira que Chagas e outros, considerava como uma re-

produção esquizogônica dêste tripanossomo, chegam à conclusão de que se trata de um parasito diferente; êstes quistos descritos por Carini eram encontrados em grande extensão do pulmão, de forma oval, medindo em média 5 micros de diâmetro, com delicada parede delimitante, de acidofilia acentuada, corando sem dificuldade pelo Giemsa, após fixação adequada. Referem, ainda, os Delanôe que êste fato foi observado por Chagas nos pulmões de animais infestados por *Schizotrypanum cruzi*; êstes quistos encerram oito elementos que, quando bem desenvolvidos, têm aspecto de vermiculo em crescente, dirigido para o meio do corpo, com pequeno núcleo homogêneo, em volta do qual existe um halo claro; o citoplasma é azul, com estrutura alveolar. As inocula-

ções, em ratos, de material contendo êsses quistos não provocaram o aparecimento de tripanossomos na circulação. Examinando, então, ratos adultos, depois de uma série de trabalhos, encontraram o parasito em um lote de 22 ratos não inoculados com tripanossomos. O sangue de vários ratos desse lote, de diversas procedências, foi inoculado em ratos jovens, sendo negativa a presença de tripanossomos; porém, os mesmos ratos, posteriormente inoculados com *Trypanosoma lewisi*, apresentaram-no na circulação, concluindo que os quistos de Carini nada têm de comum com o *Trypanosoma lewisi*; conseguiram, ainda, contaminação intensa desse parasitismo, em animais jovens, com inoculação, por via respiratória, contendo êsses quistos. Concluíram, então, que se tratava de um nôvo parasito dos ratos e propuzeram dar-se-lhe o nome de *Pneumocystis carini*. Seus caracteres permitem hoje classificá-lo como protozoário, conforme já assinalamos. Êsses quistos não possuem os caracteres de esporos, nem dos quistos da *Eimeria*. Conseqüentemente, segundo PINTO⁵, não pode o *Pneumocystis carini* ser colocado na família das *Eimeridae*. O trabalho dos Delanõe, de real importância, veio mostrar a inexistência da forma esquizogônica do tripanossomo na Moléstia de Chagas.

Em 1913, ARACÃO⁸, em nota sôbre esquizogonia dos tripanossomos, assinala que numerosos animais que morriam espontaneamente nos laboratórios do Instituto "Oswaldo Cruz" de Manguinhos, livres de infestação pelo tripanossomo, apresentavam freqüentemente, nos esfregaços de pulmão, formas císticas, com oito corpúsculos no interior, semelhantes àquelas verificadas por Chagas e conclue que estas nada tinham a ver com o ciclo esquizogônico do tripanossomo. Assinala, ainda que, após esta sua conclusão, teve conhecimento dos trabalhos de Delanõe e comenta que Astrogildo Machado, na região de Lassance, onde Carlos Chagas fez suas investigações, encontrou pneumocistos em pulmões de diversos vertebrados, concluindo tratar-se de um parasito completamente inofensivo para o organismo desses mesmos animais.

Ao fazer um resumo sôbre os estudos etiológicos e clínicos da moléstia por êle descoberta, CHAGAS⁹, em 1911, refere que também no transmissor se verifica uma formação idêntica àquela encontrada nos ver-

tebrados, constituída por "8 unidades", que corresponderiam à fase esquizogônica do tripanossomo. No mesmo trabalho, refere o encontro dessa forma, em pulmão humano de um indivíduo adulto, falecido na forma aguda da Moléstia de Chagas. Em 1913, CHAGAS¹⁰ reconhece a inexistência dessa forma esquizogônica do tripanossomo.

Sucederam-se os encontros de *Pneumocystis carinii* em pulmões de diferentes vertebrados. Assim, Aragão, Viana e Chagas encontraram-no em roedores. CARINI & MACIEL¹¹, em 1914, encontraram-no em roedores e outros vertebrados, mostrando que não era patogênico para êsses animais. Na Inglaterra, COLES¹², em 1914; COLES¹³, e PORTER¹⁴, em 1915/16, encontraram o parasito.

Os estudos e citações de achados sôbre o *Pneumocystis carinii* permaneceram estacionados até que, em 1938, AMMICH¹⁵ descreveu uma pneumonia intersticial não sifilítica; em posterior revisão, foi identificada como tendo por agente etiológico o *Pneumocystis carinii*.

Em pulmão de criança, foi encontrado na Bélgica, em 1942, por van der MEER & BRUG¹⁶.

O estudo detalhado do parasito foi feito por VANEK & JIROVEK¹, de Praga, em sucessivos casos estudados desde 1945 até 1951, quando verificaram em 16 crianças, falecidas de pneumonia intersticial, a presença do *Pneumocystis carinii*, já descrito, idêntico ao encontrado por Carini.

Os trabalhos desses autôres assinalam a presença de um conteúdo nos alvéolos pulmonares semelhante a um coágulo albuminóide, constituindo a chamada "proteínose" alveolar, rico em parasitos. As preparações, coradas pelo P. A. S. apresentaram os parasitos envolvidos por uma delicada membrana, muitos dos quais sob forma de um quisto, contendo 2, 4 ou 8 corpúsculos. Esse material, encontrado também em brônquios e bronquíolos, era acompanhado de um infiltrado intersticial de plasmocitos. Conhecido o quadro histopatológico e seu agente etiológico, puderam ser constatados, em toda a Europa, vários casos. Foram revistos então vários casos anteriores, com outros diagnósticos, e foi possível constatar-se a presença do *Pneumocystis carinii*. Posteriormente HERZBERG *et alii*¹⁷, em 1952, notou a sua presença intercelular. Giese, em

1953, em um caso de pneumonia intersticial do recém-nascido, considerou-o um cogumelo e foi proposto o nome de *Blastomyces pneumoniae infantum*; todavia, parece que os fungos encontrados em culturas por êle feitas eram contaminações das mesmas. Em 1954, ZANDANELL^{apud 5}, em 19 casos estudados na Áustria, identifica o parasito também no sangue periférico, fato êste referido também por outros autores, em 1956. Em 1958, BERDNIKOFF¹⁸ apresenta um estudo de 13 casos.

O estudo experimental em animais sensíveis permite obter esfregaços de parasitos, o que pode ser aproveitado para estudo de sua morfologia e de novos métodos de coloração e para a ultramicroscopia. Com o ultramicroscópio, a escola de HAMPERL¹⁹, em Bonn, Alemanha, demonstrou, em cortes ultrafinos, a presença dos 8 corpúsculos.

No Brasil, a pneumonia pneumocística, em crianças, foi verificada pela 1.^a vez por nós* (documentada no presente trabalho), e por LUISI²⁰, em 1958; por BRITO & ENGE²¹, em 1962.

Hamperl é um dos que mais se tem interessado pelo estudo da pneumonia pneumocística, tendo feito um estudo histórico sobre a mesma, apresentado no 2.^o Congresso Latino-Americano de Anatomia Patológica, em São Paulo, 1958. Porém, não fez citações relativas aos encontros por Carini e por outros pesquisadores brasileiros.

Em relação aos trabalhos de Jiróvek e seu assistente Vanek, "êste germe havia estado ante os olhos de todos os histopatologistas por tantos anos, sem que fôsse notado".

Verificamos, pois, que a identificação do parasito sempre foi um problema em anatomia patológica e parasitologia. O próprio CHAGAS⁹, após quatro anos de publicado seu genial trabalho, assinala que "dêste modo, apesar de nossa verificação no pulmão de um caso de tripanossomíase, somos levados a acreditar que as formas de protozoários referidas representam um outro parasita e não o *Schizotrypanum cruzi*".

b) Identificação

Morfologia e coloração — O parasito se apresenta de forma arredondada, alongada

ou irregular, notando-se um corpúsculo central, com halo claro e membrana envolvente; mede de 2 a 4 micros; esta forma é jovem e mononucleada; como se reproduz por sissiparidade, vamos encontrar formas maiores, esféricas, medindo de 5 a 7 micros, com 2, 4 ou 8 núcleos (octadas).

Dentro de um quadro histopatológico de pneumonia intersticial por plasmocitos, o encontro na luz dos alvéolos, brônquios e bronquíolos de massas espumosas semelhantes a "favos de mel" ou aspecto de "ovos de rã", contendo corpúsculos dificilmente identificáveis, em virtude de seu tamanho, impõe-nos confirmar o diagnóstico de "Pneumonia pneumocística". Vários métodos de coloração podem ser usados; o patologista avisado, pelo método de rotina, isto é, pela hematoxilina-eosina, pode identificar no interior dos alvéolos pulmonares, brônquios e bronquíolos massas espumosas róseo-avermelhadas e pequenos núcleos, em azul.

A melhor coloração, em cortes de parafina, obtem-se pelo método de P. A. S. (PEARSE²²). Êste método é positivo para a mucopolissacaride na membrana envolvente, que se apresenta vermelho-púrpura. No interior dos quistos ou na espessura dessa massa espumosa se encontram, com dificuldade, os corpúsculos corados em azul-escuro.

Pelo método tricrômico de Masson, essa massa espumosa obtem uma coloração verde-azulada; pelo método de Mallory, em azul; pela hematoxilina de Mallory, em azul negro e pelo método de van Gieson, em vermelho acinzentado.

Pelo método de Gram, apresenta-se o parasito como Gram-negativo.

Pelo Giemsa, os núcleos se apresentam violeta-escuro com halo claro.

Nos cortes de parafina, os parasitos se rompem facilmente, em virtude da fragilidade de sua parede envolvente; nos casos suspeitos de pneumonia pneumocística, o diagnóstico se faz pela coloração da secreção brônquica, que fornece formas mais facilmente identificáveis. A hematoxilina forte de Böhmer fornece boa coloração para os corpúsculos.

Os esfregaços, quando são realizados a partir de material obtido de pulmões de ani-

(*) Apresentado em Reunião no 2.^o Congresso Latino-Americano de Anatomia Patológica, São Paulo, 1958.

mais, ou de secreção brônquica aspirada de enfêrmos, mostrarão os parasitos isolados e sem a massa espumosa envolvente. A membrana envolvente pode ser corada em vermelho pelo Giemsa e o núcleo, em violeta-escuro.

Pela microscopia de fase, nas formas císticas, nos esfregaços sem corar, os núcleos aparecem mais escuros.

Pelo método de microscopia de fluorescência, utilizando-se a acridina-orange, obtém-se fluorescência positiva para os núcleos, que adquirem coloração de castanho ao vermelho, identificando-se mais facilmente as octadas (VLACHOS & THAROUNIATIS²³, fig. 4).



Fig. 4 — Microscopia de fluorescência com esfregaço obtido de material retirado do pulmão, vendo-se 8 núcleos — octadas (Acridine-Orange). *Reprod.* VLACHOS & THAROUNIATIS²³.

2. QUADRO CLÍNICO

Após um período de incubação da doença, em média de 40 dias, a criança apresenta dificuldade em se alimentar, cansaça, febre moderada; febre elevada quando ocorre conjuntamente furunculose, piodermite e gastroenterite. Há taquipnéia, até 120 respirações por minuto, tosse sêca, sinais de asfixia progressiva e cianose peri-oral, nos dedos e artelhos. Pode aparecer opistótono. Pulso rápido e rítmico. Perda de pêso. O exame físico é pobre em sinais, notando-se na criança distrofia, dipnéia, cianose e discreta hi-

pertermia. Discretos sinais semiológicos de broncopneumonia. O exame radiológico mostra condensação pulmonar, que se estende do hilo para a periferia dos pulmões. Há predileção para determinado lobo pulmonar, notando-se uma transparência variável, conforme a intensidade da infestação.

O hemograma acusa alteração evidente: série branca — leucocitose acentuada, de 20 000 até 55 000 glóbulos brancos por ml; neutrofilia com desvio à esquerda, e bastonetose alta; presença de metamielocitos; granulações tóxicas, eosinofilia, variável de intensidade; linfocitose, com atipia. Na série vermelha, anisocitose, poiquilocitose e

policromasia; anemia — diminuição do número de hemácias e da taxa de hemoglobina.

Como exames complementares para elucidação do diagnóstico, podem ser usados a intradermo reação e a dosagem de cálcio no sangue, que apresenta teor elevado. A cultura do material obtido dos bronquíolos é sempre negativa; a inoculação em animais sensíveis (roedores) pode dar resultado positivo, sendo necessário cuidado na seleção dos animais de lotes livres de parasitos, afim de evitar falso resultado positivo, pela preexistência do pneumocisto.

a) *Diagnóstico diferencial* — Deve ser feito com as seguintes pneumonias: por *virus* — adenovirose, pneumonia primária atípica, varicela, sarampo, psitacose e citomegalia, esta última de provável etiologia virótica; por *bactérias* — febre tifóide, processos piogênicos; por *rickettsias* — febre maculosa e febre Q; por outros *protozoários* — leishmaniose visceral; por *fungos* — histoplasmoze, aspergilose, actinomicose e monilha.

b) *Tratamento* — Os antibióticos e sulfamidas não se têm mostrado eficazes. Por se tratar de um protozoário, poderão ser experimentados os antimonialis, a Atebrina, Plasmoquina, Aralen, Paludrina, quinino e outros protozoocidas. Há boas referências sobre a ação do cloranfenicol. Os indivíduos adultos, em tratamento pela cortisona, podem apresentar uma exacerbação no crescimento do pneumocisto que se encontre latente em seu organismo.

3. QUADRO ANATOMOPATOLÓGICO

Pulmões

a) *Exame macroscópico* — Os pulmões afetados se apresentam bem armados, de consistência aumentada, com diminuição da crepitação, pleuras lisas e brilhantes. A superfície de corte, de coloração vermelho-escura, com áreas acinzentadas, fornecendo, pela compressão, pequena quantidade de líquido pouco arejado, notando-se áreas enfisematosas e áreas de colapso. Não se observa friabilidade acentuada, como a verificada nos focos broncopneumônicos, por bactérias; porém, o exame macroscópico nos dá a impressão de broncopneumonia.

b) *Exame microscópico* — Chama a atenção, inicialmente, o espessamento difuso dos septos interalveolares, à custa principalmente de um infiltrado inflamatório de plasmocitos e linfócitos, e algumas células mononucleares e histiocitárias; em alguns casos, os plasmocitos são raros, predominando células mononucleares, como no caso descrito por LUISI²¹. São encontradas áreas de enfisema e áreas de colapso. O epitélio de revestimento dos alvéolos se apresenta hiperplasiado e suas células, descamadas na luz alveolar. Importante para o diagnóstico é o conteúdo da luz alveolar, dos brônquios e dos bronquíolos; esse conteúdo é formado

por um material espumoso, que se cora em róseo, pela eosina, que pode dar um aspecto de exsudato albuminóide, descrito como “proteínose alveolar”. O exame cuidadoso mostra que essa massa tem aspecto de “favo de mel” ou de “ovos de rã”, sendo constituída por pequenas vesículas, claras, algumas das quais apresentam um ou mais corpúsculos basófilos em sua parte central; conforme o plano ótico, muitas vesículas se apresentam vazias. A massa espumosa circundante constitui o conjunto de *Pneumocystis carinii*; estes parasitos são arredondados ou ovóides, apresentando um, dois, quatro ou oito corpúsculos, dificilmente identificáveis nos cortes. No conteúdo alveolar, não se encontram fibrina ou neutrófilos; podem ser encontradas células fagocitárias e lipofágicas. O método de P. A. S. facilita a identificação dessas massas de parasitos, apresentando colorações bastante elucidativas.

II — REGISTRO DO CASO

Observação anatomoclínica

J. R. L., 2 meses de idade, brasileiro, residente em Vila Bela, São Paulo, Brasil.

História da moléstia atual — Oito dias antes da internação, tosse sêsa, dispnéia e tiragem intercostal; há 6 dias, agravamento do quadro, com cianose, aumento da dispnéia. Medicado com penicilina, sem melhora.

Antecedentes — Prematuro de 6 meses, pesando 2,130 kg, ao nascer. Frequentemente apresentava o “peito atacado”, com quadro semelhante ao atual.

Exame físico geral e especial — Temperatura, 37,5°C. Frequência respiratória 60/m. Pêso, 2,500 kg. Mau estado geral. Distrófico, dipnéico, tiragem intensa. Tosse sêsa. Cianose nas unhas, nos lábios e perioral. *Pulmões*: murmúrio vesicular nos ápices e bases; hipersonoridade; estertôres finos no ápice direito e terço médio do hemitórax direito; taquicardia.

Evolução — Durante 20 dias de internação, o paciente permaneceu inalterado, com respiração arritmica, roncos disseminados nos pulmões. Desde o primeiro dia de sua

internação foi tratado com terramicina, penicilina, nebulização contínua, adrenalina, soluto fisiológico, lobelina e Ampletil. A medicação feita não teve resultado benéfico.

Raio X — Enfisema pulmonar e opacificação muito discreta do lobo superior direito.

Necrópsia — Indivíduo em precárias condições de nutrição, medindo 46 cm e pesando 2,500 kg. Cianose nas extremidades; linhas epifisiárias bem formadas. Cabeça, pescoço e cavidade torácica sem alterações. Coração, fígado, rins e baço, macroscopicamente sem alterações importantes. *O estômago*, com pregueamento bem nítido da mucosa. O exame histopatológico do baço apenas revelou hiperplasia de células mononucleares. Os outros órgãos, excetuando-se os pulmões, nada mostraram.

Pulmões

Exame macroscópico — Apresentam-se armados, volume e forma conservados. Consistência aumentada. Crepitação diminuída. Superfície externa róseo-clara. Superfície de corte rósea, com áreas claras, mais consistentes, fornecendo, pela compressão, líquido arejado. Nas bases e ápice direito, líquido ligeiramente turvo.

Exame microscópico — Foram feitas várias preparações microscópicas, obtidas de fragmentos retirados de vários pontos do pulmão. Inicialmente foram coradas pela hematoxilina eosina, como método de rotina e, posteriormente, pelo P. A. S. O quadro histopatológico encontrado é idêntico em todas as preparações, notando-se um espessamento difuso dos septos interalveolares, diminuindo a luz alveolar em alguns pontos; em outros, pequenas áreas de enfisema. Esse espessamento é produzido por intenso infiltrado de células, em sua maioria constituído de plasmocitos bem formados, notando-se, ainda, células mononucleares e alguns linfócitos; não se encontram neutrófilos. Pode ser encontrada uma ou outra célula em mitose. Os capilares estão dilatados e congestos. A quase totalidade dos alvéolos apresenta a sua luz cheia de um material corado em róseo, de aspecto espumoso, como se fôsse pequenas “bólbhas de sabão” ou “favo de mel” (Figs. 5, 6, 7 e 8). Este material contido na luz alveolar bronquial e bronquiolar é positivo pela coloração pelo P. A. S. (Figs. 9, 10, 11 e 12) e apresenta-se como vesículas vazias ou dilaceradas, podendo ser notada, com o manuseio do microscópio, a presença de um núcleo escuro, basófilo, arredondado ou alongado, dando ao conjunto o aspecto de “ovos de rã”. Estes

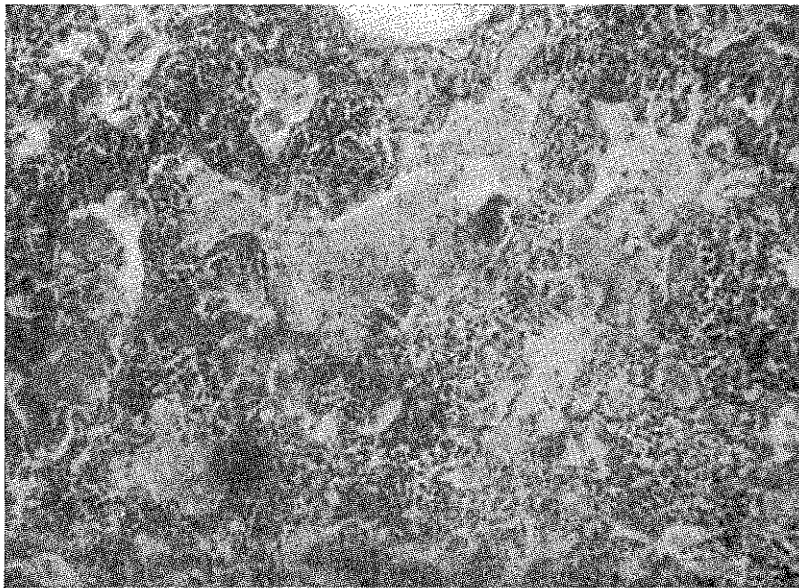


Fig. 5 — Corte de pulmão — Espessamento dos septos interalveolares; alvéolos cheios de massas eosinófilas (H. E.). . 65 \times .

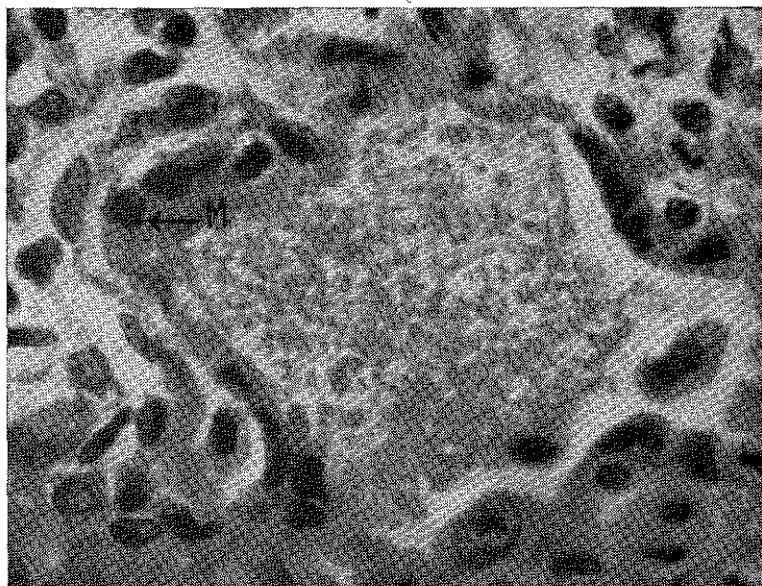


Fig. 6 — Corte de pulmão — Alvéolo pulmonar contendo massas espumosas com quistos e núcleos — *Pneumocystis carinii*. Detalhe do revestimento da parede alveolar, células em mitose (M), septos ricos em plasmocitos (H. E.). 1000 x.

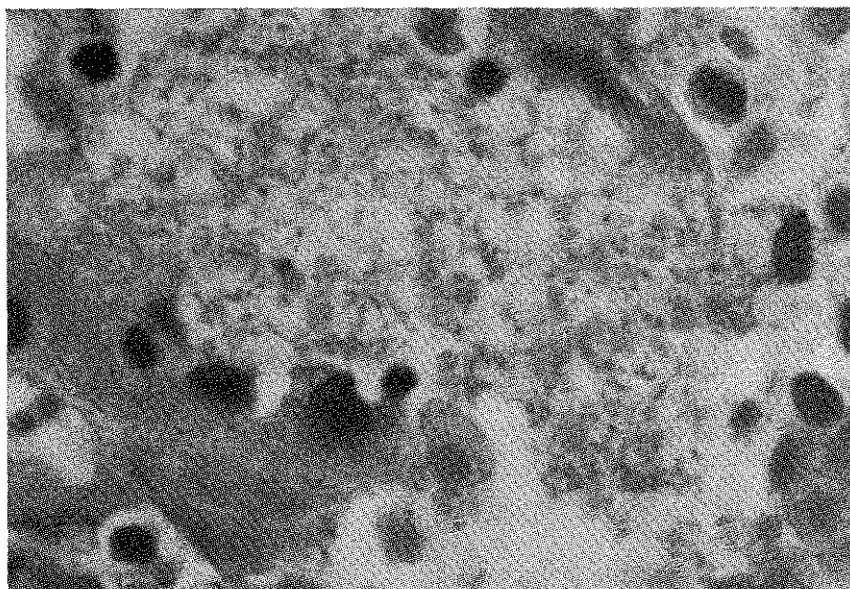


Fig. 7 — Corte do pulmão — Alvéolo pulmonar com massas espumosas constituídas por quistos aglomerados, notando-se halo claro, núcleo ou núcleos (H. E.). 1000 x.

núcleos dificilmente são visíveis, passando despercebidos ao exame superficial; um exame com objetiva de imersão (1000 X) mostra com maior detalhe essas formações, podendo ser verificadas vesículas claras bem

delimitadas, algumas contendo núcleo. Em meio a essa massa podem ser encontradas células de revestimento alveolar descamadas e algumas células plasmocitárias. A parede alveolar apresenta-se com epitélio alto e hi-

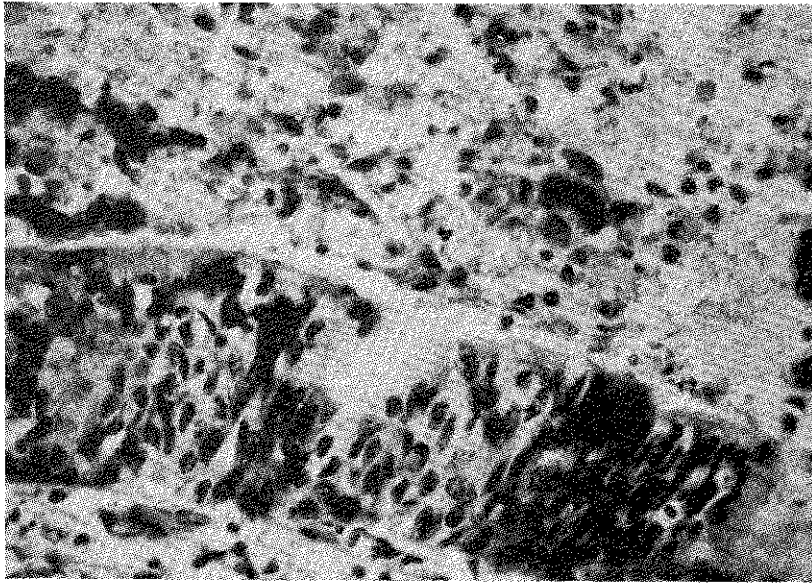


Fig. 8 — Corte de bronquíolo — Na luz, massa de *Pneumocystis carinii* e células descamadas; parede com acentuada hiperplasia de suas células (H. E.). 160 x.

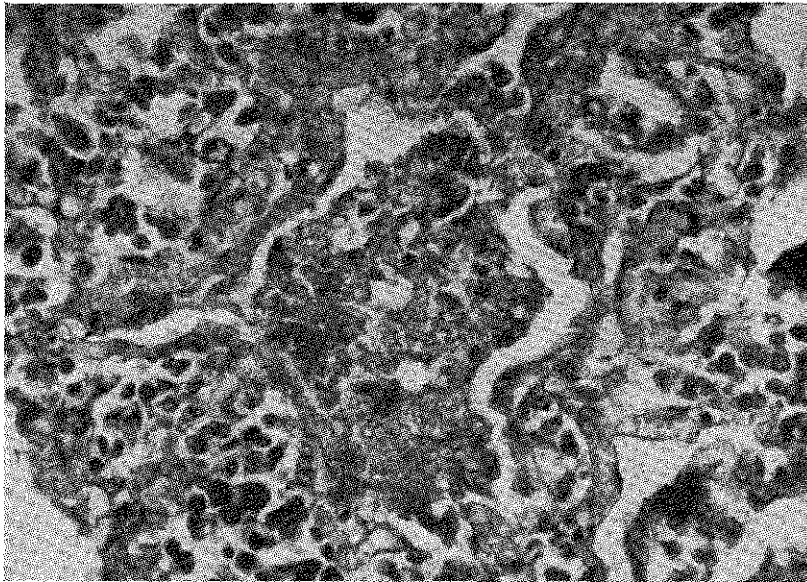


Fig. 9 — Corte de pulmão — Alvéolo pulmonar contendo massas espumosas, P. A. S. positivo. Espessamento dos septos interalveolares por células plasmocitárias e alguns linfócitos (P. A. S.). 160 x.

perplasiado, em alguns pontos totalmente descamado; no alvéolo, notam-se hemácias livres e várias células histiocitárias contêm, em seu interior, parasitos. Os brônquios apresentam epitélio de revestimento bem for-

mado, e sua luz contém a mesma formação encontrada na luz alveolar: massa de *Pneumocystis carinii* constituídas por aglomerados de quistos íntegros ou dilacerados, encerrando raramente núcleo ou nucléolos, cé-

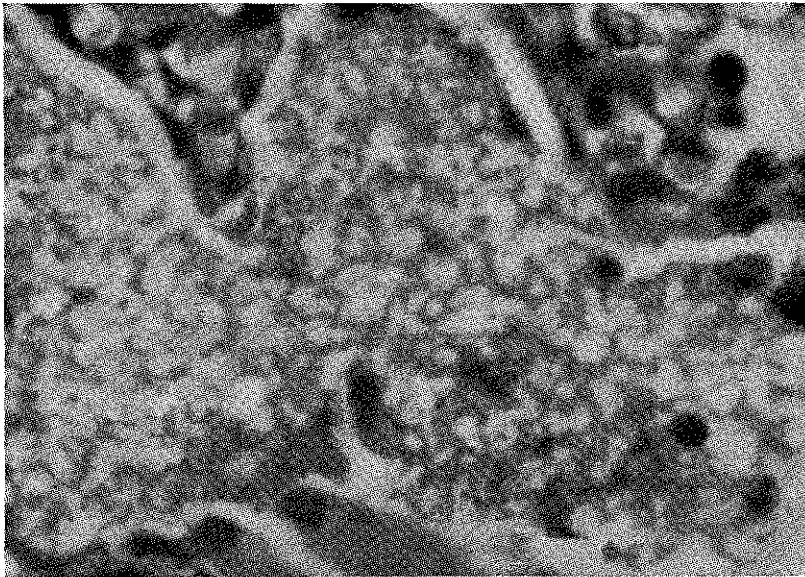


Fig. 10 — Corte de pulmão — Alvéolo pulmonar contendo massa de *Pneumocystis carinii*, P. A. S. positivo, notando-se o aspecto de "favo de mel», quistos e alguns núcleos (P. A. S.). 1000 x.

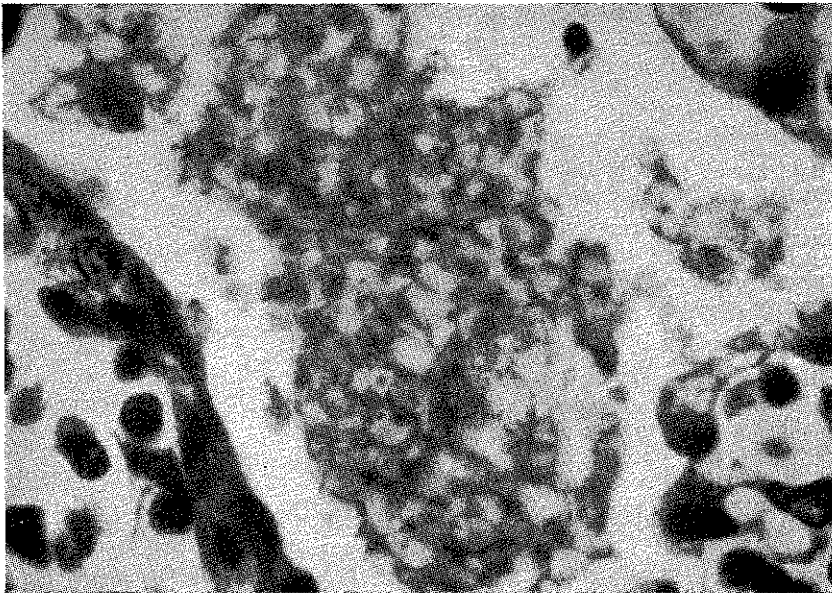


Fig. 11 — Corte de pulmão — Alvéolo pulmonar: massas espumosas constituídas por acúmulo de *Pneumocystis carinii*, P. A. S. positivo, notando-se, em alguns, núcleo central (P. A. S.). 1000 x.

lulas descamadas e apreciável quantidade de hemácias. Os bronquíolos se encontram obstruídos por conteúdo idêntico ao dos brônquios, com epitélio bastante hiperplasiado e também descamado, algumas células se encontram hipertrofiadas. Ausência de

exsudato purulento e presença de células histiocitárias contendo parasitos.

A coloração pelo P. A. S. mostra o conteúdo alveolar e bronquial corado em vermelho-púrpura, demonstrando sua positividade para mucopolissacarídeo.

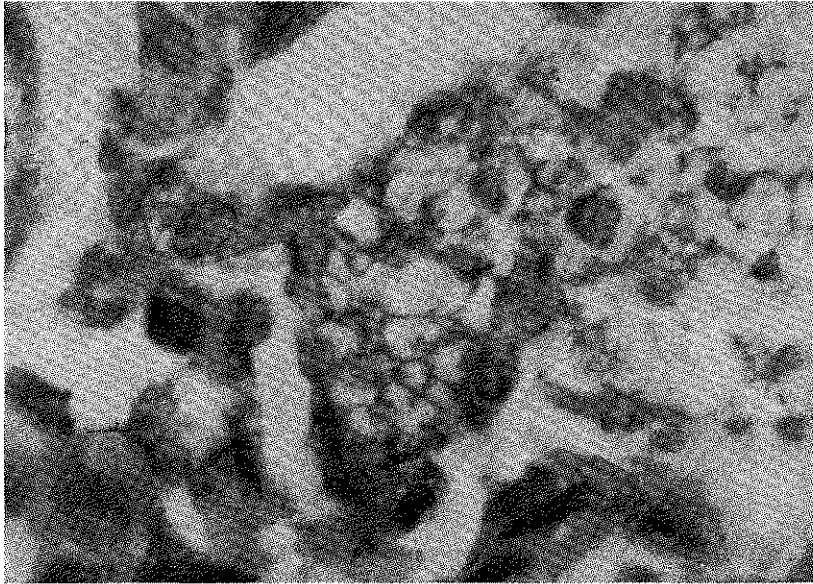


Fig. 12 — Corte de pulmão — Alvéolo pulmonar com massas constituídas por acúmulo de *Pneumocystis carinii*, P. A. S. positivo. Outro campo, com ampliação para maior detalhe (P. A. S.). 1000 x c/ ampliação.

Estômago

Exame microscópico — O exame histopatológico do estômago mostra um depósito sobre a mucosa gástrica, constituído por

acúmulo de *Pneumocystis carinii*, deglutidos pela criança, provavelmente elimináveis pelas fezes. Este achado é pela primeira vez descrito na literatura sobre o assunto (Fig. 13).

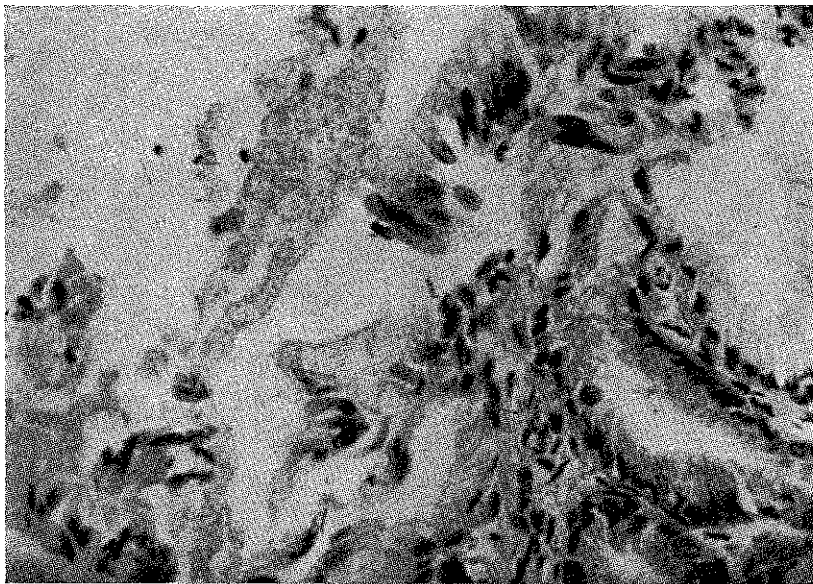


Fig. 13 — Corte de estômago — Mucosa gástrica bem conservada, com depósito contendo massas de *Pneumocystis carinii* (H. E.), 160 x.

III — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente caso é o primeiro constatado em um total de 51 300 autópsias realizadas no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da U. S. P. e Hospital Isolamento "Emílio Ribas".

Trata-se de um prematuro, gestação de 8 meses, com 2 meses de idade, apresentando sintomas de bronquiolite, com cianose irreversível e morte por asfixia, apesar de instituído o tratamento anti-infeccioso, e oxigênio. A pouca idade do paciente — 2 meses — chama a atenção no presente caso. As pesquisas histopatológicas para o lado dos pulmões e do estômago demonstram a presença do *Pneumocystis carinii*: nos pulmões, apresenta-se como vesículas reunidas em massa eosinófila, na qual podem ser notados os núcleos; êste material é positivo pela coloração pelo P. A. S.

Pela primeira vez se encontra o parasito na cavidade gástrica, devendo pois concluir-se que, nos berçários, a contaminação pode ser feita através de fezes contaminadas; pela segunda vez, foi demonstrada a sua presença em células histiocitárias.

Um exame de rotina bem conduzido poderá surpreender a presença do *Pneumocystis carinii*, quando existente, em casos de pneumonias intersticiais.

RESUMO

É apresentado um caso de pneumonia pneumocística, com revisão da literatura pertinente, particularmente dos trabalhos de Carlos Chagas e de brasileiros. Os dados clínicos dêste caso são descritos e discutidos os achados anatomopatológicos. São feitas considerações sobre a taxionomia e a identificação do *Pneumocystis carinii* e a inclusão da pneumonia devida a êste protozoário entre as pneumonias intersticiais plasmocitárias. Pela primeira vez é identificado o parasito na cavidade gástrica e confirmada sua presença no interior de células histiocitárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VANEK, J. & JIROVEC, O. — Parasitäre Pneumocie. "Interstitielle" Plasmazellenpneumonie der Frûngelborenen, verursacht durch *Pneumocystis cari-*

ni. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 158:120-127, 1952. Resumo in Trop. Dis. Bull. 49:903, 1952.

2. CHAGAS, C. — Nova tripanozomíaze humana. Mem. Inst. Osw. Cruz 1:159-217, 1909.

3. CARINI, A. — Comunicado à Soc. Med. Cir. São Paulo, em sessão ordinária em 16 de agosto de 1910. In Arq. Soc. Med. Cir. S. Paulo 1:204, 1910.

4. DELANOE, P. (M. & Mme.) — Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. C. R. Acad. Sci. (Paris) 155: 658-660, 1912.

5. PINTO, C. — Parasitoses pulmonares. Salvador, Progresso, 1957. p. 15-50.

6. VIANNA, G. — Algumas phases da evolução dos "Trypanozomas equineo e congolense". Brasil-Méd. 25:103, 1911.

7. VIANNA, G. — Algumas notas sobre o cyclo evolutivo do *Trypanosoma gambiense* (nota preliminar). Brasil-Méd. 25(7):61, 1911.

8. ARAGÃO, H. B. — Nota sobre as schizogonias e gametogonias dos trypanosomos. Brasil-Méd. 27:271-272, 1913.

9. CHAGAS, C. — Nova entidade morbida de homem. Rezumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Mem. Inst. Osw. Cruz 3:219-275, 1911.

10. CHAGAS, C. — Revisão do cyclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Brasil-Méd. 11:225, 1913.

11. CARINI, A. & MACIEL, J. J. — Ueber *Pneumocystis Carinii*. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 77:46-50, 1916.

12. COLES, A. C. — Blood parasites found in mammals, birds and fishes in England. Parasitology 7:17-61, 1914.

13. COLES, A. C. — Multiplication-forms of *Trypanosoma lewisi* in the body of the rat. Parasitology 8:184-189, 1915-16.

14. PORTER, A. — The occurrence of *Pneumocystis carinii* in mice in England. Parasitology 8:255-259, 1915-16.

15. AMMICH, O. — Uber die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. Virchows Arch. Path. Anat. 302:539, 1938.

16. Van der MEER, G. & BRUG, S. L. — Infection à pneumocystis chez l'homme et chezes les animaux. Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 22(4):301-307, 1942.

17. HERZBERG, K.; HERZBERG-KREMMER, H. & MAY, G. — Über Pneumocystis carinii bei interstitiellen Pneumonen. Klin. Wochsch. 30:822-824, 1952.
18. BERDNIKOFF, G. — La pneumonie interstitielle plasmocytaire à pneumocystis (Présentation de 13 cas canadiens). Ann. Anat. Path. 3:369-391, 1953.
19. HAMPERL, H. — La pneumonia a pneumocistis y la historia de su descubrimiento. Rev. Lat. Am. Anat. Pat. 2(2):155-162, 1958.
20. LUISI, A. — Pneumonia pneumocística. Matern. e Inf. (S. Paulo) 19:157-168, 1960.
21. BRITO, T. & ENGE, L. G. H. B. — Pneumonia intersticial plasmocelular pelo *Pneumocystis carinii*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 4(4):261-268, 1962.
22. PEARSE, A. G. E. — Histochemistry. London, Churchill, 1960. p. 831.
23. VLACHOS, J. & THAROUNIATIS, Sp. — Foot's silver and acridine-orange fluorescence staining of *Pneumocystis carinii* in smears and in sections. Stain Techn. 40(2):71-73, 1965.

Recebido para publicação em 20 de outubro de 1965.

HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO NA FORMA FATAL FULMINANTE DA HEPATITE INFECTUOSA *

HISTOPATHOLOGY OF THE LIVER IN THE FULMINANT FATAL FORM OF INFECTIOUS HEPATITIS

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS

SUMMARY

For the first time, forty sporadic cases of non epidemic infectious hepatitis of fulminant fatal form have been studied, according to Lucké & Mallory's criteria (1946).

The concept of subacute form is limited to the so called precocious subacute hepatitis (Stokes & Miller, 1946), that is, at the early stage of the evolution and without cirrhotic alterations.

It is presented also a study of the degeneration, necrosis and regeneration of the liver cells, the bile duct proliferation, the sinusoidal appearance, the interstitial infiltration, arteries and veins and reticular frame.

INTRODUÇÃO

A freqüência da hepatite infecciosa vem gradativamente aumentando em todo o mundo, preocupando sèriamente as autoridades sanitárias que têm promovido reuniões de especialistas a fim de traçarem normas para seu combate e sua profilaxia; o uso crescente da via parenteral na aplicação de injeções com seringas não autoclavadas e na transfusão de sangue humano e hemoderivados, tem contribuído de maneira acentuada para êsse aumento. A doença, freqüente em aglomerações, é epidêmica nos quartéis, escolas e internatos. O contágio oro-digestivo é de grande importância.

Dois são os tipos de hepatite infecciosa:

1) *Hepatite infectuosa* — Hepatite por vírus A, hepatite por vírus IH (infectious hepatitis) ou hepatite infecciosa.

2) *Hepatite de sêro homólogo* — Hepatite por vírus B, hepatite por vírus SH (serum hepatitis).

São clinicamente idênticas, porém, causadas por vírus diferentes e de diferentes métodos de controle. O quadro anatomopatológico é idêntico em ambas, não se diferenciando histopatologicamente. Não há teste laboratorial para diferenciar os dois tipos de hepatite. O diagnóstico diferencial entre a hepatite infecciosa e as outras hepatites é facilitado pela punção-biópsia hepática.

As denominações usadas para as "hepatites por vírus (IH e SH)" são as mais diversas, originando, por vèzes, confusão. Assim, encontramos na literatura os termos *hepatite infectuosa*, *hepatite epidêmica*, *hepatite infecciosa*, *hepatite de sêro homólogo*, *hepatite viral IH*, *Doença de Botkin*, termo usado pelos russos em homenagem a êsse pesquisador, e *icterícia catarral*.

O termo *hepatite epidêmica* não define que a moléstia também é endêmica e espalhada. O termo *hepatite infecciosa* define a origem infecciosa da afecção: hepatite pelo vírus IH e SH. O termo *hepatite de*

* Trabalho realizado na Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (Dr. Evandro Pimenta de Campos) e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Prof. Constantino Mignone).

sôro homólogo não é fiel, pois o vírus é encontrado também no sangue total e derivados e não somente no sôro sangüíneo. Por outro lado, a *hepatite por vírus IH* pode apresentar o vírus no sôro sangüíneo e ser transmitida também por via parenteral. A *icterícia catarral*, denominação usada por Wirshow, termo inadequado que ainda permanece, define a forma benigna da infecção. EPPINGER¹, 1952, estudando as hepatites, denominou a icterícia catarral de *icterícia parenquimatososa* ou simplesmente *hepatite*; esta denominação foi generalizada como *hepatite aguda*.

Apesar de o "Expert Committee on Hepatitis" da Organização Mundial de Saúde², em 1953, ter adotado as denominações *Hepatite por vírus A* e *Hepatite por vírus B*, clinicamente ainda são usados os termos *hepatite infecciosa* ou *infectuosa* ou, simplesmente, *hepatite*, para as hepatites provocadas especialmente pelos vírus *A* e *B*.

Considerações gerais — As alterações anatomopatológicas encontradas nos casos fatais de hepatite infecciosa mostram a gravidade da doença. Numerosíssimos são os casos com sintomatologia muitas vezes despercebida. O estado clínico do doente e as provas de função hepática são reflexos da intensidade do comprometimento hepático, permitindo classificar a doença em:

- a) *Hepatite aguda benigna*
- b) *Hepatite aguda forma fatal fulminante*
- c) *Hepatite crônica* (cirrose pós-necrótica ou cirrose tóxica).

A persistência do vírus *A* ou *B* no organismo humano condiciona a cronicidade da doença. Material infectante — fezes e urina — contendo o vírus *A* produz a hepatite após 15 a 40 dias de incubação, seja por administração oral, seja por via parenteral. Material contendo o vírus *B* somente produz a doença quando administrado por via parenteral, após incubação de 60 a 160 dias. Algumas observações mostram que há possibilidade de pessoas infectadas pelo vírus *A*, vários meses após a cura clínica, sem sintomas clínicos, portanto, transmitirem por via parenteral a infecção. O vírus *B* foi encontrado no sangue, após 5 anos, em indivíduos com cirrose hepática. Estudos epide-

miológicos e experimentais mostram que a maioria dos indivíduos que foram afetados pelo vírus *A* apresenta imunidade somente ao vírus *A*, mas não ao vírus *B*. A gama-globulina humana é ativa contra a infecção pelo vírus *A* e pouco ativa contra o vírus *B*. Por outro lado, não há imunidade cruzada entre os dois vírus, podendo um indivíduo que foi acometido de hepatite pelo vírus *A* ser contaminado pelo vírus *B*. O sangue de convalescentes acometidos pela infecção pelo vírus *B* apresenta pouca evidência de anticorpos específicos para esse vírus.

Os agentes comumente usados como antissépticos — álcool, éter, certos agentes químicos — não têm efeito sobre o vírus *A* e vírus *B*. O vírus *A*, no sôro e nas fezes, sobrevive ao aquecimento a 50°C, durante 30 minutos; congelado, permanece vivo, ativo, durante um ano a um ano e meio na temperatura de -10 a -20°C. Suporta ainda a cloração da água, na proporção de cloro 1/1 000 000, por 30 minutos. O vírus *B*, no sôro, sobrevive ao aquecimento a 60°C por uma hora e permanece ativo por 4 anos e meio à temperatura de -10 a -20°C e, quando dessecado, na temperatura ambiente, é ativo por um ano; resiste ao fenol, éter a 0,5%; no sangue, com 0,2% de tricresol, ainda permanece ativo; é inativado em albumina humana, após 10 horas, a 60°C. A irradiação no plasma e a ação de ultravioleta não inativam o vírus.

Vários animais podem apresentar hepatite infecciosa, havendo um vírus específico que afeta certas espécies — a hepatite do camundongo (MHV), hepatite contagiosa do cão de Rubarth (Suécia), a hepatite dos carneiros do Rift Valley (África) e a hepatite dos cavalos (África do Sul, E. U. A. e Noruega), esta última já provavelmente transmissível ao homem.

A hepatite infecciosa, que compromete principalmente jovens e adultos, tem a sua cura completa em média no período de 6 semanas. Em numerosos casos envolve para cirrose, conduzindo à invalidez. A sua mortalidade atinge 1/1000.

Nas epidemias de Hepatites (IH e SH), deverão ser tomadas medidas profiláticas, localizando o material infectante — seringas contaminadas, soros, vacinas, hemoderivados, água, fezes etc.; sua gravidade exige notificação compulsória; pois seu controle é

problema de Saúde Pública. O "Comité OMS d'Experts de l'Hépatite"³, em 1964, sugere medidas profiláticas e insiste na notificação compulsória.

Forma fatal — Nos casos fatais da moléstia — *hepatite fatal* (SNAVELY⁴, 1950) — LUCKÉ & MALLORY⁵, 1946, consideram dois grupos distintos: forma fulminante aguda e subaguda.

Lucké & Mallory descreveram casos intermediários entre pacientes que sobreviveram de 10 a 19 dias, uns com lesão histológica hepática indistinguível, da forma fulminante e outros, mais freqüentes, em que as lesões foram similares às da forma subaguda. Está claro que, se levarmos em conta a ausência ou presença de degeneração, estes casos intermediários podem ser incluídos, de modo definido, seja na forma fulminante aguda (sem regeneração) ou na forma subaguda (com regeneração).

Uma revisão cuidadosa dos trabalhos sobre a forma subaguda mostra casos de cirrose post-necrótica (hiperplasia nodular múltipla).

No presente trabalho analisamos apenas os casos de hepatite infecciosa forma fatal fulminante, aguda e subaguda (correspondente à chamada hepatite subaguda precoce de STOKES & MILLER⁶), no início de sua evolução, sem alterações cirróticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudamos 40 casos esporádicos, fatais, ocorridos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da U. S. P. e no Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", sendo 28 da forma aguda e 12 da forma subaguda.

A análise foi feita sob o ponto de vista anatomopatológico: aspectos macroscópicos e histopatológicos do fígado, salientando os fatos mais evidentes e de maior importância e chamando a atenção para as particularidades.

Em todos os casos foram retirados, para exame histológico, fragmentos de várias zonas dos lobos hepáticos. Os aspectos anatomopatológicos mais característicos foram fotografados.

São os seguintes os achados necroscópicos, resumidos dos relatórios:

1. *Estudo macroscópico*

Nos casos fatais de curta duração, quando a morte ocorre em menos de 10 dias, o fígado se apresenta de forma conservada, em geral, de volume e peso pouco reduzidos, com a superfície externa de coloração vermelho-acastanhada e cápsula ligeiramente enrugada.

A superfície de corte tem cor vermelho-púrpura, difusa, com lobulação apagada, apresentando, por vezes, pequenas manchas hemorrágicas (Fig. 1). Em alguns casos, apresenta um aspecto semelhante ao da congestão passiva crônica (aspecto de noz-moscada). As vias biliares intra e extra-hepáticas são permeáveis, sem dilatações.

A vesícula biliar é em geral tensa, de superfície externa lisa, paredes finas, às vezes edemaciadas, apresentando em sua luz bile esverdeada e de aspecto viscoso. A mucosa em geral se apresenta de aspecto aveludado.

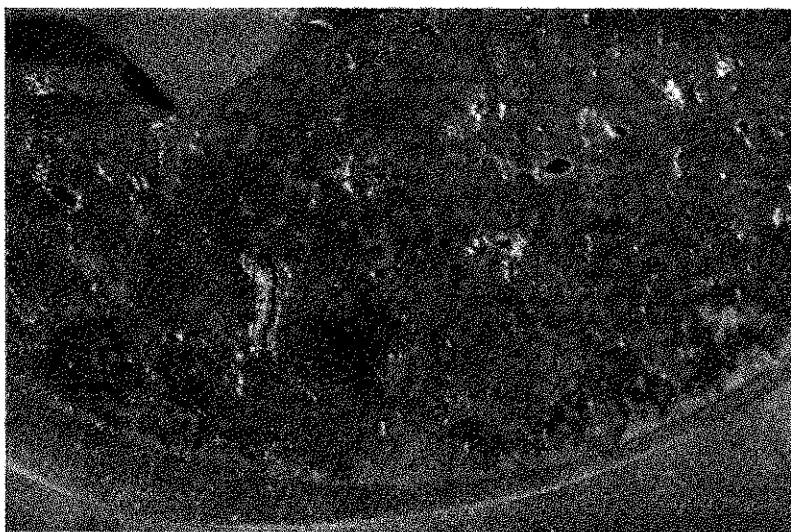
Nos casos fatais de duração mais prolongada, quando a morte ocorre depois de 10 dias de doença, portanto numa fase subaguda, o fígado é de tamanho e peso reduzidos e forma alterada.

A superfície de corte do fígado apresenta aspecto de baço, coloração irregularmente avermelhada e áreas amareladas esparsas; a lobulação hepática em parte desaparecida e áreas de regeneração hepática (esbôço de pseudo lóbulos).

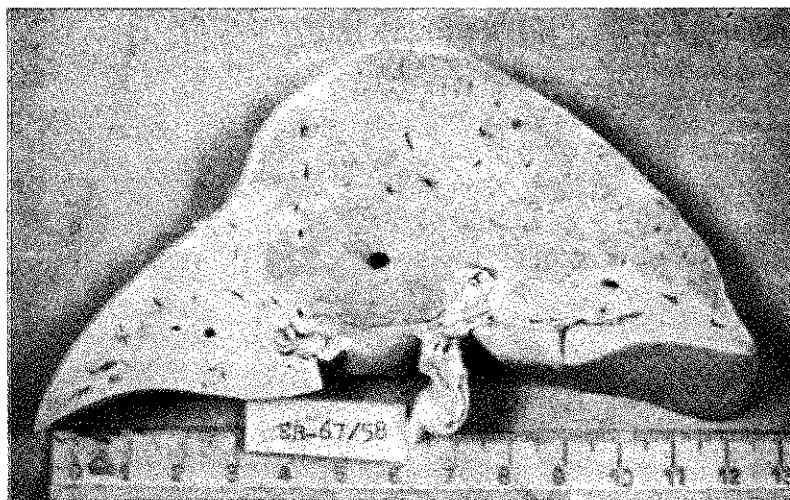
O lobo mais afetado é o esquerdo, apresentando-se mais consistente.

2. *Estudo microscópico*

a) *Forma fatal fulminante aguda* — Nos casos em que o indivíduo faleceu em plena fase aguda (menos de 10 dias), o exame microscópico mostra a lobulação conservada, porém de difícil delimitação, podendo ser observados, em suas primitivas posições, os espaços porto-biliares e a veia centro-lobular (Fig. 2). As células hepáticas mostram-se destruídas na quase totalidade dos lóbulos, desaparecendo a trabeculação (Fig. 3; vide também Fig. 4, a e b). Em alguns lóbulos permanecem hepatócitos no centro e na periferia, apresentando intensos processos degenerativos. Assim, encontramos células aumentadas de volume, com núcleo em regressão, picnótico ou já fragmentado, ou ausente; numerosas gotículas



A



B

Fig. 1 — A) Aspecto da superfície de corte de fígado, na hepatite infecciosa, forma fatal fulminante, em adulto, menos de 10 dias de evolução.
B) Superfície de corte de fígado, hepatite infecciosa, forma fatal sub-aguda; área de regeneração e de colapso do parenquima hepático; em criança de 3 anos.

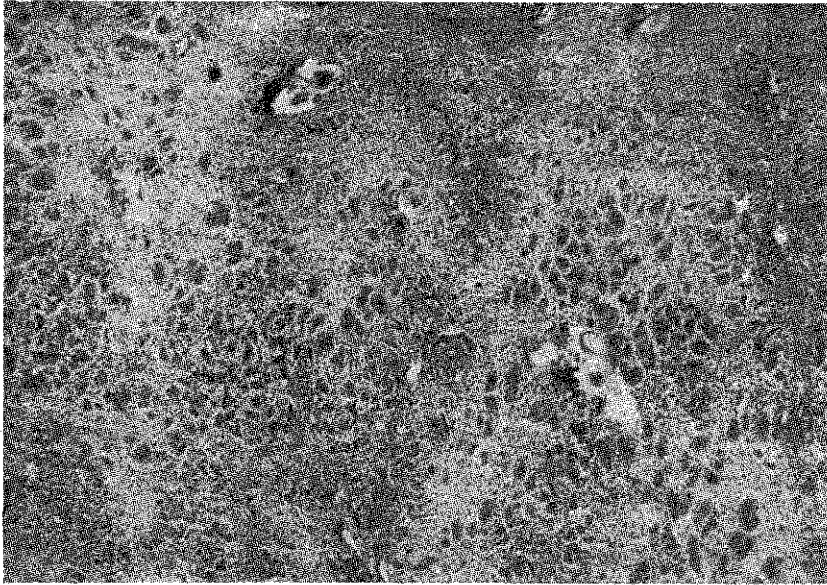


Fig. 2 — Forma fatal fulminante aguda: desorganização da trabeculação hepática; agrupamento de células conservadas; conservação das posições primitivas das veias centro-lobulares e espaços-porta. (H. E.). 63 x.

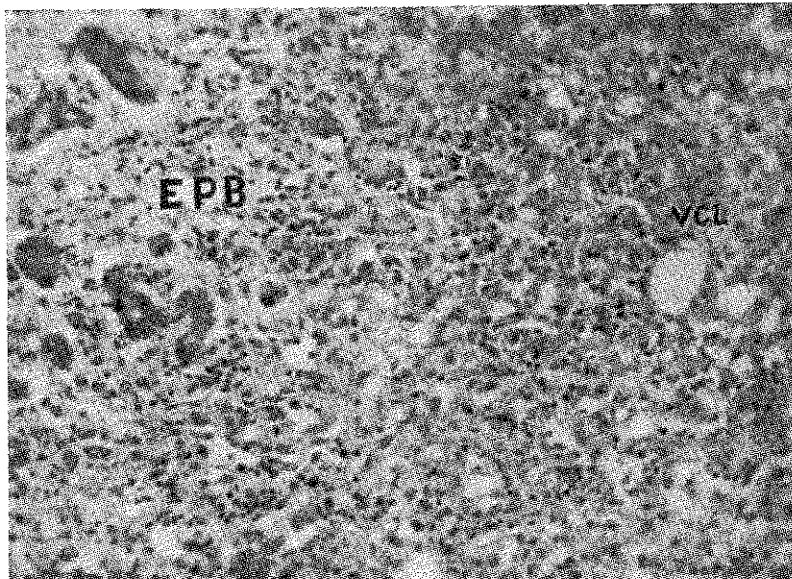


Fig. 3 — Forma fatal fulminante aguda: intensa destruição dos hepatócitos, proliferação precoce de canaliculos biliares. EPB — espaço portobiliar; VCL — veia centro-lobular. (H. E.). 160 x.

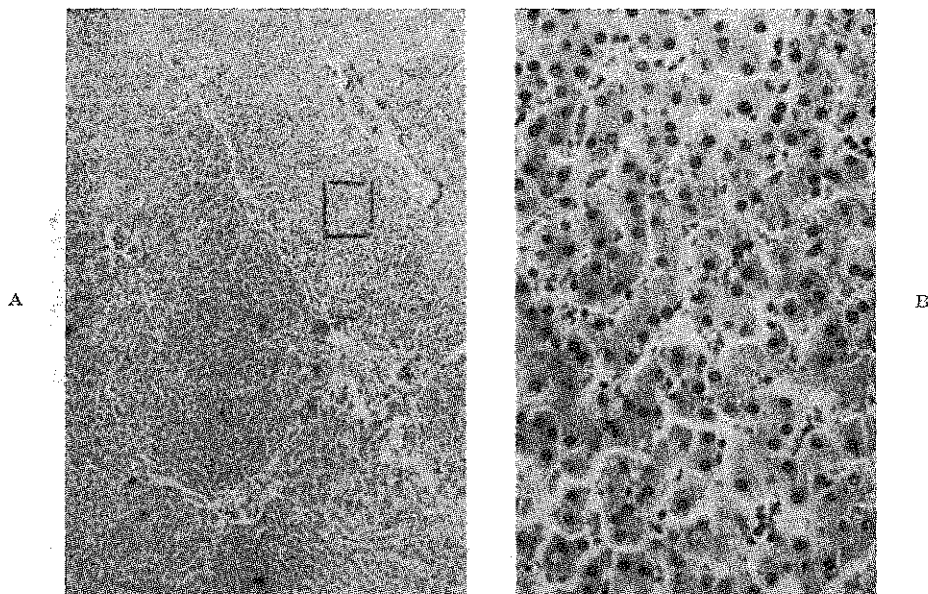


Fig. 4 — Fígado normal, para comparação com as Fig. 2 e 3. (H. E.).
A) *aum.* 60 x; B) *aum.* 160 x.

de gordura no citoplasma caracterizam a esteatose degenerativa (Fig. 5).

Há discreta retenção biliar em algumas células. Outras apresentam-se eosinófilas,

arredondadas ou ovóides, com ou sem núcleo, com os característicos corpúsculos de Rocha Lima — Councillman idênticos aos encontrados na febre amarela (Fig. 6).

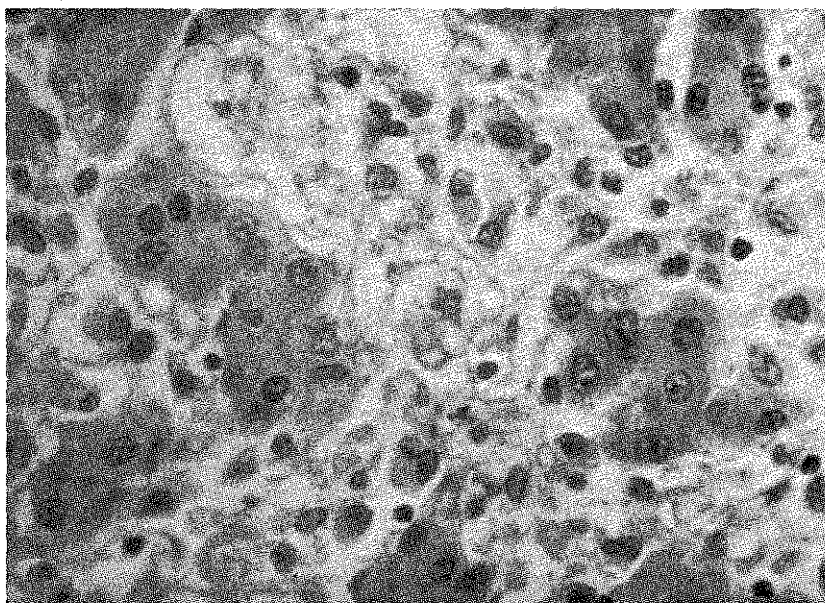


Fig. 5 — Forma fatal fulminante aguda: pequena destruição hepática. Processos degenerativos da célula hepática. (H. E.), 160 x.

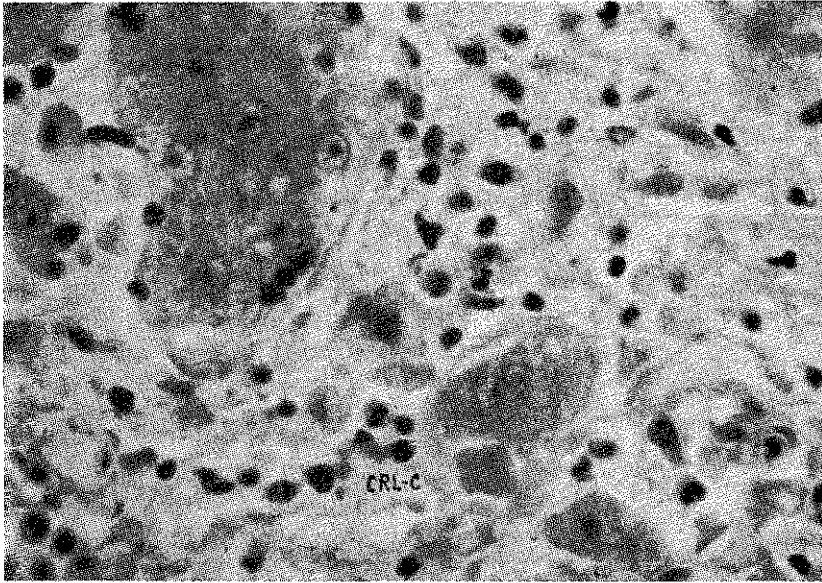


Fig. 6 — Forma fatal fulminante aguda: infiltrado inflamatório; células multinucleadas e necrose eosinófila (corpúsculos de Rocha Lima — Councilman — CRL-C). (H. E.). 160 x.

Nos espaços de Kiernan, há proliferação precoce de canálculos biliares neoformados, apresentando-se sob a forma de cordões celulares, com luz em esboço, ou evidente; alguns apresentam em seu interior elementos

celulares inflamatórios e grânulos eosinófilos. Os canálculos não obedecem a uma orientação determinada, são irregulares e alguns penetram no interior do lóbulo hepático (Fig. 7).

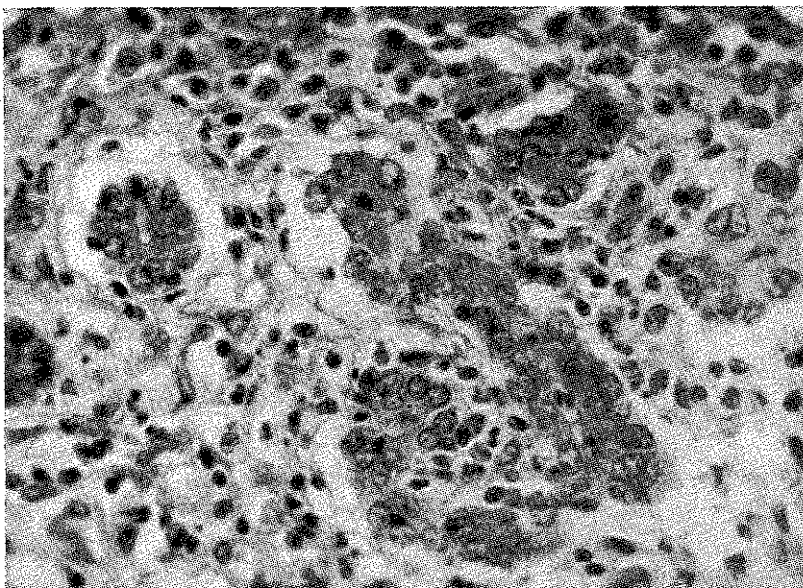


Fig. 7 — Forma fatal fulminante aguda: proliferação precoce de canálculos biliares. (H. E.). 160 x.

Notam-se pequenos focos hemorrágicos oriundos da desintegração capilar, juntamente com elementos inflamatórios e finos grânulos pardacentos com caracteres de lipofuscina. Os capilares sinusóides entram em colapso com o endotélio tumefeito, às vezes interrompido e também descamado na luz; na luz dos capilares conservados encontramos histiocitos, plasmócitos e linfócitos ao lado de outros mononucleares. Os neutrófilos praticamente não existem.

O infiltrado inflamatório nos espaços porto-biliares é grande e constituído preferentemente por linfócitos e plasmócitos e raros histiocitos; raros neutrófilos e eosinófilos (Fig. 8).

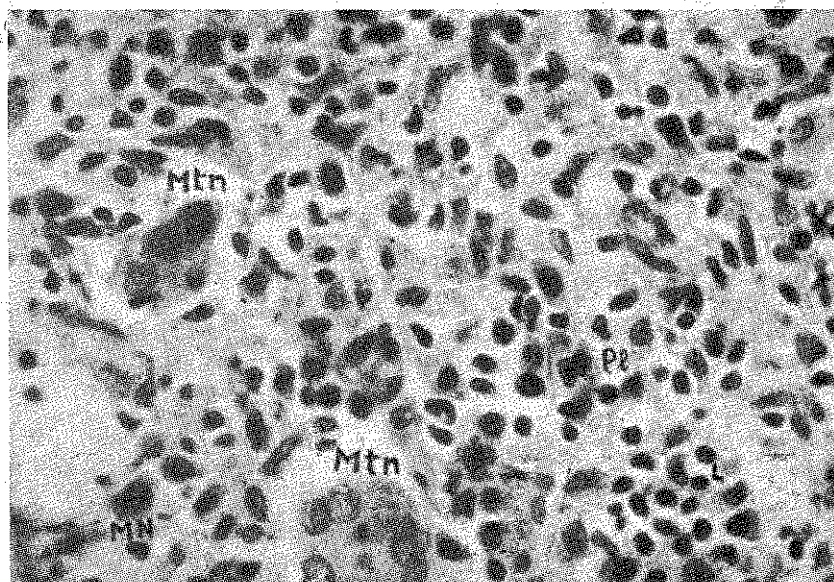


Fig. 8 — Forma fatal fulminante aguda: infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. L, linfo; Pl, plasmocitário; MN, células mononucleares; Mtn, células multinucleadas. (H. E.). 160 x.

As veias centrolobulares e veias dos espaços de Kierman estão menos intensamente afetadas e apresentam-se com as paredes infiltradas por elementos inflamatórios variáveis, e o endotélio às vezes alto (Fig. 9); este quadro — *flebite aguda* — não é constante.

As artérias de pequeno calibre dos espaços porto-biliares se apresentam com paredes espessadas, mais eosinófilas do que normalmente, com núcleos íntegros, endotélio alto, descontínuo e também descamado. Na intimidade da camada média, raramente en-

contramos vacúolos e células. Este quadro — *arterite serosa* — é pouco acentuado.

O retículo da arquitetura hepática está conservado, mostrando que o agente infeccioso tem ação epiteliolítica (Fig. 10) e não desmoltítica.

O tecido conjuntivo não apresenta alterações.

Em alguns casos de hepatite da forma fatal fulminante nota-se no citoplasma das células hepáticas uma substância eosinófila de aspecto hialino; em outros, quando o fígado está mais intensamente alterado, a veia centrolubular também está profundamente alterada, de difícil individualização,

com suas paredes sem limites precisos, encontrando-se um infiltrado linfo-plasmocitário disposto em mangüito. O retículo neste caso se apresenta em alguns pontos destruído. Em outros casos, observa-se a predominância de mononucleares ou células binucleadas.

Na forma aguda, dentro do quadro geral histopatológico acima descrito, podem aparecer outras pequenas variações resultantes do grau de intensidade da lesão hepática. A degeneração hidrópica é também observada.

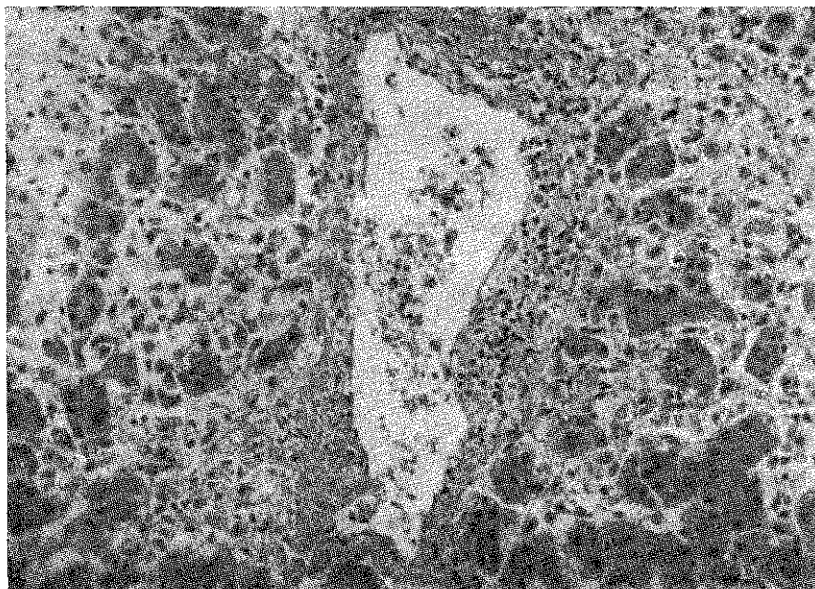


Fig. 9 — Forma fatal fulminante aguda: inflamação da parede da veia centro-lobular (flebite aguda). (H. E.). 160 x.

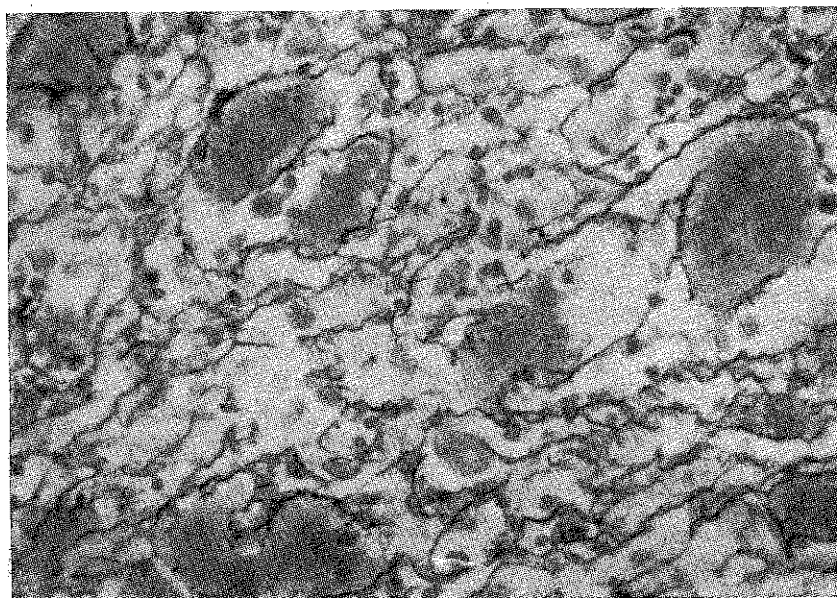


Fig. 10 — Forma fatal fulminante aguda: conservação da trama reticular (Método de Gomori para retículo). (H. E.) 400 x.

b) *Forma fatal fulminante subaguda* — Nestes casos o indivíduo falece, em geral, entre o 10.º e o 20.º dias de doença.

Ao exame microscópico o lóbulo hepático, na maioria dos casos, está intensamente al-

terado. A presença da veia centro-lobular e dos espaços de Kierman em seus primitivos lugares delimitam o lóbulo que foi destruído. Notam-se ilhotas de células conservadas, algumas volumosas, com dois, três ou mais núcleos, com o nucleólo e cromatina

frouxa. O citoplasma é claro, eosinófilo e finamente pulverulento. Grande número de outras células encerram no citoplasma grossas granulações esverdeadas e pigmento biliar, vacúolos citoplasmáticos e esteatose degenerativa (Fig. 11). Esses grupos mos-

tram tendência a formar pseudo-lóbulos (Fig. 12, 13 e 14). As alterações vasculares-capilares, veias e artérias são as mesmas encontradas na forma aguda. O infiltrado inflamatório é idêntico, porém acentuado o processo de fagocitose.

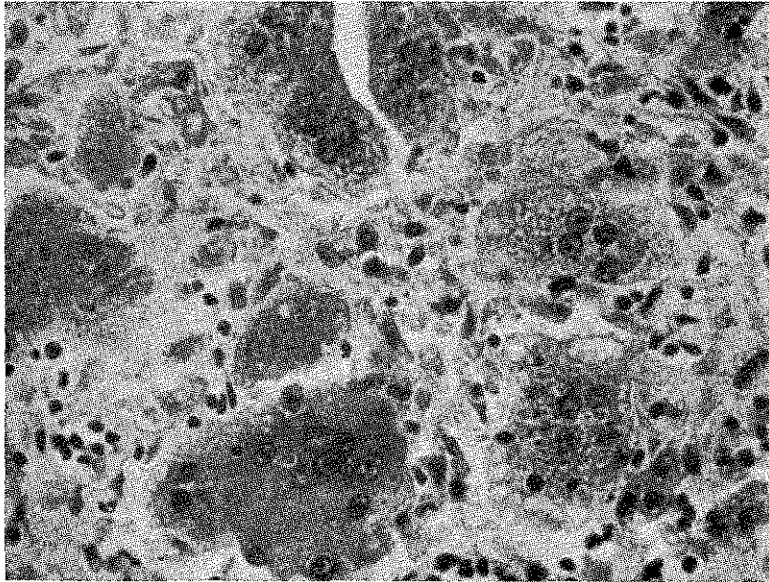


Fig. 11 — Forma fatal fulminante aguda: ilhotas de células hepáticas, multinucleadas e citoplasma de aspecto pulverulento. (H. E.). 400 x.

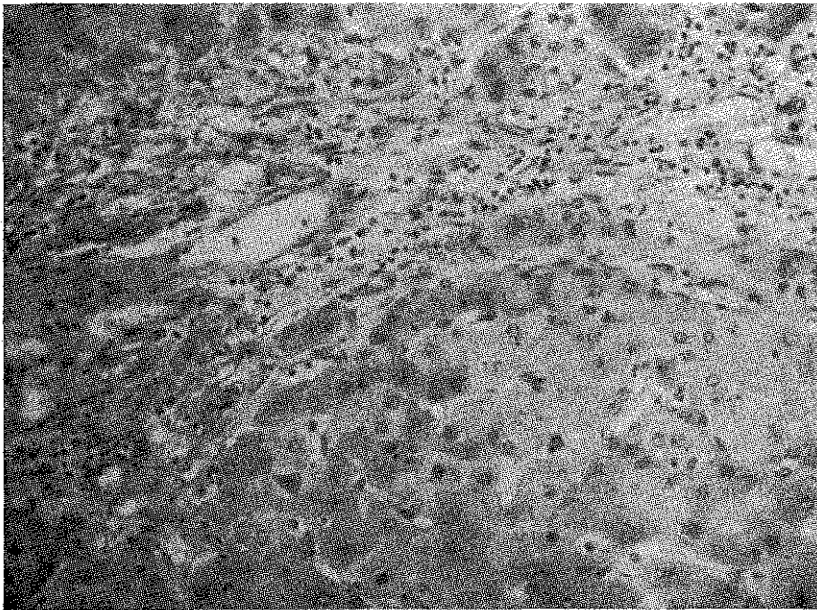


Fig. 12 — Forma fatal fulminante sub-aguda: áreas de regeneração — agrupamentos de células grandes, claras, várias binucleadas; infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário. (H. E.). 400 x.

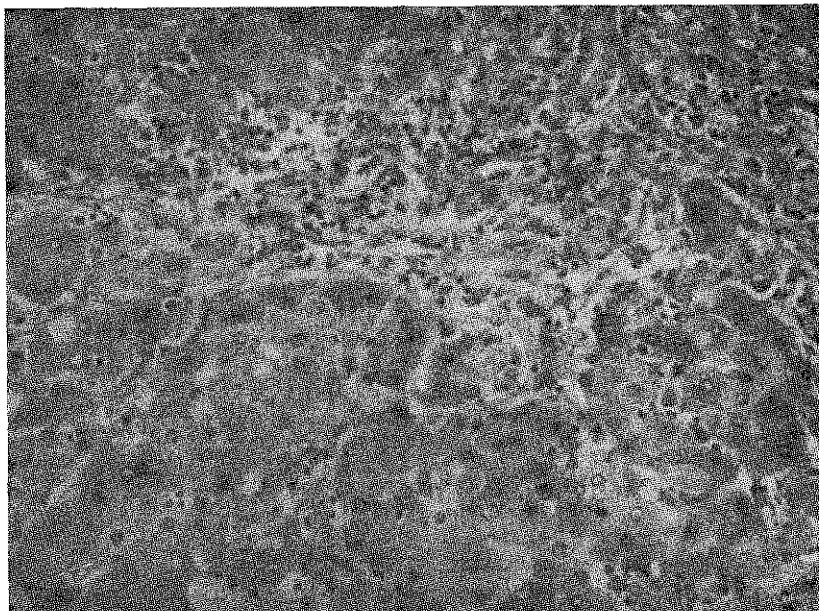


Fig. 13 — Forma fatal fulminante sub-aguda: área de regeneração hepática — esboço de formação de pseudo-lóbulos; infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. (H. E.) 400 x.

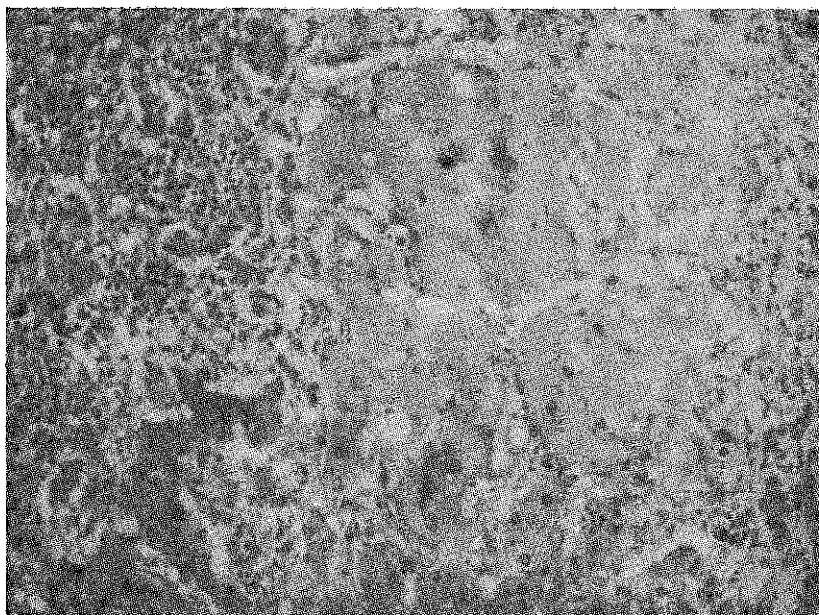


Fig. 14 — Forma sub-aguda: área de regeneração hepática — agrupamentos de células grandes, claras, binucleadas e multinucleadas; infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. (H. E.). 400 x.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Não há relação exata entre os primeiros sintomas clínicos apresentados pelos pacientes e as lesões encontradas no fígado; há uma discordância aparente entre a duração da doença e a destruição hepática. Os primeiros sinais de doença podem passar despercebidos ao enfermo, fato verificado por LUCKÉ & MALLORY⁵.

Os 40 casos apresentam lesões muito semelhantes que permitem o diagnóstico histopatológico; há, todavia, particularidades em cada caso.

As células do centro e da zona intermediária do lóbulo hepático são as mais atingidas, fato esse já verificado também por LUCKÉ & MALLORY⁵.

As alterações encontradas afetam a célula hepática, o mesênquima, os vasos e a drenagem biliar intra-hepática.

O arcabouço reticular sofre pequenas alterações na fase subaguda, apresentando-se parcialmente colabado em virtude da compressão produzida pelos agrupamentos das células hepáticas regeneradas.

O tecido conjuntivo portal não apresenta proliferação. O desarranjo da lobulação torna apagado o lóbulo hepático; este fato é constatado na totalidade ou quase totalidade dos mesmos. Algumas células não lesadas permanecem dispersas pelos lóbulos, preferentemente na periferia e apresentam então processos degenerativos, de intensidade variável, sobressaindo a degeneração gordurosa. A esteatose de pequenas gotículas pode confundir-se com a degeneração hidrópica. É freqüente a retenção de pigmento biliar intra-celular, fato esse já verificado por MONTENEGRO & BRITO⁷, 1952, também encontrada em vários outros processos hepáticos, principalmente nas síndromes obstrutivas. Algumas células apresentam formações eosinófilas semelhantes à necrose hialina da febre amarela. Nas áreas necrosadas se encontram corpúsculos hialinos, resíduos das células hepáticas sem vitalidade. O pigmento lipofuscínico é encontrado no interior das células hepáticas. As mitoses são raras.

TORRES⁸, 1928, NICOLAU *et alii*⁹, 1934 e ANDERSON¹⁰, 1950 constataram em diversas viroses a presença de corpúsculos de inclusão. Na hepatite em estudo, encon-

tramos inclusões sem características de "corpúsculos virais de inclusão".

A "célula em aranha", descrita por MADUREIRA¹¹, em 1954, como patognomônica da hepatite infecciosa, foi também por nós encontrada.

A proliferação de ductos biliares neoformados é freqüente e precoce. Nos casos 1, 2 e 5, com poucos dias de duração da moléstia — 24-48 h — eles já aparecem bem formados e ramificados. De fato, estudos experimentais em cães mostram sua formação em poucas horas. Aparecem às vezes sob forma de cordões celulares sólidos, sem luz; o posterior afastamento excêntrico das células dá lugar à formação da luz; em outros casos, os agrupamentos celulares se prolongam e tendem a ligar-se pelas extremidades, formando uma luz. O material necrótico, provavelmente, também será drenado, através da luz dos ductos biliares, assim neoformados, havendo restabelecimento do fluxo biliar, cabendo aos histiocitos o importante papel na fagocitose de detritos celulares. As células dos ductos neoformados apresentam-se claras, núcleo bem corado e pequeno, às vezes vesiculoso; podem ser confundidas com células hepáticas em regeneração. Os ductos biliares remanescentes dariam lugar aos ductos neoformados (MALLORY¹², 1911 e MALLORY¹³, 1947). Para nós, a presença destes, em pleno lóbulo hepático destruído, distante dos espaços porto-biliares, com células muito semelhantes aos hepatócitos jovens, permite concluir que sua formação se processa não só à custa das células remanescentes dos ductos biliares antigos como também à custa da célula hepática poupada.

Os capilares sinusóides estão colabados, às vezes, dilatados e cheios de hemácias, contendo ou não células inflamatórias; outras, seu endotélio é descontinuo. As células endoteliais estão entumescidas, salientes na luz; às vezes, presas apenas por um pedículo, ou libertadas. Em virtude da destruição das células hepáticas, os capilares perdem seu apoio, arrebentam-se, dando extravasamento de hemácias.

Os espaços de Disse, visíveis sob coloração especial, estão aumentados, encharcados.

A presença de neutrófilos, em alguns casos, é provavelmente devida à queda de imunidade local e ao afluxo de germes piogê-

nicos secundários, provenientes de qualquer parte do organismo; a teoria de Milian explicaria essa queda. No interior do lóbulo hepático lesado nota-se o mesmo infiltrado dos espaços porto-biliares, em menor número. Predominam os histiocitos em alguns casos.

As veias centro-lobulares e as dos espaços porto-biliares mostram processos intensos de *pan flebite aguda*. A lesão compromete todas as tûnicas do vaso e não somente a endoveia. As várias tûnicas estão dissociadas por edema e infiltradas por linfocitos, neutrófilos e raros eosinófilos, às vezes sob a forma de manguito inflamatório. LUCKÉ⁵ denomina esta lesão de *endo-flebite*. O endotélio apresenta-se tumefeito, alto, às vezes se descama na luz venosa, onde podemos encontrar neutrófilos, linfocitos e histiocitos.

As artérias de pequeno calibre dos espaços de Kierman mostram luz diminuída, com endotélio tumefeito; paredes espessadas eosinófilas. Em determinados pontos, um ou vários vacúolos nesta camada tornam a luz do vaso excêntrica. Não há células inflamatórias em sua parede, mas sim uma arterite do tipo seroso reversível.

No exame do retículo do fígado, feito em lâminas impregnadas de carbonato de prata, êste se apresenta conservado com discretos espessamentos e raramente há aproximação da trama em um ou outro ponto. O tecido conjuntivo mostra-se inalterado (coloração pelo método de Van Gieson).

Os 12 casos da forma subaguda, cuja morte se deu depois de 10 dias de doença, apresentaram em relação aos primeiros as mesmas alterações quanto à necrose celular, notando-se áreas com agrupamentos celulares desordenados, remanescentes, em início de regeneração, sem relação com a veia centro-lobular; estas células são grandes, com citoplasma abundante e claro; em sua periferia, o retículo com as malhas já pouco aproximadas, levemente calobado, denuncia que sofreu compressão pelas células em crescimento (método de Gomeri). Podem apresentar ainda pigmento biliar, esteatose e lipofucsina. A cicatrização pós-necrótica ou cirrose tóxica é a consequência.

Trombos biliares são freqüentes nos canaliculos biliares poupados.

No infiltrado inflamatório ressalta a predominância de histiocitos com grânulos fagocitados. Quanto aos neutrófilos, seu afluxo é quase idêntico. No centro dos lóbulos ou irregularmente espalhados, notam-se inúmeras áreas de hemácias livres. É mais intensa a proliferação de canaliculos biliares neoformados e o conjuntivo começa a proliferar.

O diagnóstico diferencial destas com outras hepatites já foi por nós demonstrado (CAMPOS¹⁴, 1956).

RESUMO

São estudados, pela primeira vez, 40 casos esporádicos de hepatite infecciosa, forma fatal fulminante, de acôrdo com o critério de Luché & Mallory, 1946.

Limita-se o conceito da forma subaguda ao da chamada hepatite subaguda precoce de Stokes & Miller, 1947, isto é, no início de sua evolução, sem alterações cirróticas.

É apresentado um estudo da degeneração, necrose e regeneração das células hepáticas, da proliferação dos ductos biliares, aspectos dos sinusóides, infiltrado inflamatório, lesões arteriais e venosas e aspecto do arcabouço reticular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EPPINGER, H. — Patologia de la permeabilidad. Barcelona, Labor, 1952.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Expert committee on hepatitis. First report. Geneva, W. H. O., 1953. Techn. rep. ser. 62.
3. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE — Comité OMS d'Experts de l'Hépatite. Deuxième rapport. Genève, O. M. S., 1964. Techn. rep. ser. 285.
4. SNAVELY, J. R. — Fatal hepatitis. Amer. J. Med. Sci. 219:89-103, 1950.
5. LUCKÉ, B. & MALLORY, T. — The fulminant form of epidemic hepatitis. Amer. J. Path. 22:867-945, 1946.
6. STOKES, J. F. & MILLER, A. A. — Outbreak of severe infective hepatitis in Burma. Quart. J. Med. 16:211-236, 1947.
7. MONTENEGRO, M. R. & BRITO, T. — Estudo anátomo-patológico das necroses

- hepáticas (Com especial referência à hepatite epidêmica fatal). An. Fac. Med. S. Paulo 26(2):45-94, 1952.
8. TORRES, C. M. — Inclusions intranucléaires et nécrobiose chez *Macacus Rhesus* inoculé avec le virus de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. (Paris) 99: 1655-657, 1928.
 9. NICOLAU, S. *et alii* — Les inclusions intranucléaires chez le cobaye infecté par le vole sous-dure-mérienne avec le virus de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol. (Paris) 116:820-822, 1934.
 10. ANDERSON, W. A. — Pathology. St. Louis, Mosby, 1950.
 11. MADUREIRA, PARÁ, J. F. — Surto de hepatite infecciosa em Uberaba, M. G., em 1952. Relatório preliminar, julho, 1951.
 12. MALLORY, F. B. — Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. Bull. Johns Hopk. Hosp. 22:69-75, 1911.
 13. MALLORY, T. B. — The pathology of epidemic hepatitis. J. A. M. A. 124:655-662, 1947.
 14. CAMPOS, E. P. — Hepatite epidêmica. Rev. Inst. Adolfo Lutz 16:14-36, 1956.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1966.

MEIO DE CULTURA PARA *TRYPANOSOMA CRUZI* ESTERILIZÁVEL PELO CALOR (1)

A HEAT STERILIZABLE CULTURE MEDIUM FOR *TRYPANOSOMA CRUZI*

ETTORE RUGAI (2)
RACHEL TEIXEIRA RUGAI (2)

SUMMARY

A heat sterilizable culture medium for *Trypanosoma cruzi* is described. The transfers from medium to medium give positive cultures indefinitely. The production of trypanosomes per ml of medium is 40×10^6 as an average.

INTRODUÇÃO

Meios de cultura esterilizáveis pelo calor foram descritos por LITTLE & SUBBARROW⁶, SAMPATH & LITTLE³, LITTLE & OLESON⁷, FREITAS & HAUSMANN⁴ e BONÉ³. Esses meios porém, não dão rendimento satisfatório. Os meios de WARREN⁹ e BARACCHINI¹, com solução extrativa de sangue, complementada com caldo desidratado de coração e cérebro (3), dão bom rendimento, porém, dependem da importação deste caldo, que, além do alto custo, freqüentemente não é encontrado a venda no Brasil.

Baseados no uso do sangue coagulado preconizado por LITTLE & SUBBARROW⁶ e na observação de FREITAS & HAUSMANN⁴ sobre a importância do pH na eluição do fator ou fatores de crescimento, procuramos preparar um meio com as seguintes qualidades: a) produzir culturas ricas e repiques indefinidamente; b) ser esterilizável pelo calor; c) ser límpido e não dar precipitação com o desenvolvimento dos tripanossomos; d) produzir culturas com poder antigênico; e) dar repiques com pequeno volume de inóculo; f) conservar a viabilidade da cultura durante longo tempo;

g) ser de custo relativamente baixo e preparo e reprodução fáceis; h) para determinados fins, produzir culturas sem formar agrupamentos; i) conservar suas propriedades durante longo tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio de cultura

a) Baço de boi	300,0 g
Figado de boi	100,0 g
Cérebro de boi	100,0 g
PO ₄ HNa ₂ 12H ₂ O	5,0 g
PO ₄ Na ₃ 12H ₂ O (4)	8,0 g
CaCl ₂ .6H ₂ O (4)	7,0 g
NaCl	3,5 g
KCL	0,4 g
Glicose	2,0 g
Proteose-Peptona n.º 3 Difco (5)	10,0 g
Água destilada	1000,0 ml
b) Hemácias desnaturadas	10,0 g

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

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Difco ou Oxoid.

(4) Eliminada sob a forma de fosfato tricálcico, tendo como finalidade a clarificação do meio em pH alcalino.

(5) Podem ser empregadas outras peptonas desde que testadas.

Método de preparação

a) Retirar a membrana e a gordura do baço e a cápsula do fígado. Moer o baço, o fígado e o cérebro. Adicionar o fosfato dis-sódico e a água. Levar à fervura durante cinco minutos, com agitação freqüente. Retirar do fogo e adicionar o fosfato trissódico. Agitar e adicionar o cloreto de cálcio, previamente dissolvido em 50 ml de água. Ajustar ao pH 7,8 e levar à fervura durante cinco minutos. Filtrar em papel. Lavar o precipitado colocando água destilada sobre a massa, no funil, até completar 1 100 ml de caldo. Nestes 1 100 ml de caldo adicionar a peptona, o cloreto de sódio, o cloreto de potássio e a glicose. Aquecer à fervura. Ajustar ao pH 7,6. Filtrar em papel e completar, se necessário, 1 000 ml com água destilada.

b) Hemácias desnaturadas

Sangue humano sem plasma (*) 100 ml
Álcool 99° Gl 200 ml

Adicionar o álcool ao sangue, aos poucos, agitando sempre. Deixar em repouso aproximadamente 12 horas. Colocar a massa em funil Büchner, sobre papel de filtro e fazer o vácuo para eliminar o álcool. Pulverizar o bloco formado e terminar a secagem, ao ar livre, em camadas finas. Quando completamente secas, conservam-se em temperatura ambiente sem perder a eficiência, durante mais de 6 meses.

Distribuição

a) *Para conservação das culturas* — Em tubos de 20 x 200 mm, colocar 0,1 g de hemácias desnaturadas e 10 ml do meio líquido.

b) *Para produção do antígeno* — Em balões de fundo chato de dois litros, colocar 10 g de hemácias desnaturadas e 1 litro do meio líquido.

Esterilização

Quando em tubos com 10 ml de meio, esterilizar a 115°C, durante 30 minutos. Quando em balões com 1 litro de meio, esterilizar a 115°C, durante 40 minutos.

Contrôle da esterilidade

Controlar a esterilidade durante 48 horas a 37°C e depois, 5 dias, em temperatura ambiente.

Semeadura

Usar culturas ricas e vigorosas. Para conservação das amostras de tripanossomos, semear 0,1% e para a produção de tripanossomos para antígeno ou outros fins, semear 1%. Para abreviar o tempo de incubação, semear 5% ou mais.

Incubação

Incubar a 28°C, durante 6 a 15 dias, agitando 2 a 3 vezes ao dia.

Colheita

Agitar o meio. Deixar em repouso durante 5 minutos para sedimentação das hemácias. Decantar. Centrifugar o sobrenadante a 3 000 rotações durante 20 minutos. Decantar. Suspender o sedimento em solução fisiológica na proporção de 10 ml por litro de meio centrifugado. Centrifugar a 1 000 rotações durante 1 minuto para sedimentação das hemácias ainda presentes. Decantar o sobrenadante que encerra só tripanossomos. Centrifugar e lavar mais duas vezes por centrifugação.

RESULTADOS

A eficiência do meio foi testada com as amostras de tripanossomos n.º 34, 15, 5, BT e Y. Estas amostras estão sendo mantidas neste meio há dois anos, com mais de 40 repiques sucessivos.

Este meio produz, em média 40×10^6 tripanossomos por ml, com turvação correspondente ao tubo n.º 4 da escala de sulfato de bário MacFarland. Dá culturas com inóculo de 0,01%. Conserva a viabilidade das culturas durante 60 dias, no mínimo, com inóculo de 0,1%. Os tripanossomos crescem dispersos. A massa de tripanossomos centrifugados apresenta cor acinzentada e livre de partículas estranhas.

(*) Obtido em Bancos de Sangue, que o rejeitam depois de aproveitar o plasma. A preferência é devida à facilidade com que pode ser obtido. Sangue de coelho ou de boi também pode ser empregado.

O meio produz culturas com poder antigênico que atinge, no mínimo, 1:80, tanto com o antígeno metílico, preparado segundo BARACCHINI², como com a suspensão de tripanossomos a 1:10. A técnica empregada nestas dosagens foi a de KOLMER⁵ (desvio do complemento).

De custo relativamente baixo, preparo e reprodução fáceis, este meio conserva suas propriedades durante meses, se protegido da evaporação.

RESUMO

Foi descrito um meio de cultura líquido para tripanossomos, esterilizável pelo calor.

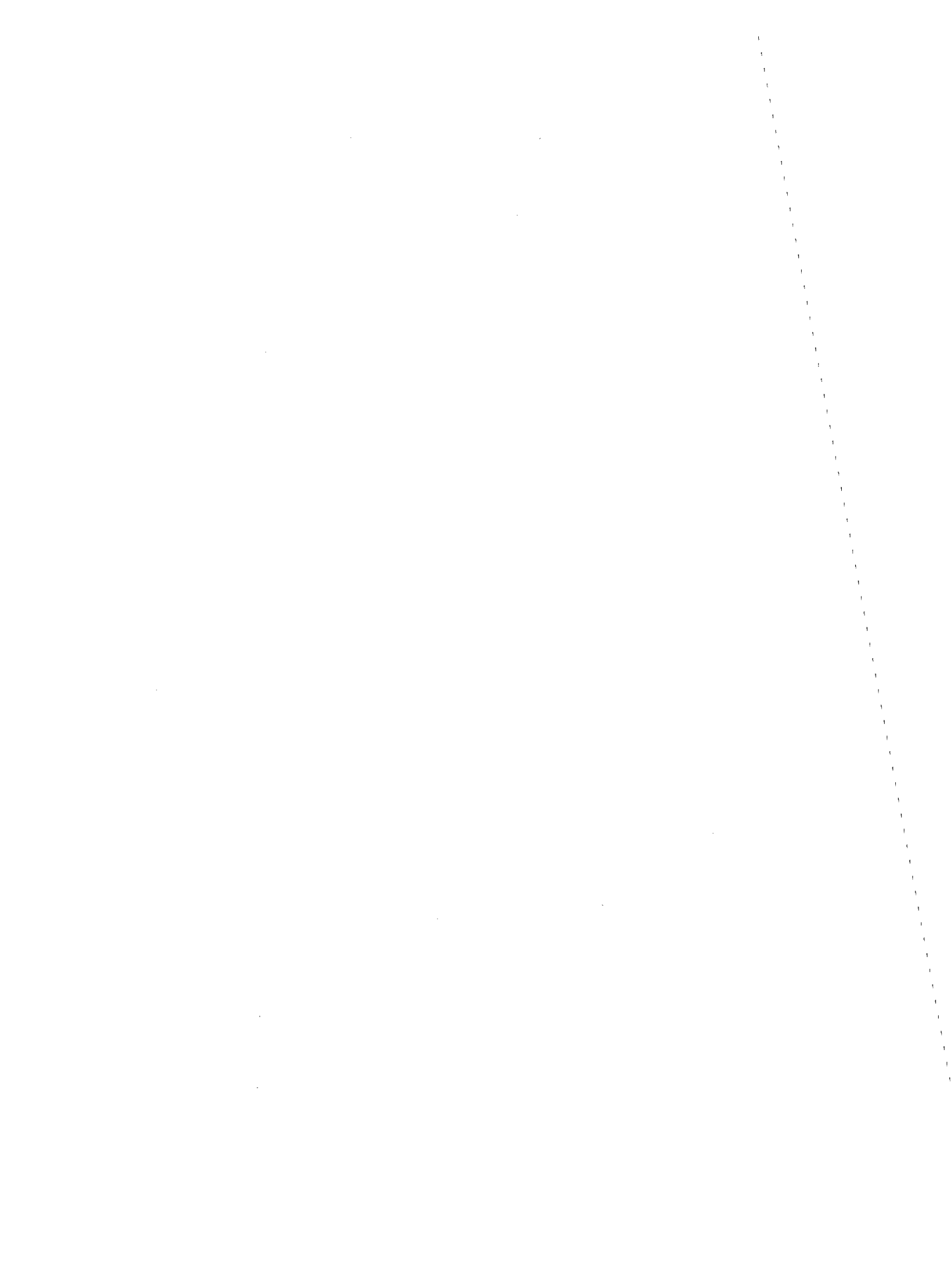
O meio dá repiques indefinidamente. Produz em média 40×10^6 de tripanossomos por ml de meio.

Agradecimentos — Agradecemos ao Dr. Manoel de Britto e Silva pelas amostras de tripanossomos que nos forneceu. Ao Dr. Miécio de Azevedo, D. Altemízia e Sr. Antônio Amorosino pela colaboração que nos prestaram na titulação dos antígenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARACCHINI, O. — Meio de cultura líquido esterilizável pelo calor. Rev. Inst. Adolfo Lutz 22/23:91-92, 1962/1963.
2. BARACCHINI, O.; COSTA, A & CARLONI, J. — Emprêgo do calor e do metanol no preparo de antígeno de "Trypanosoma cruzi". Hospital (Rio) 68(6): 1318-19, 1965.
3. BONE, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31(2):261-266, 1963.
4. FREITAS, G. & HAUSMANN, R. — Sobre o crescimento de *Schizotrypanum cruzi* em meios livres de proteínas nativas. An. Acad. Bras. Cienc. 26(1): 531-535, 1954.
5. KOLMER, J. A.; SPAULDING, E. H. & ROBINSON, H. W. — Approved laboratory technic. 5. ed. New York, Appleton, c1951. p. 814-820.
6. LITTLE, P. A. & SUBBAROW, Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. J. Bact. 50(1):57-60, 1945.
7. LITTLE, P. A. & OLESON, J. J. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi*. J. Bact. 61(6):709-714, 1951.
8. SAMPATH, A. & LITTLE, P. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in liquid media. J. Bact. 57(2):265, 1949.
9. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. 1. Effect of culture age, and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasit. 46(5): 529-539, 1960.

Recebido para publicação em 16 de Junho de de 1966.



CONCENTRAÇÕES DAS DROGAS EM TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

1. Estudo sôbre Sudan IV ⁽¹⁾

REAGENTS CONCENTRATIONS IN HISTOLOGICAL TECHNIQUES.

1. Study on Sudan IV

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS ⁽²⁾
NILZA BAPTISTA ⁽²⁾
ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI ⁽²⁾
MATHILDE TRIGO PIRES DE MESQUITA ⁽²⁾

SUMMARY

Excellent staining of lipidic materials in easily discerned bright red against a blue background is obtained by using Sudan IV and Ehrlich's hematoxyllin in concentrations lower than usually recommended. The procedure has been applied to sections from human organs, from inoculated animals and from cocoa seeds.

INTRODUÇÃO

Em virtude do elevado custo das drogas de laboratório e das dificuldades de importação, é de interesse verificar-se quais as mais baixas concentrações dessas drogas a serem usadas em técnicas histológicas, sem prejuízo dos resultados.

Neste trabalho demonstramos que a coloração de gorduras em tecidos, pelo Sudan IV e pela hematoxilina de Ehrlich, pode ser efetuada em concentrações bem mais baixas do que as usualmente recomendadas, com grande economia e bons resultados técnicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cortes de cinco autópsias efetuadas na Diretoria de Patologia ⁽³⁾, constituídos por tecidos de supra-renal, artéria com arteriosclerose, fígado com hepatite aguda fulminante, rim e fígado com esteatose e tecido celular subcutâneo; fragmen-

tos de coração e pulmão de ratos injetados com drogas colinérgicas, gentilmente cedidos pelo Dr. F. W. Eichmaum, e sementes de cacau, cortadas no criostato, cedidas pelo Dr. Yehuda Levanon. Todos os materiais escolhidos são tecidos ricos em gordura.

Drogas empregadas

1) *Fixadores*

a) Formol a 10% — mistura de formol a 40%, água destilada (10:90, v/v).

b) Formol tamponado neutro, 1:10

Formalina (Aldeído fórmico a 40%)	100 ml
Água destilada	900 ml
Fosfato de sódio monobásico	4,0 g
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	6,5 g

(1) Trabalho realizado na Seção de Anatomia Patológica da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Necrópcias n.º I. A. L. — 3882, 3897, 3905, 3881, 3930.

2) Corantes

- a) Sudan IV ou Scarlet R 0,04 g
Alcool a 70% 50 ml
Acetona 50 ml
- b) Hematoxilina de Ehrlich de fórmula conhecida, porém diluída em água destilada (1:6, v/v).

Nota — Ambos os corantes não cesessitam ser filtrados.

3) Soluções

- a) Alcool a 70%
- b) Gelatina de Kaiser
Gelatina 10 g
Água destilada 60 ml
Aquecer até a gelatina ficar dissolvida e acrescentar:
Glicerina 70 ml
Acido fenico 1 ml
(liquefeito em banho-maria)

Filtrar em estufa e, para conservar a solução, juntar 0,1 g de ácido fênico ou 0,01 g de mertiolato incolor.

No momento de ser usada, esta solução é posta em estufa a 58°C, para ser liquefeita.

Técnica para cortes de congelção

- 1) Fixar os tecidos em solução de Formol tamponado a 10% ou em Bouin.
- 2) Lavar os tecidos em água de torneira.
- 3) Fazer cortes com 10 ou 15 μ , no micrótomo de congelção.
- 4) Recolher os cortes em vasilhame com água de torneira.
- 5) Colocar os cortes em alcool a 70%, durante 2 minutos.
- 6) Corar os cortes no Sudan IV, durante 2 1/2 a 5 minutos. O corante não necessita ser filtrado.

7) Lavar bem os cortes em alcool a 70%, até que o excesso do Sudan IV seja removido.

8) Lavar os cortes em água destilada, tomando cuidado para evitar dilacerção devido à diferença de tensão superficial dos dois líquidos (alcool e água).

9) Colocar os cortes na hematoxilina de Ehrlich, diluída mas não filtrada, durante 2 minutos. Cuidar do tempo, pois a permanência por mais de 2 minutos nessa solução daria coloração muito intensa da hematoxilina, prejudicando, assim, o aspecto da lâmina.

10) Passar os cortes 3 vezes em água de torneira, para retirar o excesso da hematoxilina, deixando-os na última água pelo menos 10 minutos para azulecer o suficiente.

11) Montar em gelatina de Kaiser previamente aquecida.

Técnica para cortes no criostato

- 1) Congelar no criostato durante 1/2 hora.
- 2) Cortar com 8 μ de espessura.
- 3) Com lâmina cuidadosamente limpa e seca, apreender o corte.
- 4) Colocar na estufa a 55°C, durante 10 minutos.
- 5) Deixar esfriar.
- 6) Colocar no formol a 10% ou em Bouin, por 1/2 hora, para fixar.
- 7) Lavar em água de torneira (duas mudanças).

Proceder à coloração normal anteriormente descrita para cortes de congelção, a partir do item 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Sudan IV¹ é solúvel nos lipóides², por isso aparecem como se fôsem corados; geralmente é usado a 1%, em partes iguais de alcool a 70% e acetona, solução que é

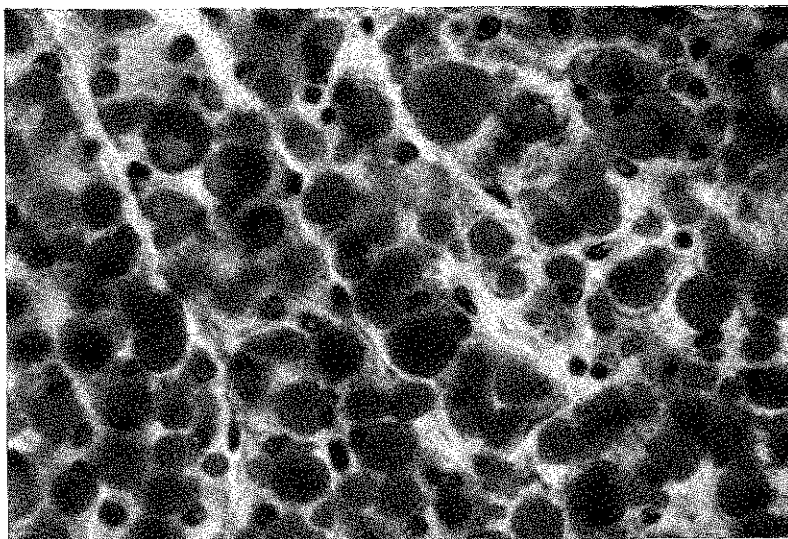


Fig. 1 — Corte de glândula supra-renal humana. Corte em congelamento. Coloração pelo Sudan IV modificada. Fundo pela hematoxilina de Ehrlich.

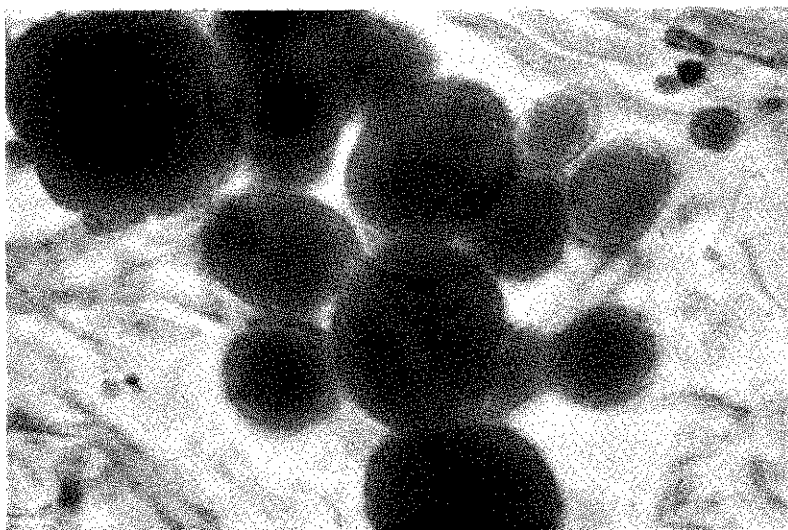


Fig. 2 — Corte de tecido celular sub-cutâneo. A mesma coloração da fig. 1.

saturada. Executamos colorações com várias concentrações e verificamos que o Sudan IV cora perfeitamente bem até a concentração de 0,04%. O mesmo fizemos com a hematoxilina de Ehrlich e constatamos que ela fornece melhores resultados na diluição de 1:6, v/v, do que na de 1:4, indicada por PEARSE³.

Utilizando-se as concentrações por nós determinadas, obtêm-se as seguintes vantagens:

- 1) Evita-se o desperdício de drogas.
- 2) Evita-se a filtração das soluções⁴.
- 3) As lâminas apresentam-se mais limpas e bem nítidas (Fig. 1 e 2). Os núcleos e as membranas citoplasmáticas das células apresentam-se de um azul intenso e o citoplasma, claro. Os lipóides dentro das células e os localizados nos interstícios celulares aparecem corados de vermelho alaranjado bem intenso.

Aconselhamos desprezar a solução usada de Sudan IV, quando empregada para corar órgãos muito ricos em lipóides, evitando-se desta maneira que os cortes isentos de gordura apresentem uma falsa positividade. Chamamos a atenção, também, para a limpeza da vidraria utilizada, bastando para isso limpá-la com algodão embebido em xilol, no qual o corante é solúvel.

CONCLUSÕES

Empregando-se as soluções de Sudan IV a 0,04% em álcool e acetona e a hematoxilina de Ehrlich diluída a 1:6 v/v, obtêm-se melhores resultados que os apresentados pelas soluções clássicas usualmente indicadas e utilizadas.

RESUMO

Foram utilizadas várias concentrações de Sudan IV e Hematoxilina de Ehrlich para colorações de gorduras em tecidos com a finalidade de se conseguir uma percentagem ideal que resultasse na economia de corante e apresentasse grande nitidez dos cortes histológicos. Isso foi conseguido nas concentrações de 0,04% para o Sudan IV e 1:6 v/v para a hematoxilina de Ehrlich, de acordo com a técnica indicada no texto.

Agradecimentos — Ao Dr. Antônio J. Brandi, Chefe da Seção de Anatomia Patológica, ao Dr. Juan J. Angulo, Chefe da Seção de Patologia Experimental, ao Dr. José C. Arminante, médico patologista da Diretoria de Patologia, à Dra. Yolanda Tavares, Chefe do Laboratório de Bioquímica e a Regina Celia Machado, estagiária nesta Diretoria. Ao Sr. Justino da Silva, da Diretoria dos Serviços Técnicos e Auxiliares, pela execução das microfotografias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LILLIE, R. D. — Histopatologic technique and practical histochemistry. 6. ed. New York, Blakiston, 1954. p. 300.
2. DE ROBERTIS, E. D. P. — Biología celular. Buenos Aires, El Ateneo, c1965. p. 116.
3. PEARSE, A. G. E. — Histoquímica teórica y aplicada. Versión española de Tomas Palomo Salas. Madrid, Aguilar, c1960.
4. HUMASON, G. L. — Animal tissue techniques. S. Francisco, Freeman, [c1962]. p. 255.

Recebido para publicação em 11 de abril de 1966.

INIBIDORES BACTERIANOS NO LEITE DE CONSUMO DA CAPITAL (1)

BACTERIAL INHIBITORS PRESENT IN MILK OF S. PAULO, BRAZIL

ALEXANDRE MELLO FILHO (2)
LAURO ALBANO SANDOVAL (3)
NELSON DOS REIS RODRIGUES (4)
JOSÉ XIMENES (5)

S U M M A R Y

For the last twenty years the literature dealing with the presence of bacterial inhibitors in milk and its derivatives has been increasing steadily.

Bacterial inhibitors in milk may be originated either from antibiotics given to the cows or from chemical treatment of the pipeline.

In 1959, Food & Drug Administration, U. S. A., declared undesirable the presence of penicillin in milk dairy products since it may cause chronic or recurrent dermatosis. Nation wide research programs demonstrated different levels of antibiotic in milk and derivatives.

The presence of bacterial inhibitors may, further, lead to errors in standard tests carried out in milk such as reductase test, bacterial counts, acidity test, etc.

Milk containing inhibitors may respond satisfactorily to routine tests, in spite of being highly infected in its source. On the other hand, milk produced under hygienic conditions may yield less satisfactory results in such tests.

The inhibitors may influence the normal flora metabolic capacity decreasing acid production and therefore affecting adversely the industrialization of milk.

In Brazil there has been practically no research programs carried out with the purpose to detect the presence of such inhibitors, mainly penicillin, in milk and dairy products.

One thousand samples of milk (type C) from São Paulo have been tested by means of tests that can be read after 2h30m to 3h30m. In 9% of the samples, inhibitors were found and penicillin levels between 0.05 to 0.5 U. I./ml were found in 1.9% of the samples.

INTRODUÇÃO

Há mais de 15 anos vem a literatura mundial, notadamente a norte-americana, se enriquecendo com inúmeros trabalhos de pesquisa da presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano no leite, principalmente os antibióticos e, destes, destacadamente a penicilina pela maior faci-

lidade na sua pesquisa com a utilização da enzima específica — a penicilinase.

Conforme citam MARTH & ELLICKSON¹, em 1959 e MARTH² e VAID³, em 1961, em trabalhos de revisão da literatura a respeito da presença de resíduos de antibióticos no leite e derivados, com o advento da antibiótico-terapia, os antibióticos passaram a ser empregados há quase duas

- (1) Realizado nos Laboratórios da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Apresentado, em caráter de nota preliminar, no Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina, em 4-8-1966.
- (2) Chefe da Clínica Dermato-sifilográfica do Hospital Municipal. Bacteriologista-Chefe da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.
- (3) Chefe da Seção de Industrialização do Leite do Departamento de Produção Animal.
- (4) Chefe da Divisão de Controle de Qualidade, de Laborerápica-Bristol S/A.
- (5) Chefe do Laboratório de Controle Microbiológico da Laborerápica-Bristol S/A.

décadas, por fazendeiros e veterinários, no tratamento das doenças infecciosas do gado, das quais indubitavelmente a mais freqüente é a mastite, sendo também comum a incorporação daquelas drogas nas dietas suplementares, na alimentação do gado ou mesmo na conservação das silagens.

Os diversos antibióticos, nos animais afetados pela mastite, são administrados geralmente em solução ou suspensão, difundidos no quarto ou quartos do úbere infectado.

A penicilina foi a primeira de uma série de antibióticos empregados no tratamento daquela infecção, já em 1946, sendo após utilizados os demais — estreptomicina, tetraciclínicos, cloranfenicol, neomicina, bacitracina, subtilina e polimixina — isoladamente ou em forma de associação medicamentosa.

A ordenha de animais assim tratados, num período médio de até 72 horas ou seja três dias após a última aplicação, revelou nitidamente a presença dos antibióticos em uso. Entretanto, outras doenças infecciosas acometem o gado leiteiro, havendo a necessidade do emprêgo de diversos antibióticos administrados, entre outras vias, principalmente pela oral, intra-uterina ou injetável, com eliminação relativamente rápida daquelas substâncias.

Porém, quando se utiliza a penicilina "retard", especialmente a benzatina, a sua eliminação extremamente lenta resulta na presença contínua e prolongada do medicamento no leite ordenhado ^{4, 5, 6}.

Não é de se estranhar, pois, que tais práticas venham condicionando o aparecimento dos antibióticos no leite, principalmente quando os animais tratados não são afastados do rebanho, por período de tempo adequado.

A contaminação antibiótica dependerá evidentemente do número de animais em tratamento, da quantidade do leite que os mesmos produzem em relação ao total ordenhado e da potência maior ou menor do antibiótico empregado.

Entretanto, além do uso abusivo e indiscriminado daquelas preparações, conforme acentua o "The Journal of the American Medical Association", no seu artigo "Penicillin and others antibiotics in milk", existe

alguma suspeita de que os antibióticos estejam sendo diretamente adicionados ao leite, como recurso de conservação contra a deterioração do produto, verificada por excessiva multiplicação da flora microbiana, no verão ou nos dias em que a temperatura se mantém elevada ⁷.

Nos últimos anos, uma série de trabalhos de pesquisa estatística tem sido realizada nos Estados Unidos, Canadá e Grã-Bretanha, entre outros, visando determinar a incidência de antibióticos no leite dado ao consumo.

Nos Estados Unidos, três investigações foram levadas a efeito seguidamente em 1954, 1955 e 1956, pela *Food and Drug Administration*, tendo sido constatada a presença de penicilina, bacitracina e tetraciclina no leite analisado nesses anos. A penicilina foi encontrada em 3,2%, 11,6% e 5,9% das amostras examinadas respectivamente em 1954, 1955 e 1956 e em níveis que variavam entre os valores de 0,003 a 55 unidades por mililitro de leite.

Na Grã-Bretanha, as investigações realizadas no verão e inverno de 1951 e em 1953 demonstraram a presença da penicilina respectivamente em 1,4%, 2,8% e 3,2% das amostras de leite analisadas e com níveis do antibiótico variando entre 0,25 e em 15 unidades por mililitro, em 1951 e 0,1 a 1,17 unidades, em 1953.

Porém as conseqüências, da ordem de Saúde Pública, do uso veterinário dos antibióticos e do seu aparecimento no leite dado ao consumo humano foram se traduzindo no aparecimento de raças de estreptococos e estafilococos patogênicos, originários das mastites e tornados antibiótico-resistentes e que são eliminados no leite a par com o antibiótico, já agora ineficiente ^{2, 8}.

Foi também relatada a ação das drogas sobre o equilíbrio e composição microbiana da flora intestinal humana, com evidente interferência na síntese local microbiana das vitaminas ^{8, 9}.

O leite com contaminação penicilínica tem sido apontado por diversos pesquisadores como o causador, em pessoas previamente sensibilizadas, de processos alérgicos cutâneos, dos quais os mais freqüentes são as urticárias crônicas recorrentes ^{10, 11, 12, 13}.

Entretanto, os métodos usados comumente para o beneficiamento do leite, a pasteu-

rização e o resfriamento, não afetam os antibióticos. O leite, em estado de cru, sofre uma série de operações industriais: pasteurização, evaporação, secagem e resfriamento, de acordo com a finalidade do seu uso, "in natura", em pó ou condensado.

O calor não afeta sensivelmente os antibióticos. A atividade da penicilina no leite permanece parcialmente, mesmo após a fervura durante 60 minutos, ou autoclavagem durante 15 a 30 minutos.

Os demais antibióticos são igualmente bastante termo-resistentes. A clortetraciclina não é inativada pelo tratamento térmico a 63° C, durante 30 minutos, 88° C durante 60 minutos ou 121° C durante 15 minutos¹⁴.

Segundo OVERBY ^{apud} 2, 1952, a pasteurização do leite não inativa os seguintes antibióticos: clortetraciclina, cloranfenicol, estreptomomicina e oxitetraciclina. A penicilina, igualmente, passa indene pela pasteurização.

A separação do leite em creme e leite desnatado, segundo estudos de HANSEN, WIGGINS & BOYD¹⁵, 1950, não aumenta a concentração da penicilina ou da estreptomomicina. A estocagem do leite refrigerado a 8 ou 10° C não interfere, durante um período que vai até sete dias, na atividade dos seguintes antibióticos: penicilina, estreptomomicina, clortetraciclina, magnamicina, bacitracina e polimixina.

Segundo HIBBS & BOYD ^{apud} 2, 1957, ficou demonstrado que as amostras do leite contendo oxitetraciclina, penicilina, neomicina, estreptomomicina ou clortetraciclina podem permanecer congeladas cerca de 12 semanas, sem perda da atividade antibiótica.

Os autores têm referido a presença de atividade antibiótica no leite em pó.

Entretanto, não só os antibióticos surgem no leite, em consequência possivelmente de resíduos resultantes do tratamento veterinário do gado leiteiro, como também, embora com muito menor frequência, têm sido encontrados os sulfamídicos¹⁶.

Conforme bem descreveu MARTH¹⁷, no leite foram identificadas substâncias químicas diversas, principalmente compostos de amônio quaternário e derivados complexos de iodo, associados ou não a detergentes, decorrentes da higienização do vasilhame e do equipamento em geral, empregados

na indústria de laticínios, e capazes de agir como substâncias inibidoras do crescimento bacteriano, mesmo quando presentes em 10 ou 30 p.p.m.

Assim é que em 1954, nos Estados Unidos, um estudo estimativo realizado com a finalidade de revelar a incidência de substâncias inibidoras em geral, dos *starter* lácticos, realizados em grandes centros populacionais — Columbia, Dodge, Dane, Manitowoc Counties e Wisconsin — demonstrou a presença daquelas substâncias em 4,3% das amostras testadas, capazes de reduzir significativamente a atividade das culturas de fermentos lácticos selecionados, com repercussão evidente na industrialização dos derivados do leite.

Essas substâncias entretanto, segundo se supôs, deviam ser constituídas principalmente por antibióticos. No Canadá, no verão de 1952, pesquisa idêntica demonstrou que as culturas lácticas *starter* eram inibidas em 7,3%, nas 344 amostras analisadas.

É ponto pacífico a ação indesejável de pequenos traços dessas substâncias inibidoras, quer de origem química, porém principalmente os de origem bioquímica, na industrialização do queijo, manteiga e principalmente dos produtos dietéticos fermentados — coalhada, quefir, iogurte e outros^{18, 19, 20}.

Uma questão importante, da esfera da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, é o fato de a atuação bacteriostática das substâncias inibidoras, notadamente os antibióticos, criar condições adversas à multiplicação da flora banal de contaminação que, permanecendo parcialmente imobilizada, dissimulará a má qualidade de certos produtos, interferindo portanto na capacidade avaliadora das provas de rotina, e no tempo de desenvolvimento da prova da redutase, efetuada com o azul de metileno^{21, 22}.

Além desses aspectos vistos, WECKEL²³, em em 1960, pôs em evidência o problema criado pelos pesticidas largamente usados nos Estados Unidos pela moderna agricultura e sem os quais a produção de certas colheitas cairia periodicamente ao índice zero.

Os pesticidas são utilizados sob várias formas: nematocidas, herbicidas, fungici-

das, inseticidas, além dos tratamentos especiais, como os reguladores do crescimento, dessecantes e outros mais.

Tendo em vista a multiplicação do número de fazendas com larga extensão territorial cultivável ou de pastagens, o moderno uso do pesticida, conforme assinalou Weckel, tornou-se mais do que uma necessidade imprescindível, um verdadeiro seguro contra possíveis riscos na proteção dos investimentos.

As vantagens econômicas do seu emprêgo são tão grandes que nos Estados Unidos, já em 1958, as determinações do *Food Drug and Cosmetic Act*, que dispunham sôbre o registro, dados de revisão técnica etc., estabeleciam tolerância para sua presença nos suplementos alimentares.

A intensificação da produção do leite nas fazendas e granjas leiteiras levou à necessidade da aquisição de grãos e suplementos forrageiros cultivados por outrem, que não um criador de gado, o qual muitas vezes sem saber o destino que tais produtos iriam ter — como o de alimentação de um rebanho produtor de leite — empregava pesticidas para preservar a sua colheita.

Além do mais, os pesticidas empregados seguidamente, em seus diferentes tipos, permanecem no solo pelo período de vários anos, decompondo-se, muitas vezes, em produtos mais tóxicos do que os anteriores e, no organismo humano, têm ação acumulativa²⁴.

Embora a “filosofia administrativa enuncie que o leite e seus derivados devem estar *analiticamente* livres dos pesticidas e antibióticos”, vem se tornando cadavez mais difícil estabelecer o conceito da absoluta ausência daquelas e outras substâncias oriundas das mais diversas manipulações, pois as técnicas no seu aperfeiçoamento constante tornam-se mais sensíveis, facultando a pesquisa de níveis de resíduos cada vez mais baixos, dados até então como ausentes.

Há evidência de que o nível livre zero não pode ser aplicado nos últimos tempos na pesquisa da presença de inibidores veiculados pelo leite, devido ao emprêgo abusivo e indiscriminado dos antibióticos e quimioterápicos em terapêutica humana²⁵, nem à própria mãe que amamenta.

Entretanto, conforme concluiu o autor, a extensão dos efeitos resultantes do emprêgo dessas substâncias químicas em agricultura, quando presentes nos produtos de laticínios, ainda não está bem investigada.

Nos Estados Unidos, em 1955, *The Food and Drugs Administration*, como definição do seu ponto de vista, considerou o leite contaminado com antibiótico, como adulterado, levando em conta o risco do seu consumo por pessoas sensibilizadas e da possibilidade de dar origem a raças de germes patogênicos resistentes a tais drogas.

Entretanto, em que pese o vulto dos trabalhos de pesquisa efetuados, há quase duas décadas, e do número de publicações existentes na literatura mundial, no Brasil ainda não se cuidou de avaliar direta ou indiretamente (pesquisa de substâncias inibidoras) a percentagem e grau da contaminação antibiótica do leite dado ao consumo humano.

O regulamento federal brasileiro, da Inspeção Industrial e Sanitaria de Produtos de Origem Animal²⁵, aprovado em 1952 e parcialmente modificado²⁶ em 1962, não obstante recomendar como único critério para a avaliação da contaminação microbiana do leite cru, tipo C, a prova da reductase pelo azul de metileno, não cuidou também de exigir fundamentalmente a pesquisa da presença das substâncias inibidoras e da penicilina, que afetam os resultados obtidos para aquela prova.

Tendo em vista a importância do assunto, quando recentemente, ainda há alguns meses passados, em congresso de Alimentação Pública realizado em Paris²⁷, se adotou a decisão de que devem os alimentos levar etiquetas garantindo a sua qualidade e ausência de antibióticos, e a oportuna reformulação do nosso Regulamento de Inspeção, que se está processando, tomamos a iniciativa de realizar na Capital de São Paulo a presente pesquisa, com a finalidade de situar o grau da contaminação química e bioquímica de cerca de um milhão de litros de leite diariamente consumidos pela população paulistana.

MÉTODOS

Multiplos são os métodos descritos pelos diversos autores, visando determinar a presença das substâncias inibidoras, com as

suas virtudes analíticas postas em ênfase, numa demonstração cabal de que o método ideal ainda está por surgir.

Todos êles se baseiam nas modificações do crescimento bacteriano e se distribuem em três principais grupos que se fundamentam em:

- a) Redução de corantes
- b) Produção de ácido
- c) Emprêgo do disco e da placa agar-agar-germe de prova.

Tendo em vista a necessidade de empregarmos métodos os mais rápidos possíveis, capazes de serem reproduzidos mesmo em pequenos laboratórios de controle higiênico do leite, das usinas de beneficiamento do interior, aproximando-se, guardado o limite horário da sua execução, aos chamados métodos de plataforma, lançamos mão do emprêgo de três principais processos, complementados por outras provas subsidiárias:

Dois destes processos, recomendados pelo *Standard Methods*²⁸, 1960, são baseados o primeiro no emprêgo do complexo disco, placa e germe de prova e o segundo no da redução do C. T. T., por nós utilizados, com algumas modificações.

O terceiro processo, tendo como fundamento a produção do ácido láctico por germes de prova, fermentadores da lactose, foi por nós especialmente adaptado às circunstâncias, na necessidade da obtenção de um resultado rápido. Embora sendo por si mesmo um teste informativo individualizado de grande valia, funciona, no conjunto, frisantemente como prova e também contra prova do teste da redução do C. T. T.

No leite, os inibidores em potencial do crescimento bacteriano são representados pelos seguintes tipos²⁸:

- a) Resíduos de substâncias químicas utilizadas na higienização do equipamento empregado na linha de beneficiamento do leite.
- b) Resíduos de sulfas empregadas com finalidade terapêutica.
- c) Resíduos de antibióticos utilizados com finalidade terapêutica.
- d) Bacteriófagos.
- e) Outras substâncias não identificadas, algumas naturais e peculiares a determinadas vacas.

Portanto, como cuidado obrigatório de ordem geral, tendo em vista a possibilidade da presença, no leite, de bacteriófagos ou de inibidores naturais e, levando em consideração a termo-resistência das demais substâncias inibidoras, todo e qualquer método de pesquisa de inibidores deve ser precedido do aquecimento, em laboratório, do leite cru ou pasteurizado a 80° C, durante 5 minutos.

Êsse aquecimento, destruindo as substâncias inibidoras naturais, impedirá a produção de falsos resultados positivos.

Outro cuidado necessário é o de se providenciar, em todo o material de laboratório, em especial a vidraria, a remoção de vestígios de detergente ou de mistura sulfocrômica etc., enfim, os ingredientes higienizadores empregados na rotina.

Os processos postos em execução são de caráter rápido, fornecendo respostas positivas dentro de 2h30m a 3h30m, sendo também capazes, pelo uso da enzima específica — a penicilinase — principalmente quando do emprêgo do disco e da placa, de identificar qualitativa e quantitativamente a presença da penicilina.

Provas subsidiárias — Quando em uma amostra positiva não se consegue identificar a penicilina, correndo, pois, a ação inibitória por conta de substâncias diversas, antibióticas ou não, devemos pesquisar sistematicamente a presença de traços de sulfamídicos, dos resíduos de substâncias químicas utilizadas na higienização do vasilhame ou de possíveis conservantes, adicionados fraudulentamente ao leite.

A sulfa é pesquisada pelo processo de Bratton e Marchall^{28, 29} empregado para a investigação dessa substância no sangue e na urina — diazotização; os compostos de amônio quaternário, pelo método de MILLER e Elliker^{28, 29}, e os diversos conservantes, entre os quais citaremos como principais o peróxido de hidrogênio e o aldeído fórmico, pelos processos de rotina dos laboratórios de exame do leite, baseados nas recomendações do livro *Métodos de Análises Bromatológicas*³¹ do Instituto Adolfo Lutz.

Lançamos mão, também, da prova da placa de agar-*Pseudomonas aeruginosa*, cepa A. Lutz. A *Pseudomonas*, pela sua pequena

resposta aos antibióticos e sulfas, pode ser empregada para diferenciar essas substâncias, quando presentes, dos conservantes ou resíduos de agentes químicos, em geral, que agem bacteriostaticamente sobre o germe.

I — TESTE BASEADO NA REDUÇÃO DO C. T. T.

O cloreto de 2, 3, 5 trifenil-tetrazólio (C.T.T.) atua como acceptor de hidrogênio e de elétrons e, ao se reduzir, torna-se colorido. É um dos poucos compostos orgânicos incolores na forma oxidada e corados na forma reduzida. Essa propriedade é aplicável aos ensaios de redutase do leite, aos estudos de tecidos vivos, dos quais constitui um reagente, e na avaliação da capacidade germinativa das sementes; a solução do C. T. T., incolor, forma um composto vermelho, insolúvel, de trifenilformazona³².

Aquecendo-se as amostras dos leites a examinar, de diferentes procedências, para destruir os inibidores naturais e teoricamente nivelar as floras, e semeando-as com *starter* láctico, as substâncias inibidoras, quando presentes, interferirão diferentemente, de acordo com a sua concentração, no ritmo do desenvolvimento bacteriano, obtendo-se, como resultante, tonalidades cromáticas diversas que do vermelho — ausência completa de inibição — decairão ao carmim, róseo, róseo claro e, no caso de inibição completa, ao branco, a própria cor do leite, ficando pois o C. T. T. na sua leucoforma.

A amostra controle será obtida a partir de vacas sadias, não submetidas a tratamento, ou de leite em pó, desnatado, estéril, selecionado, livre de inibidores.

O leite em pó deve ser dissolvido, 10g em 90 ml de água esterilizada, destilada.

Quando se faz exame seriado de grande número de amostras, servirão igualmente como contra-prova, no momento, aquelas que aproximadamente adquirirem a coloração vermelha.

A escolha do germe de prova recaiu numa associação de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, provenientes do laboratório Moseley, de *starter* lácticos, Indianapolis, Indiana, E. U. A., idealmente 1:1, cultivado em laboratório a 42-46° C até coagulação do leite selecionado, previamente tinalizado.

Embora tal amostra venha a ser um *Iogurte*, não recomendamos o emprego de *starter* comercial, pois já tem sido relacionado na literatura o desenvolvimento, nessa procedência, de cepas daqueles germes antibiótico-resistentes, falseando a interpretação dos resultados.

Além do mais, o *starter* comercial pode veicular bolôres, leveduras, coliformes ou demais germes de contaminação, o que não é desejável na presente prova, podendo entretanto ser usado excepcionalmente.

Neste caso, deve-se ter o cuidado de previamente determinar a sua acidês, indicada de uma boa atividade, nunca inferior a 80°D e de se estudar microscópicamente a flora, com densidade bacilo-estreptococo relativamente equilibrada, devendo ser o produto de fabricação recente, 12-24 horas.

Aliás, independentemente deste fato, de acordo com o tipo ou origem dos germes, mesmo se selecionados, pode haver uma sensibilidade diferente na presença de inibidores, antibióticos ou não.

No momento do emprego, a cultura recente (12 a 24 horas) será dissolvida a 1/2, no leite controle e pipetada na quantidade de 1 ml em 10 ml da amostra a ser examinada.

O C. T. T. dissolvido em água destilada, esterilizada, na proporção de 1:25, será acondicionado em frasco escuro e conservado refrigerado.

Procedimento — 1) Aquecer, em banho-maria, 10 ml da amostra controle e 10 ml das amostras problema, a 80° C, durante 5 minutos. 2) Resfriar até a temperatura ambiente. 3) Acrescentar 1 ml do *inoculum*, homogeneizando-se por inversão, três vezes, as amostras acondicionadas em tubos previamente arrolhados (rôlhas de borracha). 4) Incubar a 42-46° C, em estufa bacteriológica, durante 2 horas. 5) Acrescentar 0,3ml da solução do C. T. T., 1:25, novamente homogeneizando o conjunto, que será reincubado durante 30 minutos. Comparar as colorações com a da amostra controle. Cor vermelha escura ou clara (controle), igual a ausência de inibidores. Cor rósea, rósea clara, presença, em graduações variáveis. Cor branca — cor do leite — presença, em elevado teor, daquelas substâncias. 6) Gotear duas gotas de penicilinase em tubo contendo a amostra problema, que forneceu

coloração rósea ou branca. Homogeneizar, deixar 60 minutos em temperatura ambiente. Acrescentar 1 ml do *inoculum*. Homogeneizar e repetir a conduta anterior. Se no final de 2h30m a coloração da amostra problema se alterou, igualando a do controle, a prova é positiva para a presença da penicilina. Caso contrário, se permaneceu descorada, acusará a participação de substâncias inibidoras, antibióticos ou não, ou uma alta contagem leucocitária²⁸ (Fig. 1 e 2).

Nota: Embora terminada a prova, é proveitoso fazer nova leitura, dentro do período de 60 minutos passados. As amostras tendem a se uniformizar cromaticamente, porém, nas inibições totais ou semi-totais, a cor permanecerá sempre mais clara, rosada.

II — DETERMINAÇÃO DA ACIDÊS (medida em graus Dornic)

Determinamos a acidês pela avaliação indireta da produção do ácido láctico, usando

a solução N/9 de hidróxido de sódio, pelo processo corrente, recomendado por DORNIC²⁸.

Procedimento — 1) Proceder como no método anterior, apenas excluindo o item 5, ou seja, não acrescentar o C. T. T.; após 2h30m, determinar a acidês, empregando a solução e o acidímetro de Dornic, que possui uma bureta especial, sendo os resultados fornecidos em graus Dornic.

2) Comparar o resultado obtido com o da prova do C. T. T., que se processou em igual lapso de tempo. A maior acidês — amostra controle — deverá corresponder à cor mais intensa, fornecendo os tubos rosados ou de cor branca, acidês de mais baixo valor. Este teste é prova e contra-prova do anteriormente visto. Exclue, quando positivo (acidês baixa), a possibilidade da interferência das altas contagens leucocitárias, ao contrário do que acontece no método de C. T. T.

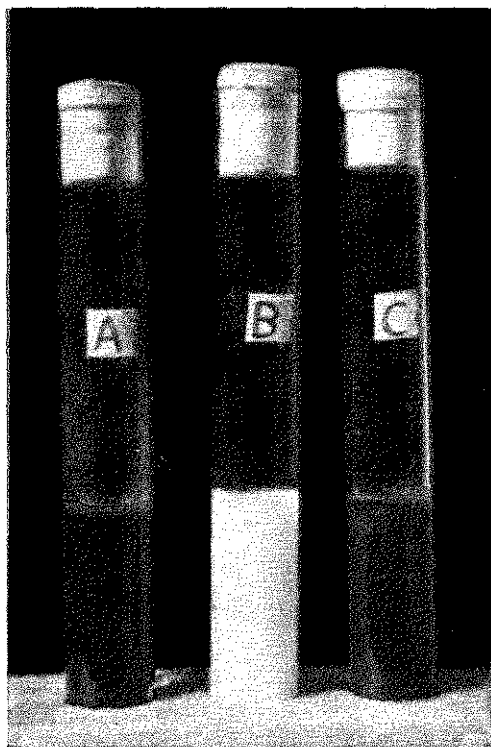


Fig. 1 — Tubos contendo: A) Leite padrão — cor vermelha; B) Leite com penicilina — cor branca; C) Leite com penicilina mais penicilinase — cor também vermelha.

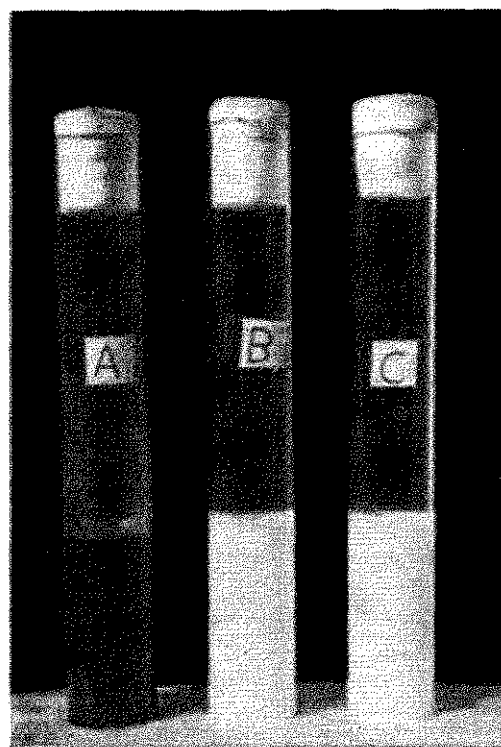


Fig. 2 — A penicilinase adicionada ao tubo C não alterou a cor, que permaneceu branca, índice da presença de inibidores diferentes da penicilina.

A prova pode também ser avaliada visualmente, pois, numa resposta negativa, o leite permanece coagulado, enquanto que a permanência no estado líquido é a tradução de um sub-desenvolvimento da flora, com sub-atividade bacteriana e conseqüente pequena produção ácida. 3) Repetir a etapa do item 7, como descrita para a prova do C. C. T., para as amostras que acusaram baixo nível de produção ácida ou permanecerem líquidas. Se, no final da prova, a acidês dessas amostras problema se elevou, aproximando-se da do controle, o teste é positivo para a presença da penicilina.

III — MÉTODO DO DISCO E DA PLACA

Este processo exige um maior cuidado técnico, especialmente na preparação e estandarização da suspensão dos esporos do *Bacillus subtilis*, o germe de prova utilizado e na preparação das diversas diluições da penicilina padrão, contra-prova positiva do método.

Se a suspensão dos esporos do *B. subtilis* não foi submetida a uma adequada e prévia estandarização, de acôrdo com a sua concentração, poderá interferir na sensibilidade da prova, negatizando possíveis halos de inibição originados por pequenas potências de substâncias inibidoras ou diminuindo as suas amplitudes.

Este método, com referência à penicilina, é de precisão qualitativa e quantitativa, detetando no lapso de 2h30m a 3h30m, até 0,05 unidades por mililitro de leite.

Para os demais antibióticos, conforme verificaremos logo mais, a sua sensibilidade é diversa de acôrdo com o tipo empregado.

Com a utilização desta prova, os possíveis resultados se distribuirão nas seguintes categorias: a) Resultados negativos — nenhuma zona de inibição. b) Penicilina positiva — zona de inibição sem a penicilinase, mas nenhuma zona, após o tratamento penicilínástico. c) Atividades antibacterianas diversas, que não a penicilina — zona de inibição com e sem penicilinase²⁸.

A prova da penicilinase é empregada para a penicilina comum, pois a sintética, de uso muito limitado, não sofre a ação daquela enzima.

I. Material

Placas de Petri — As placas deverão ter a dimensão de 10 x 100 mm ou 20 x 100 mm, selecionando-se cuidadosamente as que apresentarem o fundo plano.

Disco de papel de filtro — Os discos devem ser de bôa procedência, com elevado índice de absorção, tais como o Bacto 1.564, B. B. L. 08-631 ou Schleicher-Schuell e Whatman, absorvendo 0,1 ml do leite e que foram por nós empregados.

Embora existam discos impregnados com penicilina, em diversas potências e impregnados com a penicilinase, devido a sua variação comercial, o que não garante um resultado seguro, demos preferência à impregnação dos mesmos no momento da prova.

Penicilina padrão — Dilui-se a penicilina em água destilada ou em solução estéril tamponada, fosfatada, pH 6,0, fazendo-se uma suspensão estoque, contendo 100 unidades por mililitro e conservada refrigerada durante dois dias.

Na ocasião da prova, dilui-se a mesma até 1; 0,50; 0,10 e 0,05 unidades por ml, embebendo-se os discos.

A potência 0,05 unidades vem a ser a concentração mínima inibitória.

Penicilinase concentrada — Emprega-se a penicilinase B. B. L. 02-629, Difco B 354 ou Laborcilinase Laborterapica, 500 000 unidades/ml, que foi por nós utilizada. A penicilinase deve ser conservada refrigerada, por ser termo-lábil.

Agar "seed" — É o meio de cultura usado nas placas, para a realização da prova — *Penicillin assay seed agar*, e com a seguinte composição: Peptona, 6,0 g; caseína (digestão pancreática), 4,0 g; extrato de levedura, 3,0 g; extrato de carne, 1,5 g; glicose, 1,0 g; agar, 15,0 g e água destilada, q. s. para 1 litro. Distribuir, esterilizar a 121° C, 15 minutos. O pH final deverá ser de 6,6.

Agar base — É o meio de cultura empregado na obtenção da cultura do *Bacillus subtilis* para a preparação da suspensão de esporos: Peptona, 6,0 g; extrato de levedura, 3,0 g; extrato de carne, 1,5 g; Agar, 15,0 g; água destilada q. s. para 1 litro. Distribuir e esterilizar. O pH final deverá ser de 7,0.

Suspensão de esporos — Podemos lançar mão de suspensões de esporos do *B. subtilis*, da *Bacto*, 0453 — ampôlas de 1 ml, B. B. L. 04-628, ou prepará-la em laboratório.

2. Método

Para o preparo e standardização da suspensão de esporos, devemos adotar a seguinte conduta. Suspender, em 5 ml de solução salina, a cultura recente (24 a 48 horas) de *Bacillus subtilis* A. T. C. C. 6.633, repicada em estria, em tubo contendo agar *seed* inclinado, cultivado a 37°C.

Distribuir essa suspensão na superfície de 300 ml de agar-base (meio de cultura mais pobre), acondicionado em garrafa de Roux e incubar durante 5 a 10 dias a 37° C.

Após, verificar microscópicamente, com coloração especial, se cerca de 70% do germe passou à forma esporulada; caso contrário, retornar à estufa, por mais alguns dias, até que aquêlê índice seja atingido.

Suspender a cultura obtida em 20 ml da solução salina fisiológica, atraindo a superfície do meio de cultura com o rolar de pequenas esferas de vidro, até obter uma hã turvação do líquido.

Concentrar os esporos por centrifugação a 4 000 r.p.m., ressuspender o sedimento e determinar espectrofotometricamente a sua turbidês, até atingir a transmissão de 90% com o comprimento de onda de 650 m μ .

Submetemos essa suspensão, já standardizada, a um aquecimento a 70°C, durante 15 a 30 minutos, para eliminar as formas vegetativas ainda existentes, estocando-a a seguir no refrigerador para uso até 2-3 meses da sua preparação.

Na falta do espectrofotômetro ou de um colorímetro fotoelétrico, poderá a suspensão de esporos ser standardizada através de tentativas sucessivas, até que a turbidês estabelecida forneça o maior e mais visível halo de inibição.

Para o preparo do agar-germe, acrescenta-se 1 ml da suspensão de esporos em 100 ml de agar *seed*, resfriado a 55-60°C, homogeneizando-se a seguir a mistura, e vertendo 5 ml do agar e placas de PETRI³³.

As placas contendo o agar-germe deverão ficar acondicionadas no refrigerador não menos de 3 nem mais de 5 dias^{28, 34}.

No momento da prova, remove-se a placa do refrigerador, devendo ser a mesma utilizada após período de 15 minutos. Com uma pinça, toma-se um disco e toca-se a superfície da amostra de leite, já perfeitamente homogeneizada, de modo a evitar a formação de conglomerados de substâncias gordurosas.

A absorção é da ordem de 0,1 ml. Agita-se levemente o disco, para espargir o excesso do leite, depositando-o suavemente na superfície do agar. Para cada amostra devemos usar um mínimo de dois discos e um máximo de oito discos por placa, ou seja, quatro amostras testadas.

A placa para a distribuição dos discos é dividida em quatro partes iguais, devendo os mesmos ser colocados simetricamente, evitando-se assim, no caso de positividade do resultado, coalescência dos halos de inibição formados (Fig. 3).

A placa assim preparada é levada à estufa a 37°C e posta a incubar durante 2h30m a 3h30m.

Ao fim dêsse período, em caso de positividade, pelo crescimento rápido do germe, um halo de inibição muito tenue, é detetado, sendo necessário, para tanto, examinar cuidadosamente a superfície do meio de cultura, colocando-se a placa contra um foco de luz distante e inclinando-se em diversos ângulos. O retorno da placa à estufa cultora, fornecerá, horas após, uma perfeita e nítida imagem do que conseguimos vislumbrar com o pouco contraste existente.

No caso do aparecimento do resultado positivo, para sabermos se é ou não a penicilina a substância inibidora presente, devemos acrescentar a 10 ml da amostra problema duas gôtas de penicilinase, homogeneizar, deixando-se, se houver tempo suficiente, 60 minutos em repouso, em temperatura ambiente, para garantir a ação enzimática.

Preparar novamente a placa, colocando na superfície da mesma quatro discos, dois embebidos na amostra com penicilinase e dois na amostra, porém sem aquela enzima.

Tornar a incubar. Uma zona de inibição ao redor dos discos não tratados, mas inibição alguma em torno do disco com penicilinase, representará um teste positivo para a penicilina (fig. 4). Zona de inibição com e sem a penicilinase, atividades antibacterianas diversas (fig. 5).

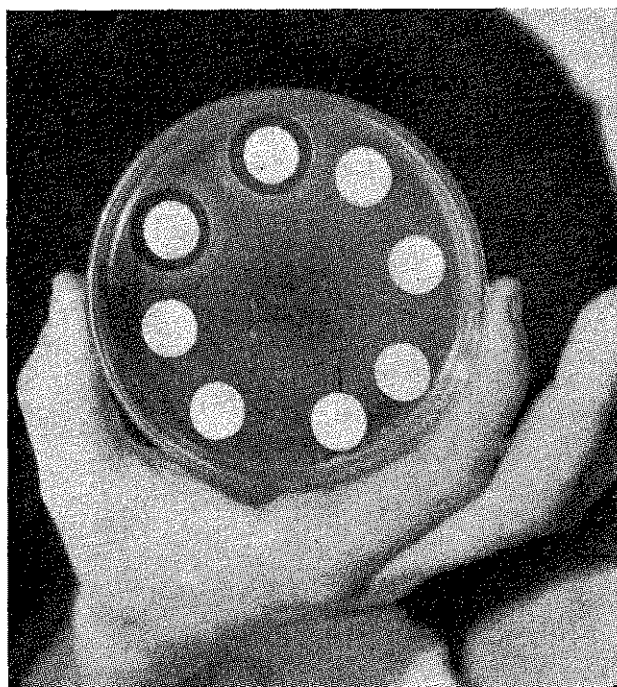


Fig. 3 — Placa dividida, para efeito de prova, em quatro quadrantes contendo quatro amostras-problema, com dois discos para cada uma. O quadrante superior esquerdo mostra a presença de substâncias inibidoras.

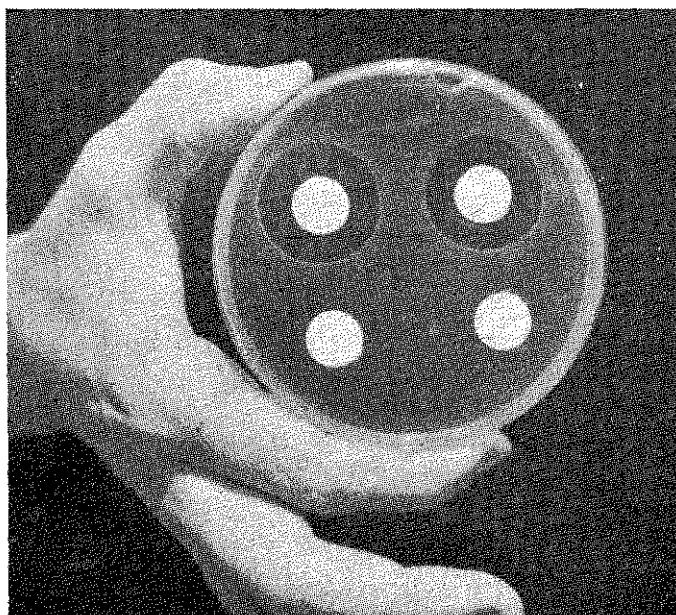


Fig. 4 — Penicilina positiva mostrando a zona de inibição, circundando os discos superiores. Ausência de halos junto aos discos inferiores embebidos com penicilinas.

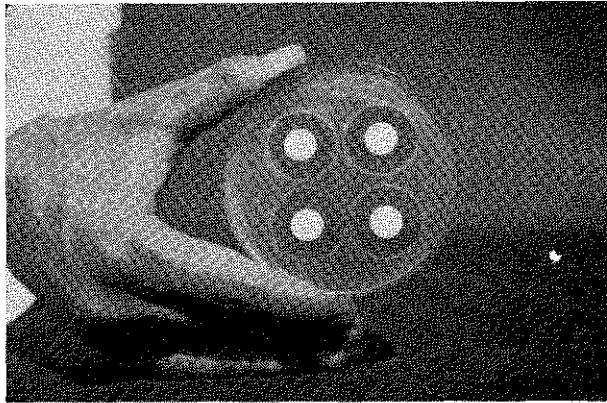


Fig. 5 — Atividades antibacterianas diversas, que não a penicilina. Zona de inibição com e sem a penicilínase.

Estabelecida qualitativamente a identificação do inibidor, para a determinação quantitativa da sua potência devemos comparar a dimensão do halo existente, medida pelo seu diâmetro, com as dimensões de outros halos de inibição resultantes da colocação na placa de discos embebidos em diferentes potências da penicilina: 1,0; 0,50; 0,10 e 0,05 unidades/ml (fig. 6).

O limite de sensibilidade desta prova rápida é de 0,05 unidades de penicilina por mililitro de leite.

IV — PROVAS SUBSIDIÁRIAS

1. Pesquisa de sulfamídicos livres no leite

Este método é capaz de detectar, no leite, até 0,005% de sulfamídicos.

A presença de sulfa pode ser pesquisada pela modificação do método de Bratton e Marshall, empregado para a investigação dessa substância no sangue e urina.

O ácido tricloroacético precipita as proteínas, o ácido nitroso produzido como resultante da adição de nitrito de sódio reage com a sulfanilamida livre — diazotação — ou outros compostos que libertem sulfanilamida.

O excesso de ácido nitroso não diazotado é eliminado pelo sulfamato e o ácido nitroso diazotado copula com o N-(1-naftil-etileno-diamina), dando um composto estável de cor vermelha viva.

Material e Procedimento

A 1 ml de leite cru ou pasteurizado, adicionar 10 ml de ácido tricloroacético a 1,5%, recentemente preparado. O precipitado formado deve ser filtrado com papel de filtro

Whatman n.º 42; 1 ml da solução filtrada, límpida, é colocado em tubo de ensaio limpo, adicionando-se-lhe 1 ml de solução de nitrito de sódio 0,01%, deixando-se a solução em repouso durante 2 minutos. Finalmente adicionar 1 ml de solução de N-(1-naftil-etileno-diamina) a 0,5%.

O aparecimento de cor vermelha, quase que imediatamente, é indício da presença de sulfanilamida no leite examinado^{33, 34}.

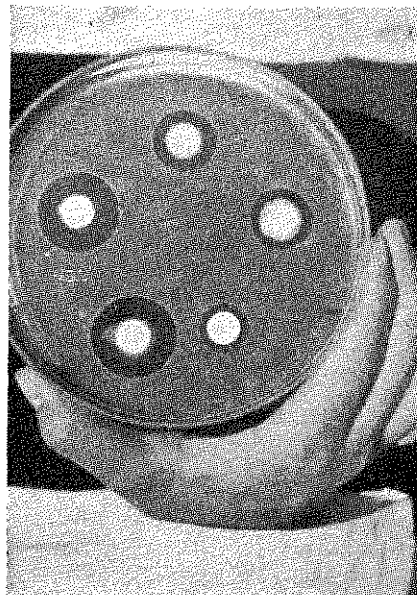


Fig. 6 — Determinação quantitativa da penicilina, pelo adição do antibiótico, em potências diversas, ao leite padrão. Os dois halos menores, coincidentes, de iguais dimensões — 2 mm — são respectivamente os do leite-problema e do leite padrão acrescentado a penicilina (0,5 U.I./ml).

2. Pesquisa de compostos de amônio quaternário no leite

Método de Miller e Elliker. Este método detecta a presença do amônio quaternário no leite, até a diluição de 5 p. p. m.

Material e Procedimento

Indicador — Dissolva 0,1 g de eosina — na forma de tintura — aproximadamente 90% pura, em 200 ml de acetona, conservando em frasco âmbar, como solução estoque.

Adicione 10 ml desta solução a 90 ml de tetracloroetano técnico e junte 1 g de ácido cítrico puro cristalizado para eliminar a cor vermelha que aparece. Agite a solução e depois filtre.

Solução tampão — Dissolva 25 g de ácido cítrico puro, cristalizado (ácido cítrico com uma molécula de água de cristalização), em 100 ml de água destilada; adicione então solução de hidróxido de sódio a 50% até que o pH se ajuste a 3,5, sendo geralmente necessários 12 ml.

Coloque 1 ml da amostra problema em tubo de ensaio e adicione 5 ml de água destilada, 1 ml da solução de indicador e 0,2 ml da solução tampão. Agite vigorosamente durante 10 segundos; centrifugue a seguir durante 5 minutos a 3 200 r.p.m. Três camadas poderão aparecer, a camada superior da solução menos densa, a camada central formada pelas proteínas precipitadas e a camada inferior que, no caso da presença no leite do composto de amônio quaternário, adquire a cor vermelha.

RESULTADOS

Tendo ficado estabelecidos os métodos de exame, antes de iniciarmos propriamente a pesquisa das substâncias inibidoras, em especial, a penicilina, no leite tipo C do consumo em São Paulo, para efeito de apreciação da funcionabilidade individual e do conjunto, dos métodos assinalados, dividimos o nosso trabalho em três etapas distintas, complementadas de uma quarta etapa especial:

1. Pesquisa, *in vitro*, pelo adicionamento, ao leite, padrão, de quatro antibióticos de maior emprego em terapêutica veterinária, em concentrações decrescentes, até o limiar de suas percepções.

2. Determinação, *in vivo*, no leite de animais estabulados, de penicilina e tetraciclina, por nós especialmente injetadas e difundidas, por via intra-mamária, na forma de suspensão.

3. Pesquisa de substâncias inibidoras, em especial a penicilina, no leite tipo C consumido na Capital de São Paulo.

4. Verificação em laboratório, pelo adicionamento de antibióticos ao leite, da interferência da presença dessas substâncias, nos resultados dos exames bromatológicos rotineiros — bioquímicos, químicos e bacteriológicos — e as conseqüentes falhas na apreciação da real qualidade do leite.

1. Pesquisa "*in vitro*", no leite padrão, da presença de quatro antibióticos de maior emprego em terapêutica veterinária em concentrações decrescentes, até o limiar de suas percepções.

A partir de antibióticos padrões, em pó, adicionados das substâncias tampão apropriadas, segundo o método proposto por XIMENES²⁶, ou de solução tamponada, com pH adequado a cada antibiótico, fomos procedendo à diluição dos mesmos, no leite padrão previamente aquecido a 30° C, até determinarmos a potência mínima perceptível pelos três métodos descritos de início.

Esquemáticamente, os resultados obtidos estão, representados no quadro I.

As potências de 0,05 unidades/ml para a penicilina, de 0,50 mcg/ml para a tetraciclina e o cloranfenicol e de 5 unidades para a estreptomicina representam o mínimo inibidor para estas provas de caráter rápido.

Se dermos às tonalidades obtidas pela utilização da prova do C. T. T. correspondência numérica de 0 a 4 — zero para a cor branca, índice de completa inibição, 1 e 2 respectivamente para a cor rósea clara e rósea e 3 a 4 para a cor carmim ou vermelha — ausência de inibição — poderemos, pelo quadro II, situar aqueles mínimos inibitórios constantes do quadro I e, pela fig. 7, ter uma noção visual do fenômeno:

QUADRO I

Antibióticos adicionados ao leite	U.I. ou mcg/ml					
	5	1	0,5	0,1	0,05	0,025
Penicilina	5	1	0,5	0,1	0,05	0,025
Tetraciclina	10	5	2,5	1	0,50	0,25
Cloranfenicol	10	5	2,5	1	0,50	0,25
Estreptomicina	50	30	20	10	5	3

Os valores em grifo correspondem às concentrações inibidoras mínimas.

QUADRO II

Leite amostras	Tonalidades C. T. T.	Acidez °D	Coagulação	B-subtilis inibição
A	4	80	coagulado	—
B	0	28	líquido	+
C	1	35	líquido	+
D	2	50	líquido	+
E	3	70	coagulado	—
F	4	75	coagulado	—

+ positivo.
— negativo

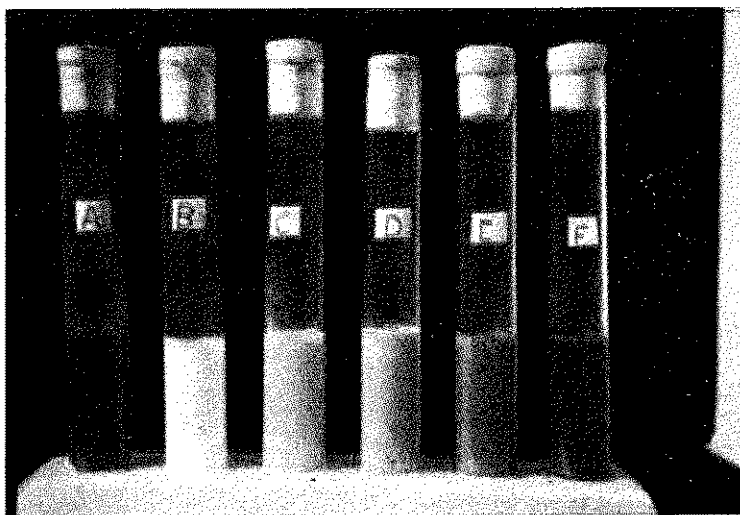


Fig. 7 — Tonalidades cromáticas na prova do C.T.T.: A) Coloração vermelha (tonalidade 4) — leite controle com ausência completa de inibidor; B) Cór branca (tonalidade zero) — inibição completa; C e D) Róseo-clara e rósea (tonalidade 1 e 2) — inibição média; E e F) Carmim e vermelha (tonalidades 3 e 4) — ausência completa de inibição.

Conforme pudemos verificar, as potências mínimas inibitórias — 0,05 unidades para a penicilina, 0,50 mcg para a tetraciclina e o cloranfenicol e 5 unidades para a estreptomomicina — limite de detetibilidade dos métodos, em geral, se situam no índice 2 do

C. T. T., com acidez de teor ainda sensivelmente baixo, tendo em vista a acidez da amostra controle e igualmente com produção do halo de inibição, permanecendo o leite no seu estado líquido, não coagulado. As concentrações maiores daquêles anti-

bióticos forneceram valores de acidês cada vez mais baixos e C. T. T., 1 ou 0.

Em contrapartida, amostras de leite, veiculando potências menores do que os mínimos verificados, sub-concentrações inibitórias, portanto, atingiram o índice 3-4 do C. T. T., e uma acidês bastante elevada, com coagulação positiva e absoluta negatividade para a presença do halo de inibição, comportando-se pois como o leite padrão e passando despercebidas, indetectadas, pelo crivo destes processos.

Uma visualização do que foi explicado poderá ser melhor apreciado pela observação dos quadros III e IV, referentes à penicilina e tetraciclina dissolvidas experimentalmente no leite padrão.

Embora tenha ficado comprovada a boa funcionabilidade da prova, individualmente e no seu conjunto, durante a realização das pesquisas das substâncias inibidoras, em amostras do leite tipo C do comércio, alguns resultados discordantes foram surgindo.

A presença de inibidor era acusada pelo C. T. T., em gradação 1 ou 2, com baixa produção de ácido e incoaguabilidade, sem que halo de inibição se formasse. Entretanto, conforme verificado, os três métodos tinham acuidade muito parecida.

Porém, pareceu-nos que o conjunto C. T. T., e acidimetria, funcionando em consequência da presença do *S. thermophilus*, é mais sensível à presença da penicilina, podendo mesmo denunciá-la, na potência de 0,01 unidades/ml do leite. Em contrapartida, o processo da placa — *B. subtilis* — é capaz de denunciar a estreptomocina em níveis de até 2-3 unidades/ml.

Suspeitamos então de um outro mecanismo até então não verificado ou melhor, não pesquisado, da presença naqueles leites de associação de antibióticos ou outros inibidores, em sub-concentrações inibitórias, capazes, porém, nessa forma, de se tornarem

QUADRO III

nada ao leite Penicilina adicio- padrão U.I./ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
5	0	23	líquido	+
1	0	23	líquido	+
0,50	0	26	líquido	+
0,10	1	38	líquido	+
0,05	2	45	líquido	+
0,025	4	68	coagulado	—
CONTRA-PROVA				
Leite padrão	4	80	coagulado	—

QUADRO IV

Tetraciclina adicionada ao leite padrão mcg/ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
5	0	25	líquido	+
2,5	0	24	líquido	+
1	0	28	líquido	+
0,5	1	40	líquido	+
0,25	4	61	coagulado	—
CONTRA-PROVA				
Leite padrão	4	80	coagulado	—

QUADRO V

Penicilina adicionada ao leite padrão U.I./ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
0,05	2	45	líquido	+
0,025	4	68	coagulado	—
Penic. 0,025 U. I./ml Tetrac. 0,25 mcg/ml adicion. ao padrão	2	42	líquido	—
CONTRA PROVA Leite padrão	4	80	coagulado	—

QUADRO VI

Tetraciclina adicionada ao leite padrão mcg/ml	C. T. T. Tonalidades	Acidez °D	Coagulação	<i>B-subtilis</i> inibição
0,50	2	40	líquido	+
0,25	4	61	coagulado	—
Tetrac. 0,25 mcg/ml Penic. 0,025 U. I./ml adicion. ao padrão	2	38	líquido	—
CONTRA-PROVA Leite padrão/	4	80	coagulado	—

detectáveis, pelo C. T. T., e acidimetria, porém, não fornecendo halo algum de inibição. Para esclarecer esta última hipótese, associamos, em laboratório, sub-concentrações inibidoras, de diversos antibióticos, obtendo ampla confirmação do fato, conforme demonstrado nos quadros V e VI, com a associação penicilino-tetraciclina.

2. *Determinação "in vivo", no leite de animais estabulados, de penicilina e tetraciclina, por nós especialmente injetadas e difundidas, por via intra-mamária, na forma de suspensão.*

Os antibióticos escolhidos foram a penicilina benzatina, injetável, e a tetraciclina injetável e em forma de suspensão, para uso intra-mamário. A penicilina benzatina, devido a sua eliminação lenta, em média de 3 a 5 dias. A tetraciclina, pela sua mais rápida eliminação e o mesmo antibiótico, na forma de preparados anti-mastite, por se eliminar em doses mais elevadas, até um período de 72 horas, facultando pois bôa obser-

vação do fenômeno e servindo como contra-prova positiva para a funcionalidade dos testes propostos.

As experimentações foram efetuadas na Estação Experimental da Água Funda do Departamento de Produção Animal, com vacas da raça Jersey, pesando 300 e 370 quilos e respectivamente com 3 e 5 anos de idade e produção média leiteira de 6,4 e 8,2 litros.

A dose terapêutica da penicilina I. M. é de 10 000 a 20 000 U.I./kg de peso vivo e da tetraciclina I.M., 600 mg a 1 g, e foram ministradas, respectivamente, em doses únicas. A suspensão, para uso intra-mamário, na proporção de 200 mg por quarto mamário.

As amostras de leite foram colhidas cada 24 horas e examinadas até completo desaparecimento dos antibióticos, dentro das possibilidades dos métodos.

O próprio animal a ser tratado serviu previamente de contra-prova, tendo sido as amostras colhidas no mesmo ritmo horário e igualmente examinadas para a presença de

QUADRO VII

Vaca n.º	Penicilina benzatina U. I./kg *	Teor de Penicilina benzatina, U. I./ml, no leite, no período de zero a 120 horas de ordenha					
		H o r a s					
		0	24	48	72	96	120
155	—	0	0	0	0	0	0
	20 000	0	0,1	0,08	0,06	0,05	0

* Injeção única de 6 200 000 U. I.

QUADRO VIII

Tradução dos valores do quadro VII nos índices de prova C. T. T., Acidez e Placa mais *B. subtilis*

Ordenha Horas	C. T. T. Tonalidades	Acidez ºD	Coagulação	<i>B. subtilis</i> inibição
0	4	63	coagulado	—
24	1	46	líquido	+
48	1	43	líquido	+
72	2	50	líquido	+
96	1	50	líquido	+
120	3	55	coagulado	—

QUADRO IX

Vaca n.º	Tetraciclina mcg/Kg*	Teor de tetraciclina — mcg/kg — no leite, no período de zero a 96 horas da ordenha			
		H o r a s			
		0	24	48	96
133	0	0	0	0	0
	2.700	0	0,7	0,5	0

* Injeção única de 1 g de tetraciclina.

QUADRO X

Tradução dos valores do quadro IX, nos índices das três provas

Ordenha Horas	C. T. T. Tonalidades	Acidez ºD	Coagulação	<i>B. subtilis</i> inibição
0	4	78	coagulado	—
24	1	32	líquido	+
48	2	36	líquido	+
72	4	61	coagulado	—

QUADRO XI

Vaca	Tetraciclina mcg/quarto mamário *	Teor de tetraciclina — mcg/ml — no leite no período de 0 a 96 horas de ordenha				
		H o r a s				
		0	24	48	72	90
133	0	0	0	0	0	0
	200	0	10	1	0	0

* Difundida por via intramamária.

QUADRO XII

Tradução dos valores do quadro XI, segundo os índices das provas

Ordenha Horas	C. T. T. Tonalidades	Acidez °C	Coagulação	<i>B. subtilis</i>
0	4	60	coagulado	—
24	0	22	líquido	+
48	1	33	líquido	+
72	3-4	55	coagulado	—
96	4	61	coagulado	—

inibidores, após o aquecimento a 80°C durante 5 minutos.

Os quadros seguintes (VII a XII) sintetizam os resultados e fornecem a sua tradução, segundo os índices e normas dos três métodos utilizados:

3. *Pesquisa de substâncias inibidoras, em especial a penicilina, no leite tipo C consumido na Capital de São Paulo.*

Para a realização destes exames, as amostras de leite tipo C foram adquiridas do Comércio e obtidas simultaneamente, em pontos diametralmente opostos, em dias diferentes, de tôdas as marcas industriais existentes à venda — Leco, Paulista, União e Vigor, acondicionadas em gelo e rapidamente transportadas.

No laboratório eram, no mesmo dia, submetidas aos exames de rotina correntes — físico-químicos, bioquímicos, bacteriológicos, tais como: pesquisa de conservadores diversos, principalmente o aldeído fórmico e o peróxido de hidrogênio, presença de redutores da acidez, adredemente colocados, da acidez, prova do alizarol, densidade, criscopia, redutase pelo azul de metileno, peroxidase, fosfatase, contagem global

em placas, colimetria e a prova da resistência em temperatura ambiente — coagulação — além de outras mais.

Simultaneamente era pesquisada especialmente a presença de compostos de amônio quaternário e de sulfamídicos.

Após aquecimento, as amostras eram submetidas às provas de pesquisa de substâncias inibidoras, sendo as que forneceram resultados positivos testadas com a penicilinase.

Examinamos um total de 1 000 amostras, em dias diferentes, que abrangeu um período de cerca de seis meses de constantes verificações, resultando a constatação da presença de substâncias inibidoras em 9% das amostras de leite analisadas.

As sulfas, o amônio quaternário ou demais substâncias químicas não foram encontrados, tendo sido porém em 1,9% das amostras examinadas evidenciada a penicilina em potência que variou de 0,05 a 0,50 unidades por mililitro de leite. Portanto, das 1 000 amostras vistas, 90 mostraram conter substâncias inibidoras, 71 das quais, não identificadas e 19 correspondendo à presença da penicilina na potência de 0,05 a 0,50 unidades/ml, conforme demonstrado no quadro XIII:

QUADRO XIII

Leites penicilino-positivos

Potências U. I./ml	N.º Amostras
0,05	3
0,08	1
0,10	2
0,30	3
0,40	7
0,50	3

Entretanto, durante o período de realização das referidas pesquisas, sucedeu que, para as diversas amostras adquiridas no comércio, de uma mesma marca industrial, num mesmo dia, porém em estabelecimentos comerciais distantes, encontramos uma das amostras contendo penicilina, estando porém as demais negativas, inclusive para a presença dos inibidores em geral.

Tal fato, aparentemente contraditório, torna-se entretanto bastante compreensível quando lembramos do fato de que, no interior de São Paulo ou de outros Estados de onde o leite provém, os entrepostos usina recebem a produção local.

O leite global dessa usina-entrepósito é portanto representado pela convergência do leite de todos os produtores da localidade, onde é o produto filtrado, padronizado, refrigerado e transportado em carros-tanques isotérmicos ou não, com capacidade variável em média de 10 000 litros.

Em São Paulo, nos diversos estabelecimentos de beneficiamento, é o produto bombeado diretamente do carro tanque para os pasteurizadores, pasteurizado e a seguir estocado em tanques isotérmicos, com capacidade também variável, em média 10 000 litros.

No momento do engarrafamento, é esse leite levado à máquina enfrascadora, engarrafado e acondicionado em cestas gradeadas e distribuídas ao consumo.

Terminada a operação, pelo esgotamento do conteúdo do tanque-estoque, passa-se ao seguinte, contendo leite proveniente de outra procedência.

O produto consumido na Capital não é pois o resultante da mistura global da produção da bacia leiteira do nosso interior ou de outros Estados, mas sim das regiões produtoras, parceladamente.

Portanto, não é de se estranhar que amostras colhidas em pontos diversos, embora do mesmo produto comercial, forneçam resultados diferentes.

Tendo em vista o sucedido, resolvemos fazer em uma das usinas de pasteurização de leite da Capital o exame sistemático do leite provindo das diversas zonas de fornecimento, colhendo as amostras de diferentes regiões produtoras, à medida que chegado.

Após exames seguidos, conseguimos destacar uma fonte produtora do interior, cujo leite se apresentou veiculando substâncias inibidoras não identificadas, diferentes da penicilina.

Feita essa verificação, providenciou-se a ida de um grupo técnico a essa região de nossa interlândia onde, no respectivo posto de resfriamento e à medida que chegava, iam sendo colhidas amostras do leite de todos os produtores da localidade.

Examinadas, essas amostras acusaram positividade para a presença de substâncias inibidoras em cerca de 20% do total global.

Estava pois comprovada a nossa previsão.

Não havendo tempo útil para se chegar até as fazendas cuja produção inquinava o total da produção local e desvendarmos *in loco* a etiologia do processo, sabendo quase certo serem agentes terapêuticos os responsáveis pela situação criada, deixamos recomendações saneadoras, entre outras, o afastamento da ordenha leiteira do animal que estivesse sob tratamento veterinário.

Dias após, na Capital, no laboratório, constatamos com satisfação que o leite daquele local se enquadrava na normalidade, não mais veiculando os inibidores.

Partindo do efeito, na Capital, havíamos conseguido chegar até as causas remotas, nas fazendas de produção do interior, obtendo a correção necessária.

Queremos, dentro do preceito da técnica, pôr em ênfase o cuidado especial que se deve ter com a penicilinase, devido à sua termo-sensibilidade e à possibilidade da sua contaminação durante os diversos manuseios, pois tais fatos obrigaram a desprezar o resultado obtido para quase 200 amostras, compelindo-nos a recomençar as pesquisas em andamento.

A *Pseudomona aeruginosa*, como germe de prova, pela sua resistência aos antibióticos e sulfas, no discrimine com os vestígios de substâncias químicas por nós adicionadas ao leite padrão, mostrou-se insatisfató-

ria, por resistir também a ações inibidoras diversas.

Enquanto o *Bacillus subtilis* e a *Sarcina lutea* A. T. C. C., 9341 apresentavam halo de inibição com o aldeído fórmico a 1:40 000, já a *P. aeruginosa* nada mais revelou.

4. *Verificação em laboratório, pelo adicionamento de antibióticos ao leite, da interferência da presença dessas substâncias nos resultados dos exames bromatológicos rotineiros — bioquímico, químicos e bacteriológicos — e as conseqüentes falhas na apreciação, da real qualidade do leite.*

O leite, pelas suas próprias condições de produção, em fonte animal, sujeito a manuseios inevitáveis, sendo substrato de extraordinário potencial nutritivo, é um vasto caudal onde crescem e se reproduzem centenas de milhares de células bacterianas, em ondas sucessivas³⁶

Entretanto, apesar de ser alimento perecível, quando, desde a fonte de produção,

veicula inibidores do crescimento bacteriano, mesmo mantido à temperatura ambiente, não se deteriora por vários dias, demonstrando assim uma resistência invulgar.

Portanto, dois produtos diversos desigualmente contaminados, veiculando, porém, os mais poluídos vestígios de um inibidor, fornecerão, horas após o exame, resultados desiguais, sendo paradoxalmente o pior considerado como o de melhor qualidade, burlando a prova de rotina da determinação da acidez, redutase e o exame bacteriológico.

Para ilustrar o fato, fizemos, em laboratório, uma série de ensaios, acrescentando antibióticos a amostra de leite cru, recém chegada do interior e isenta de inibidores.

O leite era examinado no momento da prova e depois adicionado com penicilina — 1 unidade/ml, e tetraciclina — 1mcg/ml, sendo deixado à temperatura ambiente pelo período de 10 horas e, após, novamente examinado. Os quadros e fotografias que se seguem esquematizam os resultados obtidos, mostrando a notável influência inibitória sobre a flora global do leite (Quadros XIV e XV; Fig. 8 e 9).

QUADRO XIV

Leite cru isento de inibidor (produção recente). Exame de rotina

Contagem microbiana global em placas colônias/ml	Colimetria N. M. P.	Redutasimetria min.	Acidez °D
30 000 000	2 400 +	160	18

QUADRO XV

Leite cru após 10 horas do exame de prova

Leite	Contagem microbiana global em placas colônias/ml	Colimetria N. M. P.	Redutasimetria min.	Acidez °D
Isento de inibidor	200 000 000	2 400 +	20	68
Mais penicilina, 1 U. I./ml	50 000 000	2 400 +	120	43
Mais tetraciclina, 1 mcg/ml	38 000 000	2 400 +	130	21



Fig. 8 — Placa de gelose-padrão semeada com leite cru isento de inibidor (diluição 1:1 000 000).



Fig. 9 — Placa de gelose-padrão semeada com o leite acrescentado com tetraciclina 1 mcg/ml, na diluição de 1:1 000 000.

Os coliformes não evidenciaram modificações significativas (Quadros XIV e XV).

Os resultados para as provas de pesquisa da presença presuntiva de coliformes não sofreram modificações significativas.

Como contra-provã das observações vistas, a partir das amostras do leite cru isento de inibidor e do mesmo contendo a penicilina e a tetraciclina, inoculamos 2% de *starter* de Iogurte, dentro da técnica da produção comercial e cultivamos a seguir a 46-48° C.

Como não podia deixar de acontecer, o Iogurte produzido a partir de leite cru exigiu cerca de 2 h 30 m para uma completa coagulação, fornecendo no final uma acidez de 70° D, enquanto que as demais amostras só chegaram a coagular após 4 a 6 horas de incubação, produzindo mesmo assim uma acidez de muito baixo valor e uma menor concentração da flora, quando examinada ao microscópio (Fig. 10 e 11, página seguinte).

Aliás, o fato relatado constitui a base do processo da pesquisa de substâncias inibidoras descrito, empregando a acidimetria.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Segundo pudemos constatar na maioria dos trabalhos que tivemos a oportunidade de compulsar, principalmente de autores americanos, é o tratamento da mastite pelo emprêgo de suspensões difundidas por via intra-mamária, entre outras causas, o grande responsável pelo aparecimento de substâncias inibidoras no leite de consumo da população ou no produto destinado à industrialização.

Tendo em vista a freqüência com que ocorre a afecção, verdadeiro flagelo do gado leiteiro e na impossibilidade de proibir o uso de medicamentos, como recurso terapêutico realmente valioso, recomenda o *Food and Drug Administration*, nos E. U. A., que no próprio tubo contendo antibiótico para a infusão intra-mamária seja impressa a advertência de que o leite produzido pelo animal assim tratado não deve ser dado ao consumo humano até o prazo mínimo de 72 horas após a última aplicação.

A incorporação de substâncias corantes, não tóxicas, como a clorofila solúvel ou outras diversas, na suspensão para uso intramamário, eliminando-se ao mesmo passo do

que o antibiótico e dando na ordenha uma apreciação visual do fenômeno, tem sido recomendada^{37, 38}.

Os antibióticos empregados na alimentação do gado praticamente não interferem no aparecimento dos vestígios daquelas substâncias, o mesmo acontecendo quando empregados por via intra-uterina.

Os demais antibióticos injetáveis, tetraciclínicos, cloranfenicol, ou associações antibióticas, e mesmo a penicilina G, comum, eliminam-se rapidamente, em 24-48 horas.

A penicilina *retard*, cuja eliminação vai em média de 3 a 5 dias, é susceptível de entreter um nível apreciável da droga no leite ordenhado.

No campo de industrialização dos produtos de leite, o problema principal criado pela presença dos inibidores em geral e dos antibióticos em especial é a completa ausência ou diminuição acentuada da produção ácida nas culturas dos *starter*, inibindo entre outros o crescimento do *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *S. Durans*, *Lactobacillus lactis*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *Leuconostoc citrovorum*, etc., de maneira variável.

Na indústria do queijo, mesmo quando se constata no leite a presença de substâncias inibidoras, é o produto empregado, tendo-se porém o necessário cuidado de aumentar o volume do *inoculum*, prolongar o período de incubação e de produção ácida e aumentar a quantidade do sal adicionado.

No setor dos leites fermentados, como recurso de industrialização, procurou-se empregar "starter" constituída de germes antibiótico-resistentes, porém a produção ácida deixa muito a desejar, repercutindo no organoleptismo do produto.

Como conseqüência de ordem de Saude Pública, da veiculação há longos anos, do antibiótico no leite, principalmente a penicilina, além do aparecimento de estreptococos e estafilococos piogênicos resistentes, devemos pôr em destaque o papel desse resíduo na etiologia de fenômenos alérgicos cutâneos, em pessoas sensibilizadas.

Tendo em vista as 3 pesquisas nacionais nos E. U. A., nas quais ficou demonstrado que diversas amostras de leite do comércio continham quantidades variáveis de penicilina, o *"Food and Drug Administration"*, em 1959, reuniu em conferência um painel

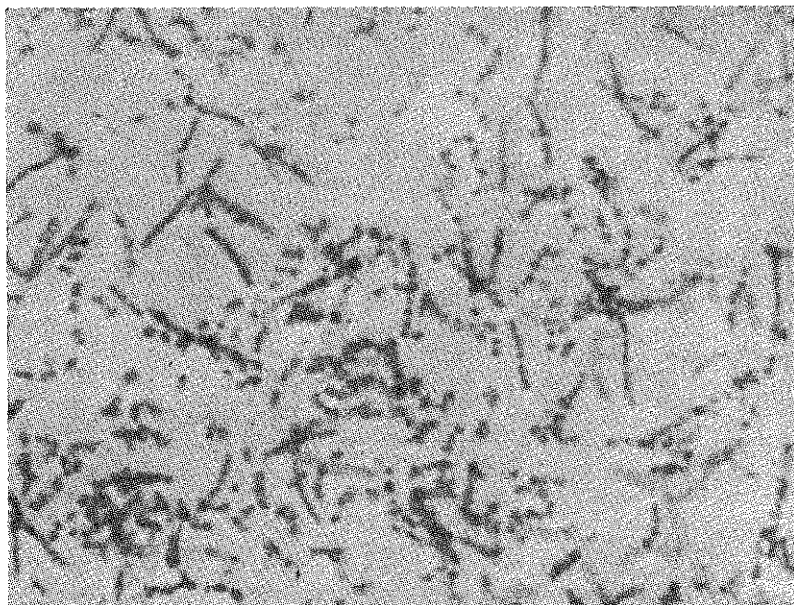


Fig. 10 — Aspecto microscópico da flora de Iogurte produzida a partir do leite padrão. 1 400 x.

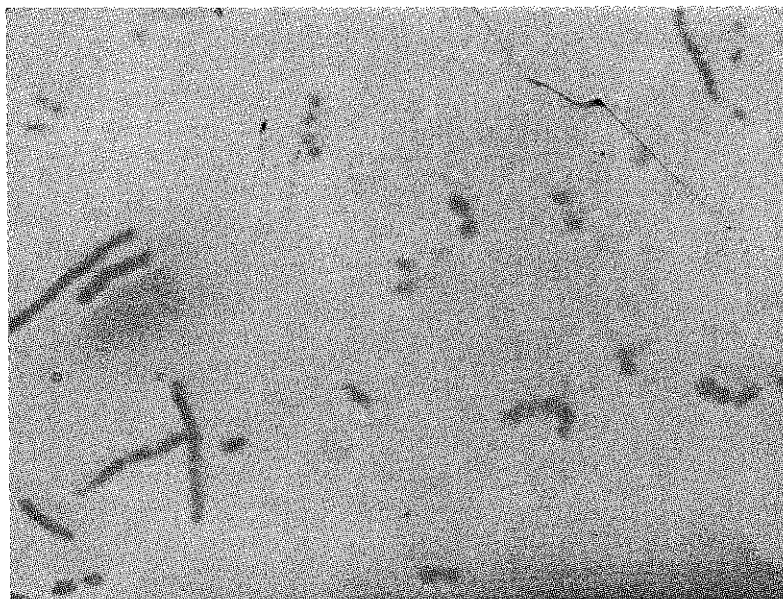


Fig. 11 — Aspecto microscópico da flora de Iogurte produzida a partir do leite mais tetraciclina. 2 240 x.

de autoridades médicas no campo especializado da alergia causada por antibióticos, para avaliar o risco à saúde pública da ingestão de antibióticos veiculados no leite e derivados.

Chegou-se à conclusão geral de que "os antibióticos diversos, tais como a bacitracina, neomicina, polimixina B, tetraciclina, todos utilizados em preparados anti-mastíticos, não constituem um risco à saúde".

Entretanto, concluiu-se também, que "a penicilina, quando presente no leite, mesmo em pequenas parcelas é altamente antigênica e capaz de causar reações alérgicas em pessoas sensibilizadas".

Foi estimado que, nos E. U. A., o número de pessoas alérgicas incluía cerca de 10% (dezesete milhões) da população total e que as reações alérgicas à penicilina variavam de um grau médio até reações de alta intensidade.

Em nossas pesquisas encontramos quantidades de penicilina variáveis de 0,05 a 0,5 unidades/ml, ou seja, respectivamente 5 e 50 unidades/100 ml.

Nos Estados Unidos, entretanto, a maioria dos alergistas consultados afirmaram que, em casos especiais, 2 a 3 unidades de penicilina ingerida produziram uma reação do tipo anafilático, em pessoas com alto grau de sensibilização e que havia suspeitas de que a penicilina veiculada no leite estivesse sendo a causa da urticária recorrente, frequentemente encontrada.

No setor da Inspeção Sanitária, o falsamento induzido pela presença de substâncias inibidoras, através da bacteriostase, na justeza da apreciação dos exames bacteriológicos rotineiros, só permite avaliar a qualidade atual do produto examinado, levando a considerar um leite altamente poluído como de boa qualidade, retirando daquele exame a sua elevada função julgadora.

A nosso ver, a pesquisa de substâncias inibidoras no leite e, principalmente, da penicilina, deve ser tornada obrigatória e realizada, a par dos exames de rotina, no produto em estado de cru, *advindo de cada região de produção*.

Os métodos por nós utilizados têm, justamente por esse motivo, caráter rápido, acompanhando o ritmo de desenvolvimento da redutase, podendo ser utilizada como prova seletiva de plataforma nas indústrias de fabricação de queijo.

O teste de acidimetria pode mesmo ser realizado em regiões de pequenos recursos técnicos, isoladamente.

E, finalmente, uma urgente campanha de esclarecimento deve ser desenvolvida, visando afastar da ordenha o gado leiteiro sob tratamento antibiótico ou sulfamídico, estabelecendo-se rigoroso policiamento a respeito e determinando-se, em todos os laboratórios de controle higiênico do leite, sistemático exame do produto advindo do interior, região por região, visando localizar os focos de produção do leite inquinado e o seu saneamento dentro do prazo mais rápido possível.

RESUMO

Os trabalhos de pesquisa da presença de inibidores bacterianos no leite e derivados vêm, há quase duas décadas, enriquecendo a literatura mundial.

Os inibidores podem decorrer da presença de traços de antibióticos resultantes do tratamento veterinário do gado leiteiro e de vestígios de substâncias químicas usadas na higienização em laticínios.

Nos Estados Unidos, em 1959, o *Food and Drug Administration* considerou um risco à saúde pública, pela sua capacidade de formação de antígenos, a presença de penicilina no leite e derivados, considerando fraudado o produto que veicule antibióticos em geral, tendo sido realizadas naquele país três pesquisas de âmbito nacional, em que foi constatada a presença de antibióticos em potências diversas.

A penicilina é responsabilizada pelo desenvolvimento, em pessoas sensibilizadas, de dermatose em caráter crônico ou recorrente.

Na esfera da inspeção de Alimentação Pública, a presença de inibidores do crescimento e da multiplicação bacteriana poderia falsear o julgamento da qualidade do produto, pois os exames de redutase, contagem bacteriana, pesquisa de acidez etc. forneceriam apenas o estado atual da flora.

Um leite altamente contaminado desde a fonte de produção, porém contendo inibidores, fornecerá um resultado satisfatório ao exame de rotina, feito na Capital. Paradoxalmente, um leite produzido sob condições padrões de higiene, mas sem conter inibidores, submetido ao mesmo exame, será considerado como de pior qualidade.

No setor da industrialização do leite, são altamente nocivos os efeitos da presença de inibidores, devido à baixa produção de ácido pela flora parcialmente imobilizada.

Em que pesem os fatos relatados, no Brasil ainda não se cuidou de pesquisar a presença de substâncias inibidoras em geral, principalmente a penicilina, no leite e seus derivados.

Usando métodos rápidos que fornecem respostas em 2h30m a 3h30m, foi pesquisada no leite, tipo C, de consumo da capital de São Paulo, a presença de inibidores bacterianos, tendo sido constatada a presença dos mesmos em 9% das 1000 amostras examinadas, correspondendo a penicilina a 1,9% do total encontrado, em quantidades variáveis de 0,05 a 0,5 unidades por mililitro de leite.

Agradecimentos — Externamos os nossos profundos agradecimentos à Laborterápica-Bristol S/A e aos técnicos de laboratório da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de S. Paulo, Srs. Antônio José Xavier, Daniel Bastos de Matos e Vanderlei Gonçalves Candia, pela valiosa cooperação fornecida na execução das pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARTH, E. H. & ELLICKSON, B. E. — Antibiotic residues in milk and milk products — A review. *J. Milk Fd. Technol.* 22:241-249, 1959.
- MARTH, E. H. — Antibiotics in milk — A review. Recent developments. *J. Milk Fd. Technol.* 24:36-44, 1961.
- VAID, M. Y. *et alii* — Penicillin levels in milk following parenteral administration of procaine penicillin G. *J. Milk Fd. Technol.* 24:7-10, 1961.
- LASSITER, C. A. — Present status of feeding antibiotics to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 46:346-350, 1963.
- PROUTY, C. C. — Further observations of penicillin levels in milk following intramuscular and intrauterine administration. *J. Milk Fd. Technol.* 24:356-357, 1961.
- SCHIPPER, I. A.; FILIPOVS, D. & EBELTOFT, H. — Penicillactia following intramuscular administration of penicillins. *J. Milk Fd. Technol.* 28:1-4, 1965.
- AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Council on Drugs — Penicillin and on antibiotics in milk: report. *J. Am. Med. Assoc.* 171:135-137, 1959.
- MARTH, E. H. & ELLICKSON, B. E. — Problems created by the presence of antibiotics in milk and milk products — A review. *J. Milk Fd. Technol.* 22:266-272, 1959.
- STOLTZ, E. I. & HANKINSON, D. J. — The effects of antibiotics in milk on the human intestinal coliform bacteria. *J. Milk Fd. Technol.* 17:76-78, 1954.
- ERSKINE, D. — Dermatitis caused by penicillin in milk. *Lancet* 1(1):431-432, 1958.
- VICKERS, H. R.; BAGATUNI, L. & SUZANNE, A. — Dermatitis caused by penicillin in milk. *Lancet* 1(1):351-352, 1958.
- AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Council on Drugs — Penicillin and other antibiotics in milk: report. *J. Am. Med. Assoc.* 171:135-137, 1959.
- ZIMMERMAN, M. C. — Chronic penicillin urticaria from dairy products, proved by penicillinase cures. *Archs. Derm. Syph.* 79:1-6, 1959.
- SHAHANI, K. M. — The effect of heart and storage on the stability of Aureomycin in milk, butter and water. *J. Dairy Sci.* 41:382-391, 1958.
- HANSEN, H. C., WIGGINS, G. E. & BOYD, J. C. — Modern methods of mastitis treatment cause trouble in the manufacturing of fermented dairy products. *J. Milk Fd. Technol.* 13:359, 365, 1950.
- KOSIKOWSKY, F. V.; HENNINGSON, R. W. & SILVERMAN, G. J. — The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quarternary ammonium compounds in the fluid milk supply of New York State. *J. Dairy Sci.* 35:533-539, 1962.
- MARTH, E. H. — Antibiotics in milk — A review. II. Methods for detection of antibiotics in milk. *J. Milk Fd. Technol.* 24:70-82, 1961.
- BERRIDGE, N. J. — Penicillin in milk: III. The effect on low concentration of penicillin on the rate of acid production by starter cultures. *J. Dairy Res.* 23:348-354, 1956.
- WHITEHEAD, H. R. & LANE, D. J. — The influence of penicillin on the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J. Dairy Res.* 23:355-360, 1956.
- RICHARDS, R. J.; KENNEDY, H. E. & GOULD, I. A. — Antibiotics resis-

- tence and acid production among starter cultures belonging to the genus *Streptococcus*. J. Milk Fd. Technol. 24:317-320, 1961.
21. SHIVELER, G. & WEISER, H. — The effect of selected antibiotics upon the survival of microorganisms in raw and pasteurized milks. J. Milk Fd. Technol. 16:125-127, 1953.
 22. STOLZ, E. I. & HANKINSON, D. J. — The effects of antibiotics on the bacterial plate counts of normal raw milk. J. Milk Fd. Technol. 16:157-159, 166, 1953.
 23. WECKEL, K. G. — Aspects of pesticides and antibiotics as they relate to the dairy industry. J. Milk Fd. Technol. 23:277-280, 1960.
 24. RICHARDSON, L. A. & FOTER, M. J. — Pesticides and the food supply. J. Milk Fd. Technol. 29:148-155, 1956.
 25. BRASIL. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal. (Aprovado pelo Decreto 30.691 de março de 1952). Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1952.
 26. BRASIL. Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto n.º 1255 de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1962.
 27. CUIDADOS com a alimentação Pública. Boletim Informativo da Associação Paulista de Medicina, junho, 1966.
 28. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products, 11 ed. New York, A. P. H. A., 1960.
 29. MILK INDUSTRY FOUNDATION — Laboratory manual of analysis of milk and its products. Washington, D. C., Milk Industry Foundation, 1959.
 30. SILVERMAN, G. & KOSIKOWSKY, F. V. — Systematic testing of inhibitory substances in milk. J. Milk Fd. Technol. 15:120-124, 1952.
 31. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Métodos de análises bromatológicas. I. Análise químicas. São Paulo, Rev. Triunais, 1951.
 32. NOVELLI, A. — Química Organica. Buenos Aires, El Ateneo, 1959. v. 3: p. 351-353.
 33. WITTER, L. D. — & TUCKEY, S. — Variable factors in the new test for penicillin in milk. J. Milk Fd. Technol. 23:230-233, 1960.
 34. ARRET, B. & KIRSHBAUM, A. — A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. J. Milk Fd. Technol. 22:329-331, 1959.
 35. SHAHANI, K. M. — Factors affecting the visual method of detecting antibiotics in milk. J. Dairy Sci. 42:912-915, 1959.
 36. XIMENES, J. — Prova de sensibilidade antibiótica. Cadern. Terap. 6(5):266-267, 1965.
 37. MELLO FILHO, A. — O leite: colimetria, fosfatasimetria e contagem global. Rev. Inst. Adolfo Lutz 20:129-160, 1960.

Recebido para publicação em 7 de fevereiro de 1967.

Alexandre Mello Filho

Rua Ubatuba, 455

São Paulo

Brasil

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS SETE PRIMEIROS CASOS DE FASCIIOLOSE HUMANA ENCONTRADOS NO VALE DO PARAIBA, ESTADO DE SÃO PAULO (1)

HUMAN FASCIOLIASIS IN THE PARAIBA VALLEY. CONSIDERATIONS ON THE FIRST SEVEN CASES DESCRIBED IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

LUÍS DOS SANTOS (2)
TEREZA FREIRE VIEIRA (3)

SUMMARY

The high incidence (10%) of *Fasciola hepatica* in cattle in the Paraíba River Valley found by Ildeo França, 1967, suggested the possibility of occurrence of human cases in this region. In a few months it was possible to diagnose seven cases of *Fasciola hepatica* all of them autoctones of the Paraíba Valley. Formerly in Brazil only a case had been described by Luis Rey, 1958, in the state of Mato Grosso, Brazil.

The diagnosis was made on faeces examination reinforced by billis examination and intradermal reaction to specific antigens.

The patients have lived in this region for many years and used to eat water-cress (*nasturtium officinale*) and drink water from drains or brooks.

These findings suggested a larger scale survey to evaluate the incidence of fascioliasis in Brazil, in order to prevent its dissemination.

I — INTRODUÇÃO

A *Fasciola hepatica*, Linnaeus 1758, causadora da distomatose ou fasciolose hepática, foi um dos primeiros parasitos a serem descritos desde 1379 (Jean de Brie).

A elucidação do ciclo de vida da *Fasciola*, no entanto, só ocorreu muito mais tarde, entre 1873 e 1883, graças aos trabalhos de Weinland, Leuckart, Thomas e outros^{1, 2}, e LUTZ³ que descobrem ser um caramujo o hospedeiro intermediário e o boi e o carneiro, os hospedeiros definitivos.

Pouco depois, no entanto, MONIEZ², em 1896, relata 32 casos de distomatose humana, encontrados e descritos por diversos autores em vários países da Europa.

Hoje são numerosos os casos de parasitismo humano pela *Fasciola hepatica*, sendo

conhecidos e relatados nos cinco continentes, a saber: Europa — Hungria, França, Espanha, Portugal (inclusive Ilha da Madeira); Ásia — China, Rússia, Síria, Turquia etc.; África — Argélia, Egito, África do Sul, Somália Francesa etc.; Oceania — Austrália (Queneslândia); Américas — República Dominicana, Costa Rica, México, Pôrto Rico, Venezuela, Chile, Argentina, Cuba, etc.^{4, 5}.

No Brasil, REY⁶, em pesquisa efetuada no Rio Grande do Sul, em 1957, visando confirmar a existência de 22 casos humanos suspeitos de infestação pela *Fasciola hepatica*, não pôde comprovar nenhum deles, embora investigações intensas fôssem efetuadas junto às pessoas suspeitas e seus familiares.

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

(2) Do Laboratório Regional de Taubaté.

(3) Da Clínica Médica N. S. das Graças (Taubaté) e do Hospital Bom Jesus do Tremembé.

Em 1958, REY⁷ descreve o primeiro caso de fasciolose humana, em uma criança de três anos, descoberto em Mato Grosso pela Primeira Bandeira Universitária Paulista.

No Brasil, até a presente data, não há qualquer outra referência sôbre novas ocorrências de distomatose humana; assim, com os sete casos por nós descobertos no Vale do Paraíba, eleva-se a oito o total de casos registrados de parasitismo humano por *Fasciola hepatica* em nosso país.

Nossa atenção para a fasciolose humana, no Vale do Paraíba, foi despertada pelo trabalho de FRANÇA⁸ sôbre a incidência de fasciolose em bovinos desta região. De fato, pudemos acompanhar o trabalho dêste pesquisador, ajudando-o nos cortes de alguns fígados de boi para observação e coleta de fascíolas. França verificou que 10% das reses que examinou estavam parasitadas por *Fasciola hepatica*. Êstes animais provinham de municípios do próprio Vale do Paraíba, tais como: Taubaté, S. Luiz do Paraitinga, Redenção da Serra, Natividade da Serra, Caçapava, Jambeiro e Paraibuna.

O elevado índice de positividade da distomatose no gado, encontrado por França, sugeriu-nos a possibilidade de existência de casos humanos nesta Região, que é essencialmente agrícola e pastoril (zona produtora de leite). Ora, há sete anos, vimos nos dedicando ao estudo da esquistossomose no Vale do Paraíba e dela conhecemos quase todos os focos. Sabíamos, pois, da existência de caramujos das espécies *Biomphalaria tenagophila*, *B. schrammi*, *B. sp.*, *Drepanotrema melleum*, *D. cimex*, *D. anatinum*, *Ampullaria sp.*, e *Physa sp.* No entanto, ainda não havíamos encontrado nenhum caramujo

do gênero *Lymnaea*, que é geralmente apontado como o hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*. Passamos, por isso, a procurá-lo mais intensamente e terminamos por encontrá-lo em vários locais da região, conforme é descrito num trabalho atualmente em elaboração. Em vista dêstes fatores conjugados, ficamos de sobreaviso. Ovos de *Fasciola hepatica*, obtidos por sedimentação da bile de boi, foram mostrados a técnicos de laboratório, a fim de mais seguramente serem reconhecidos êstes ovos. Confiávamos em que, mais cedo ou mais tarde, acabaríamos por encontrar casos humanos de fasciolose. A nossa expectativa foi plenamente confirmada pois, entre 5/10/66 e 23/3/67, foi possível diagnosticar a fasciolose hepática em 7 pessoas.

Acreditamos que essa helmintose tenha passado despercebida aos médicos, talvez porque não apresente uma sintomatologia bem característica, ou por estar quase sempre associada a outras parasitoses.

Os sete pacientes, objeto de estudo e das observações relatadas neste trabalho, são doentes autóctones do próprio Vale do Paraíba, onde a fasciolose bovina é endêmica desde há trinta anos⁸ e onde também subsistem condições para que ela se instale e se mantenha entre a população humana da região, graças às culturas de agríão ali existentes e às águas poluídas de córregos e valetas que muitos camponeses costumam beber, quando em serviço de campo.

II — DADOS PARASITOLÓGICOS

A *Fasciola hepatica* é um verme trematódeo, medindo 3.5 x 1.5 cm; quando adul-

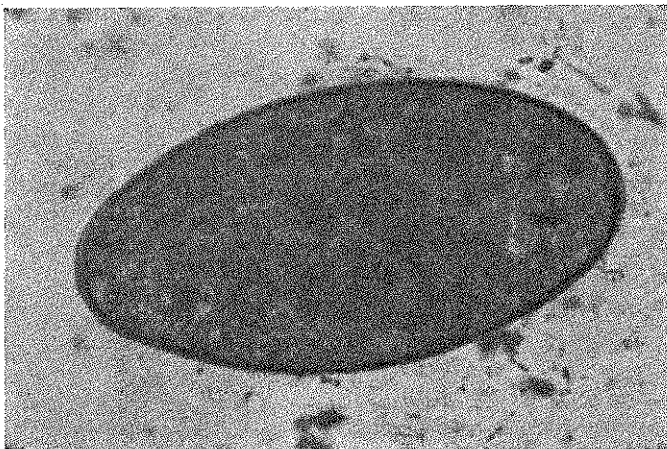


Fig. 1 — Ovo de *Fasciola hepatica* encontrado em fezes humanas. 400 x.

to, habita nos canais biliares do boi e do carneiro que são normalmente os hospedeiros definitivos. No entanto, outras espécies animais podem ser parasitadas — antílope, boi, búfalo, camelo, canguru, cão, castor, cavalo, cobaia, coelho, elefante, gato, esquilo, lebre, macaco, porco, veado^{1, 2, 3, 4, 9, 10} e também o *Homem*, que é objeto deste trabalho.

Os ovos do trematódeo são operculados (Fig. 1 e 2), medindo em média $140 \times 90 \mu$, sendo despejados no intestino junto com a bile. Misturam-se às fezes e são então eliminados para o exterior, ainda não embrio-

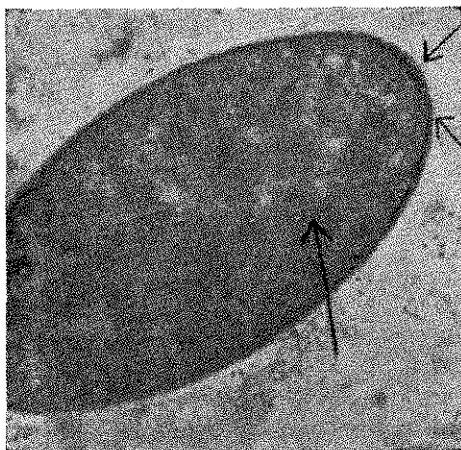


Fig. 2 — Detalhe mostrando o operculo e o óvulo. 400 x.

nados. Em contacto com a água, após dez dias, forma-se um embrião ciliado, o miracídio, cuja saída (ou ecdise) é favorecida pela presença de luz e calor (19-25°C).

Os ovos da *Fasciola hepatica* são bem maiores do que os de *Ascaris* mas podem ser confundidos com os ovos estéreis deste helminto, quando estes apresentam, por vezes, tamanho maior do que o usual. Neste caso, os da *Fasciola* distinguem-se dos de *Ascaris* principalmente pela presença do opérculo e pela estrutura interna (Fig. 3).

Deve-se notar que os ovos da *Fasciola hepatica* têm um grande poder de sobrevivência no meio externo, pois, em fezes humanas, permanecem vivos até nove meses⁴ mas, para se desenvolverem, necessitam de água, dependendo do tempo para formação de miracídio principalmente da temperatura pois, a 11°C, a eclosão pode depender até quarenta dias. O desenvolvimento dos ovos e a in-

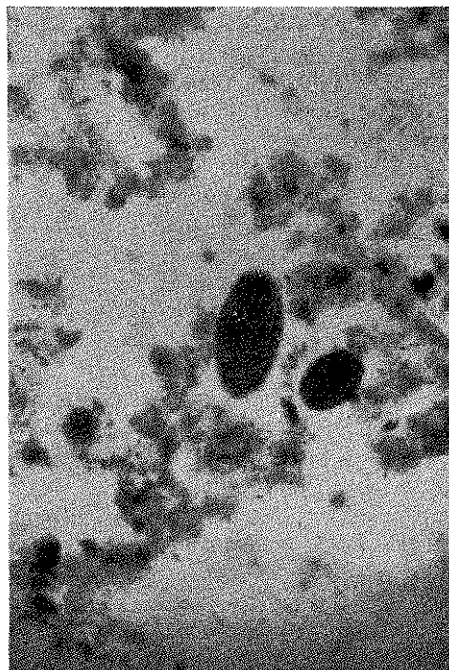


Fig. 3 — Ovo de *Fasciola hepatica* comparado com ovo de *Ascaris lumbricoides*.

festação dos moluscos não ocorre, portanto, em terrenos completamente secos.

Os miracídios, segundo alguns autores^{4, 6}, têm vida curta, já morrem após oito horas, se não encontram um caramujo para penetrar.

O hospedeiro intermediário é um caramujo aquático do gênero *Lymnaea*, e que no Brasil é representado pela espécie *Lymnaea viator*, segundo LUTZ³, REY⁶, MALDONADO¹¹ e outros.

Brumpt fornece uma lista com cerca de vinte e duas espécies e variedades de *Lymnaea*, e duas espécies de *Physa*, como hospedeiros intermediários da *Fasciola hepatica*, em muitos países.

Jturbe & Gonzalez^{apud 1} afirmam, sem fornecer dados experimentais, que, na Venezuela, o hospedeiro intermediário é um molusco operculado — *Ampullaria luteostoma*.

Já MAIA⁴, em 1951, além das várias espécies de *Lymnaea*, cita, como possíveis transmissores da fasciolose, outros moluscos, dos gêneros *Succinea*, *Fossaria*, *Fratricolleta*, *Bullinus*, *Ampullaria*, *Physopsis* e *Physa*.

LUTZ¹², 1928, aponta a *Lymnaea cubensis* como hospedeiro intermediário da *Fasciola hepatica*, na Venezuela, afirmando também ser inadmissível o desenvolvimento de

cercárias da *Fasciola* em caramujos do gênero *Ampullaria*.

No Brasil, LUTZ³, em 1921, cita o encontro da *Lymnaea viator*, nas margens do Rio Paraíba, desde a Barra do Pirai (Est. R. Janeiro) para baixo. Igualmente, REY⁶, em 1957, afirma que as espécies comprovadamente transmissoras da distomatose pertencem ao gênero *Lymnaea*; em Pelotas, no Rio Grande do Sul, encontrou a *Lymnaea viator* que, segundo outros autores^{13, 14}, é também a responsável pela fasciolose hepática na Argentina e Chile.

Depois da penetração do miracídio, cerca de trinta ou quarenta dias, formam-se as cercárias que saem do caramujo, nadam na água durante algum tempo, depois se encistam (metacercárias), sendo engolidas pelo hospedeiro definitivo — boi, carneiro, cabra, cavalo, rato ou o próprio homem. LUTZ³, entretanto, afirma que as cercárias não saem do caramujo, mas sim acumulam-se no ápice da concha e só saem após a morte do caramujo.

Já se demonstrou⁴ que os cistos têm grande poder de resistência, pois permanecem vivos durante algumas semanas nas forragens secas, ou onze meses na geladeira, ou cerca de um ano nas forragens úmidas e ensiladas, podendo durar até oitenta dias quando livres na água, ou aderindo às folhas do agrião ou do capim submerso.

Essa resistência dos ovos e metacercárias (cistos) permite indicar a forma provável da manutenção e da disseminação da distomatose, mesmo em locais onde o gado é permanentemente estabelecido, devido ao uso comum do estrume do gado como adubo, e das forragens como alimento dos animais.

Após a ingestão das metacercárias, estas são libertadas no duodeno, pela digestão das membranas císticas envolventes. Atravessam então a parede do intestino, atingem o peritônio, depois o parênquima hepático, através da cápsula de Glisson e, em seguida, chegam aos canais biliares onde se transformam em fascíolas adultas, após três a quatro meses, aí passando a viver e a pôr ovos.

MAIA⁴, REY⁶, BELDING⁹ e GRAIG & FAUST¹⁰ afirmam ser indispensável, para o perfeito desenvolvimento dos vermes, a penetração no fígado através da perfuração do parênquima hepático; isto porque já se verificou que a bile concentrada da ampola de

Vater mata os pequenos distômulos, recém-saídos dos cistos. Podem, no entanto, atingir o fígado através da veia porta e um certo número de distômulos podem eventualmente cair na circulação geral, o que permite explicar as localizações erráticas dos vermes adultos de *Fasciola hepatica* em vasos sanguíneos, abscessos situados nos pulmões, baço, tecido intermuscular, tecido subcutâneo e em vários órgãos humanos^{2, 4}.

III — MATERIAL E MÉTODOS

Todos os doentes tiveram o seu diagnóstico inicial, através do exame de fezes. Posteriormente, era feita a confirmação da parasitose pelo encontro dos ovos da *Fasciola hepatica* na bile obtida por tubagem duodenal, e ainda, por meio de novos exames de fezes, nos quais sempre empregávamos os métodos de WILLIS, FAUST, e HOFFMAN-PONS-JANER^{10, 15, 16, 17}.

Depois de confirmado o diagnóstico, solicitávamos os exames de fezes dos familiares do paciente; desta forma, foi possível descobrir mais dois casos que, normalmente, teriam passado despercebidos. Em seguida, os doentes eram examinados clinicamente e concomitantemente efetuavam-se os respectivos hemogramas. Através das reações de Kunkel, de MacLagan, e de Hanger, efetuavam-se as provas da função hepática^{18, 19, 20}.

Em quatro casos, valemo-nos da intradermo reação para *Fasciola hepatica*, cujo antígeno específico foi feito com vermes adultos da *Fasciola hepatica*. Em dois casos foram feitas as dosagens de bilirrubina total, direta e indireta, e das transaminases glutâmico pirúvica e oxalacética, mas os pacientes recusaram o tratamento e abandonaram a clínica. Os demais, foram internados em hospital para tratamento.

IV — OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

CASO I — S. P., 64 anos, feminino, branca, casada, natural de Taubaté, Est. de S. Paulo. Data do 1.º Exame de Fezes positivo: 5-10-1966.

História — O diagnóstico de fasciolose foi feito através de exames de fezes, pelos métodos de Willis e de Hoffman-Pons-Janer. O processo de Willis revelou ovos de *Asca-*

ris lumbricoides e larvas de *Strongyloides stercoralis*; o método de Hoffman, entretanto, revelou além daqueles nematóides, também a presença de ovos operculados, medindo cerca de $140 \times 90 \mu$, que identificamos como de *Fasciola hepatica*. A tubagem duodenal e posterior exame da bile confirmaram plenamente o nosso diagnóstico inicial, pois encontramos novamente vários ovos de *Fasciola hepatica*. Lâminas contendo ovos do trematóide, obtidos das fezes e da bile, foram colocados em câmara úmida, à temperatura constante de 25°C. Estas lâminas eram examinadas diariamente, possibilitando-nos acompanhar todo o desenvolvimento do embrião desde a célula inicial até a formação completa do miracídio, o que se dava após 15 dias.

Em posterior exame clínico, a paciente, que já se encontrava internada no Hospital Bom Jesus, relatou que, apesar de residir em Taubaté há vários anos, anteriormente havia morado em uma fazenda em Registro (Munic. Taubaté), onde, de vez em quando, ingeria agrião.

Exame físico — Acentuado emagrecimento; pele seca, com elasticidade acentuadamente diminuída, encarquilhada; palidez evidente da pele e mucosas. Tumoração na região inguinal esquerda. Pêso: 47,8 kg. Altura: 1,58 m. Aparelho circulatório: pressão arterial 21/8, sem alteração à ausculta. Aparelho respiratório: normal. Aparelho genito-urinário: sem queixas. Aparelho digestivo: queixa de enjôo, às vezes vômitos; intolerância por alimentos gordurosos, desde de há algum tempo; meteorismo intenso e às vezes dor no hipocôndrio direito.

Exames complementares — Exame hematológico: anemia intensa e ligeira leucopenia. Provas da função hepática: dosagens de bilirrubina direta, indireta e total, respectivamente 0,4; 0,2 e 0,6 mg/100 ml, feitas pelo método de Malloy Evelin, com leitura fotocolorimétrica. A dosagem das transaminases glutâmico pirúvica e oxalacética deram respectivamente 70 e 55 unidades (Reitman Frankel).

Foi feito um tratamento inicial para melhorar o estado geral da paciente, incluindo pequenas e repetidas transfusões de sangue, além de proteínas, vitaminas e aminoácidos.

Alguns dias depois, a paciente deixou o Hospital por não querer operar a tumoração que apresentava na região inguinal esquerda e que também tomava parte da região femural anterior. Não retornou à Clínica para tratamento da fasciolose hepática ou para outros exames.

CASO 2 — B. R., 45 anos, masculino, branco, natural de Taubaté, S. P. e espôso de S. P. (caso 1). Data do 1.º Exame de Fezes positivo: 20-10-66.

História — Suspeitávamos de que alguns dos familiares da paciente S. P. (caso 1), com diagnóstico de fasciolose hepática, também pudessem estar infestados pois, vivendo em comum, com os mesmos hábitos, tipo de alimentação e bebendo a mesma água, havia possibilidade de isto acontecer. Assim, solicitamos amostra de fezes deste paciente, para exame que efetuamos pelos métodos de Willis, de Hoffman-Pons-Janer e de Faust. O primeiro processo nada revelou, mas os dois últimos evidenciaram a presença de vários ovos de *Fasciola hepatica*, que fotografamos e confrontamos com aqueles obtidos por sedimentação da bile de boi, sendo sua evolução acompanhada até a formação do miracídio.

Exame físico — O paciente não compareceu para exame clínico ou tubagem da bile.

Exames complementares — Exame hematológico — série vermelha: normal; série branca: eosinofilia relativa e absoluta e linfocitose relativa.

CASO 3 — M. I. M., 16 anos, feminino, preta, solteira, natural de Redenção da Serra, S. P., onde reside. Data do 1.º Exame de Fezes positivo: 7-12-66.

História — Este caso foi descoberto através de exame de fezes de material enviado pelo PAMS de Redenção da Serra ao Instituto Adolfo Lutz (Lab. Reg. Taubaté). Inicialmente, ovos de *Fasciola hepatica* foram descobertos apenas através do método de Hoffman, já que o processo de Willis nada acusou. Posteriormente foi extraída a bile por tubagem, que apresentou aspecto sanguinolento; ao microscópio revelou a

existência de numerosos ovos de *Fasciola hepatica*. Efetuamos nôvo exame de fezes em 23-2-67, pelos três métodos rotineiros. Os processos de Willis e Faust foram negativos, mas o de Hoffman novamente acusou a presença de ovos de *Fasciola*. Em vista do diagnóstico, o paciente foi internado no Hospital Bom Jesus de Tremembé, para exame clínico e tratamento.

Exame físico — Pêso: 50,8 kg. Altura: 1,55 m. Pressão arterial: 10/7 cm Hg. Queixa de mal estar, ânsia de vômito e dores abdominais. O intestino era preguiçoso e não apresentava surtos diarrêicos. Às vezes, dor no estômago e vômitos. À palpação do abdômen, sentia dor no hipocôndrio direito e epigástrico. O exame dos aparelhos respiratório, circulatório e gênito-urinário nada apresentou de anormal.

Exames complementares — Exame hematológico: anemia — 3 800 000 hemácias/mm³; leve leucopenia — 5300 leucócitos/mm³; eosinofilia relativa — 12% e absoluta — 636/mm³. Provas da função hepática: Kunkel — 20,2 unid.; Maclagan — 2,3 unid.

CASO 4 — L. U. L., 21 anos, feminino, branca, solteira, natural de Virginia, M.G., onde morou 4 anos, até mudar-se para S. Luís do Paraitinga onde permaneceu até há 7 meses, quando veio residir em Taubaté. Data do 1.º Exame de Fezes positivo: 21-1-67.

História — A paciente *motu próprio*, sentindo-se mal, encaminhou as fezes para exame ao Inst. Adolfo Lutz (Taubaté), através do Centro de Saúde local. A fasciolose foi revelada pelo encontro de ovos operculados, em exame de fezes pelo processo Hoffman-Pons-Janer. Para confirmação, foi efetuado um segundo exame de fezes, após regime alimentar isento de carne ou fígado, que foi efetuado em 31-10-67. As técnicas de Faust e de Hoffman-Pons-Janer novamente revelaram a existência de numerosos ovos de *Fasciola hepatica*. Em 1-2-67 foi internada no Hospital Bom Jesus para tratamento e extração da bile: o exame da bile confirmou, mais uma vez, os resultados anteriores, já que em todas as lâminas observadas encontramos ovos de *Fasciola hepatica*.

Exame físico — Estado geral bom. Pêso: 57 kg. Altura: 1,65 m. Queixa: há dois anos, dor intensa, em barra, na parte alta do abdômen; enjôo quando comia carnes gordurosas ou frituras. Dor à palpação do hipocôndrio direito e epigástrico. Fácil irritabilidade. Aparelhos respiratório, circulatório e gênito-urinário: normais.

Exames complementares — Exame hematológico: eosinofilia (5%); linfocitose (34%) e discreta leucocitose (8500/mm³). Provas da função hepática: Reação de Kunkel, 5,5 unid. Reação de Maclagan, 1,3 unid. Intradermo reação, positiva.

CASO 5 — A. G., 40 anos, feminino, branca, casada, natural de S. José do Barreiro, S. P. Mora há 3 anos em Taubaté, mas residiu anteriormente em Natividade da Serra (S. P.), durante 10 anos. Data do 1.º Exame de Fezes positivo: 31-1-67.

História — O primeiro exame de fezes foi efetuado com material encaminhado pela própria paciente ao Instituto Adolfo Lutz (Taubaté) através do Centro de Saúde daquela cidade, em 31-1-67. Pela técnica de Willis nada encontramos mas, pelos métodos de Hoffman-Pons-Janer, pudemos encontrar 9 ovos de *Fasciola hepatica* numa única lâmina e 5 ovos noutra. Para confirmação, solicitamos nova amostra de fezes, após três dias de regime isento de carne. O exame, feito em 3-2-67, pela técnica de Hoffman, revelou a existência de 5 ovos de *fasciola* por lâmina observada. O processo de Faust revelou sempre a existência de 1 ou 2 ovos por lâmina. Já o método de Willis revelou-se ineficiente e não evidenciou a presença de ovos do distomo. O exame de bile, obtido por tubagem em 10-2-67, novamente acusou a presença de 2 ovos de *Fasciola hepatica*, sendo um deles morto e outro vivo, cujo desenvolvimento acompanhamos até a formação do miracídio.

Relatou que quando morou em Natividade da Serra, numa fazenda de sua propriedade, ingeria, por vezes, agrião (*Nasturtium officinale* proveniente de uma horta da própria fazenda e que era regada por um córrego que passava pouco abaixo do curral. Queixava-se principalmente de dores abdominais com predominância na parte alta do abdome. Quando fazia uso de comidas gor-

durosas, frituras ou banana tinha surtos diarreicos com fezes líquidas e espumosas, acompanhados de cólicas intestinais intensas. Relatou ainda que, em maio de 1966 apresentava esses sintomas e o médico que a atendeu disse tratar-se de um caso de brucelose, internando-a para tratamento. Nessa ocasião, a Reação de Wright²¹ para brucelose foi positiva a 1:80. O exame de fezes foi negativo. O hemograma acusava ligeira anemia hipocrômica (4 750 000 hem./mm³); leucopenia (4 000 leucoc./mm³) e eosinofilia sensível e linfocitose relativa. Foi medicada com Estreptomomicina, 1 g por dia, durante 10 dias seguidos; Amplocid, 1 drágea de 6 em 6 horas; Sigmamicina, 1 drágea de 6 em 6 horas. Disse a paciente que, na ocasião do tratamento, apresentava queda de cabelo, sendo este o único mal de que melhorou, pois continuou com as dores abdominais ou cólicas; os alimentos gordurosos faziam-lhe mal; continuava a perder peso e as manchas escuras no rosto, que se não apresentaram na ocasião, foram aparecendo e acentuando-se cada vez mais.

Exame físico — a paciente apresentava-se emagrecida, com manchas pardacentas na face, membros superiores e região cervical.

Exames complementares — Exame hematológico em 3-2-67 — hemácias/mm³: 4 400 000; hemoglobina: 14,10g — 88%; leucócitos/mm³ 4200; eosinofilia relativa — (11%) e absoluta (462); linfocitose relativa. Provas da função hepática — Kunkel: 11,2 unid.; Maclagan: 2,0 unid. Reação de Wright²²: positiva (1:40). Reação de Huddleson: negativa. Sorologia para *Lues*: negativa. Reação intradérmica, positiva.

CASO 6 — M. E. M., 23 anos, feminino, preta, solteira, natural de Redenção da Serra, onde reside. Irmã da capiente M. I. M. (caso 3). Primeiro Exame Fezes positivo: 23-2-67.

História — Sempre que descobríamos uma pessoa com fasciolose, efetuávamos exame de fezes em todos os componentes da família: assim, procedemos ao exame de fezes com material de uma família constante de sete pessoas, das quais mais uma se apresentou parasitada pela *Fasciola hepatica*, além de M. I. M. (caso n.º 3) que já tinha diagnóstico positivo anterior.

Os exames de fezes foram feitos empregando-se as três técnicas já citadas. Somente as técnicas de Faust e Hoffman permitiram descobrir ovos operculados da *Fasciola*. O método de Willis foi negativo para os ovos do trematóide.

Novo exame de fezes foi efetuado em 20-3-67, sendo utilizados os mesmos três métodos anteriores; desta vez, porém, todos com resultados negativos para a fasciolose. Na mesma data extraímos a bile da paciente por tubagem. Houve grande dificuldade na extração do material porque a paciente não tolerou a sonda. A bile obtida foi imprópria para o exame, pois não continha nenhum sedimento ou filamento de muco onde em geral se encontram os ovos da fasciola. Em vista disso, efetuamos na paciente, em 21-3-67, uma reação intradérmica com antígeno específico para *Fasciola hepatica*, produzido no Instituto Biológico de São Paulo, com os próprios vermes adultos retirados do fígado de bovinos. A reação foi fortemente positiva (Fig. 4), tendo a pápula formada um diâmetro de 3,0 cm, apresentando vários pseudópodos irregulares.

Exame físico — A paciente foi, em vista do diagnóstico, internada no Hospital Bom Jesus de Tremembé para tratamento. Ao se proceder ao exame clínico, descobriu-se que estava grávida, embora isto fosse negado com veemência pela paciente. Talvez fosse essa a causa de a doente não apresentar queixa de qualquer espécie com relação à fasciolose, como enjôo, vômitos, cólicas, dor etc. Do mesmo modo que sua irmã, a doente refere ter bebido algumas vezes água de valetas e ingerido agrião cultivado no campo.

Exames complementares — Hemograma: eosinófilos — 2%; leucopenia — 8 800; neutropenia — 59%; linfocitose — 38%; hemácias/mm³ 4 100 000 (discreta eritropenia). Provas da função hepática: Kunkel — 27,2 unid.; Maclagan — 4,8 unid.

Em 22-3-67 a paciente abandonou o hospital sem sequer iniciar o tratamento.

CASO 7 — E. M. R., 34 anos, feminino, branca, casada, natural de Pouso Alto, MG e residente em Jambeiro, S. P., desde os 4 anos de idade. Data do 1.º Exame de Fezes positivo: 21-3-67.

História — Os ovos de fasciola foram descobertos em exames de fezes pelo método de Hoffman, em material remetido pelo PAMS de Jambeiro, em 21-3-67. Para confirmação, efetuamos novo exame em 28-3-67, usando os três métodos habituais. Somente os de Faust e Hoffman-Pons-Janer puderam evidenciar os ovos do Trematóide. O processo de Willis deu resultado negativo.

Em 31-3-67 a paciente foi submetida a tubagem para extração da bile, cujo exame comprovou novamente a existência da fasciolose hepática. Nessa ocasião, a paciente relatou que só bebia água filtrada mas frequentemente ingeria agrião (*Nasturtium officinale*) cultivado em uma invernoada na fazenda de seu pai. Foi internada para tratamento.

Exame físico — Estado geral, bom. Altura: 1,65 m. Peso: 58 kg. Não apresentava queixas e, de modo geral, sentia-se bem. Aparelhos circulatório, respiratório e genito-urinário, sem anormalidades.

Exames complementares — Hemograma — Neutropenia relativa (52%); Linfocitose relativa (33%). Hemácias — discreta microcitose e hipocromia. Hemossedimentação — 18 mm/h. Hemoglobina — 78%. Prova da Função hepática: Kunkel — 19,2 unid.; Maclagan — 6,0 unid. A reação intradérmica com antígeno de *Fasciola hepática* foi fortemente positiva, tendo-se formado uma pápula com 3 x 2 cm de diâmetro e com vários pseudópodos irregulares (Fig. 4).

V — DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apresentamos os resultados das observações dos sete primeiros casos de fasciolose humana registrados no Vale do Paraíba, Est. de São Paulo. Anteriormente ao nosso trabalho, no Brasil, apenas um caso de distomatose humana havia sido descrito por REY⁷, em 1958, que encontrou em Mato Grosso uma criança de três anos parasitada pelo trematóide. Em 1957, o mesmo REY foi ao Rio Grande do Sul investigar sobre a possibilidade da ocorrência da fasciolose humana naquele Estado; após minuciosas investigações, não lhe foi possível comprovar nenhum caso positivo. PESSOA¹⁸, PINTO²³, LUTZ³, AMATO NETO¹⁵, BRUMPT¹

não referem nenhuma ocorrência humana no Brasil.

Reveste-se, portanto, de extraordinária importância a descoberta destes casos no Vale do Paraíba, principalmente por se tratar de uma região que, além de agrícola, com extensas várzeas com plantações de arroz e hortaliças diversas, inclusive o agrião (*Nasturtium officinale*), apresenta-se também como região pastoril e grande produtora de leite. Ora, sendo o gado do Vale do Paraíba altamente infestado pela distomatose e havendo nas fazendas, nas hortas e nas várzeas o caramujo transmissor, conforme será relatado em outro trabalho, existem portanto todas as condições para que a doença se instale no homem. Foi, de fato, o que aconteceu, pois a descoberta destes casos apenas foi uma questão de oportunidade e de atenta observação. Acreditamos que não só nesta região como em outros locais onde existam ou se estabeleçam condições favoráveis novos casos poderão ser encontrados, bastando para tanto que os laboratórios sejam orientados no sentido de identificar com precisão os ovos operculados da *Fasciola hepática*. Assim, também os médicos, ao observarem os sintomas já descritos, deverão ter em mente a possibilidade de distomatose humana, principalmente quando os que passarem por consulta médica provierem de zonas suspeitas de infestação ou onde já comprovadamente se encontrou o caramujo transmissor, ou de zonas onde haja gado infestado, ou, ainda, cultura de agrião possível de contaminação.

Os sete casos por nós relatados neste trabalho são todos autóctones do Vale do Paraíba e foram encontrados exatamente nos lugares onde já havia gado intensamente parasitado pela *Fasciola hepática*⁸, ou seja, em fazendas nas proximidades de Taubaté, Natividade e Redenção da Serra, São Luiz do Paraitinga e Jambeiro. Todos os pacientes moraram em tais fazendas onde ingeriam agrião (*Nasturtium officinale*) cultivado nas invernoadas e, às vezes, alguns bebiam água de córregos ou valetas.

A descoberta da fasciolose hepática foi efetuada, em todos os casos, inicialmente através do encontro de ovos de trematóide em exame de fezes; após o primeiro resultado positivo, era feito, para confirmação, pelo menos mais um exame de fezes, empregando-se as técnicas de Willis, Faust e Hof-

fman-Pons & Janer. Embora fôsse confirmado o diagnóstico inicial, ainda assim se procedia à pesquisa dos ovos da *Fasciola hepatica* na bile obtida por tubagem.

Apenas em um dos casos o exame da bile foi negativo. O material obtido através da tubagem era impróprio à observação, pois não continha sedimento ou filamentos de muco, onde geralmente se podem encontrar ovos da *Fasciola hepatica*. Em vista disso, efetuamos nas pacientes uma reação intradérmica com antígeno específico feito com os próprios vermes retirados do fígado de bois infestados. A reação foi fortemente positiva, pois se formou uma pápula com cerca de 3 cm de diâmetro (Fig. 4), após 20 minutos.

nos foi possível encontrar ovos operculados do trematóide. Esta técnica favorece o encontro dos ovos porque permite a confecção de lâminas com material claro e limpo. Entretanto, deve-se observar pelo menos 10 lâminas antes de se dar um resultado negativo. O método não é, de fato, cem por cento eficiente, pois também pudemos verificar, tal como MAIA ⁶, que, examinando-se o sedimento no fundo do tubo de centrifugação, ainda se podem encontrar ovos de *Fasciola hepatica*. Torna-se evidente que nem todos os ovos flutuam no sulfato de zinco e, nos casos de fraca infestação, pode ocorrer um falso resultado negativo.

O método de Hoffman-Pons-Janer mostrou-se excelente para o diagnóstico da *Fas-*

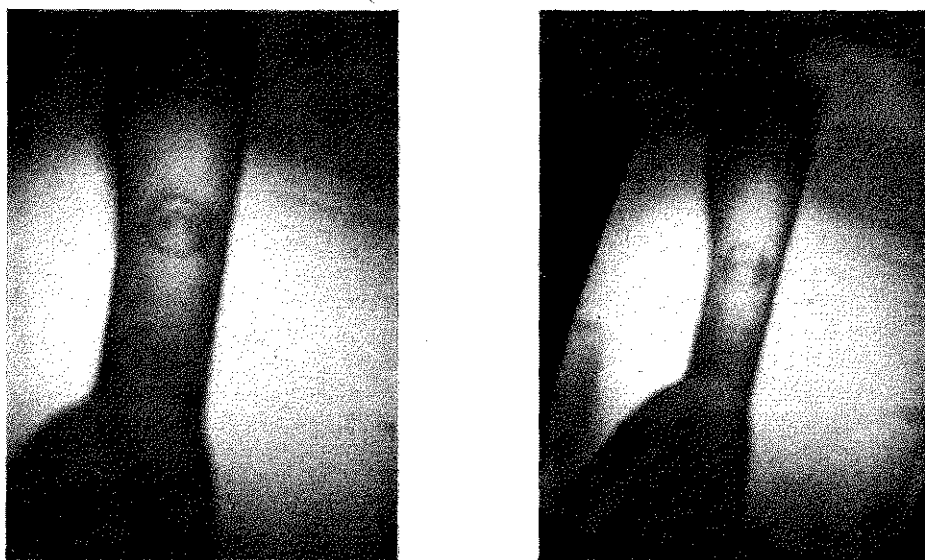


Fig. 4 — Reação intradérmica para *Fasciola hepatica*. Aspecto da pápula formada após 30 min. da injeção intradérmica.

A observação do quadro I (Pág. 90) permite-nos comparar os métodos de diagnóstico utilizados e a eficiência de cada um deles.

Observamos que o método de Willis é completamente ineficiente para a pesquisa de ovos de *Fasciola hepatica*, pois os resultados foram sempre negativos, embora fizéssemos a leitura de várias lâminas.

A técnica de FAUST ¹⁰, entretanto, revelou-se muito boa para o diagnóstico da fasciolose; apenas em dois casos (28,5%) não

ciola hepatica. Permitiu-nos positivar todos os sete casos de fasciolose por nós encontrados, logo no primeiro exame de fezes efetuado (Quadro I). No segundo exame de fezes, para confirmação do primeiro, em apenas um caso (14%) este método foi negativo. Pudemos observar, ainda, que este método evidencia sempre um maior número de ovos por lâmina, que o método de Faust. Deve portanto, esta técnica ser empregada como de rotina na pesquisa de ovos de *Fasciola hepatica*.

QUADRO I

Resultados dos exames de fezes, da bile e da reação intradérmica para o diagnóstico de fasciolose hepática humana, segundo os métodos utilizados

Caso n.º	F e z e s						Bile	Reação intradérmica
	1.º Exame			2.º Exame				
	W	H	F	W	H	F		
1	—	...	+	—	+	+	+	...
2	—	+	+	—	+	+
3	—	...	+	—	—	+	+	...
4	—	...	+	—	+	+	+	+
5	—	...	+	—	+	+	+	+
6	—	+	+	—	—	—	—	+
7	—	...	+	—	+	+	+	+

W — Willis

H — Hoffman-Pons-Janer

F — Faust

+ positivo

— negativo

... não efetuado

Quanto às parasitoses associadas à fasciolose e reveladas através de exame de fezes, verificamos que, em três casos, (2, 5 e 7), há infestação simples por *Fasciola hepatica*. Há um caso (4) de associação com *Trichocephalus trichiurus*; um outro (1) de associação com dois vermes — *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*; outros dois casos (3 e 6), infestação múltipla por quatro ou cinco parasitos — *Ascaris lumbricoides*,

des, *Ancylostomidae*, *Trichocephalus trichiurus*, *Strongyloides stercoralis* e *Entamoeba coli*.

Observando os quadros II e III, podemos notar que não há correspondência nítida entre a eosinofilia e número de espécies de parasitos; de fato, o paciente número seis, que tem infestação por mais cinco parasitos além da fasciola, é o que apresenta a menor taxa de eosinófilos, apenas 2%.

QUADRO II

Parasitoses associadas à *Fasciola hepatica* reveladas em exames de fezes

Parasitos	C A S O S						
	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6	N.º 7
<i>Ascaris lumbricoides</i>	+	—	+	—	—	+	—
<i>Ancylostomidae</i>	—	—	+	—	—	+	—
<i>Trichocephalus trichiurus</i>	—	—	+	+	—	+	—
<i>Strongyloides stercoralis</i>	+	—	+	—	—	+	—
<i>Entamoeba coli</i>	—	—	—	—	—	+	—

QUADRO III
Exame Hematológico

SANGUE	CASOS						
	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6	N.º 7
Hemácias/mm ³	2 920 000	4 900 000	3 800 000	5 000 000	4 400 000	4 100 000	4 100 000
Hemoglobina (%)	47	43	85	90	8	83	78
Leucocitos/mm ³	5 500	5 200	5 300	8 500	4 200	8 800	6 500
Contagem específica (%)							
Neutrófilos	60	48	45	60	47	59	57
Eosinófilos	3	9	12	5	11	2	4
Basófilos	0	0	0	0	0	0	1
Linfocitos	32	36	40	34	40	38	33
Monocitos	5	7	3	1	2	1	5
Hemossedimentação mm/h (Wintrobe)	...	6	34	5	8	29	18

... Não efetuado

De modo geral, podemos concluir que a infestação humana pela *Fasciola hepatica* acarreta, quase sempre, leve eosinofilia, neutropenia, linfocitose e leve leucopenia. O número de hemácias e a taxa de hemoglobina não são sensivelmente alterados. A hemossedimentação igualmente é muito variável para se tomar como fator de diagnóstico, pois há casos com índices baixos e outros com índices elevados (Quadro III).

FONSECA *et alii*,²⁴ no entanto, encontraram sempre valores elevados para os eosinófilos, principalmente no início da doença.

O exame do quadro IV — provas da função hepática — indica uma freqüente elevação na reação de Kunkel (turvação do sulfato de zinco). De fato, a leitura espectrofotométrica acusou variações de 5,5 até 27,2 unid., quando o normal vai de 2 a 8 unidades. A reação de Maclagan (tur-

QUADRO IV
Provas da função hepática

Caso * N.º	Reação de Kunkel (Turv. sulf. zinco) normal: 2-8 unid.	Reação de Maclagan (Turv. Timol) Normal: 0-4,5 unid.	Reação de Hanger (Cefalina-colesterol) Normal: até (++)
3	20,2	2,3	...
4	5,5	1,3	++++
5	11,2	2,0	++
6	27,2	4,8	...
7	19,8	6,0	+++

* Casos n.º 1 e 2 não efetuadas.

vação do timol), no entanto, pouco se altera em relação ao normal, que vai de zero a 4,5 unidades. Realmente, a rigor, só o caso 7 apresentou a turvação do timol, elevada, ou seja, 6 unidades.

Embora estas provas de função hepática não se révelassem muito precisas, eram as únicas que podíamos efetuar no laboratório, no momento da descoberta dos casos de fasciolose. Assim mesmo, permitem supor que a maioria dos pacientes provavelmente apresentava uma hipergamaglobulinemia, pois apresentavam índices acima de 12,5 unidades.

A leitura das reações de Maclagan mostra índices patológicos apenas em dois casos (6 e 7) pois, segundo BALCELLS-GORINA¹⁹ a reação é positiva nos casos de

angiocolite e insuficiência hepática ou, ainda, na hepatite e cirrose com inflamação mesenquimal.

A observação da Fig. 5 (casos 4, 5, 6 e 7) indica-nos que a reação intradérmica, produzida por antígeno específico, feito com vermes adultos de *Fasciola hepatica*, é eficiente, pois a reação foi fortemente positiva nos quatro pacientes em que foi realizada.

A sintomatologia apresentada pelos pacientes não foi idêntica, o que por certo dificulta o diagnóstico médico. Mas, de uma maneira geral, podemos dizer que, com exceção de dois casos (6 e 7), todos os pacientes se queixam de enjôo após a ingestão de comidas gordas, sentem dor à palpação do hipocôndrio direito e do epigástrico; alguns, sentem tonturas e dor de ca-

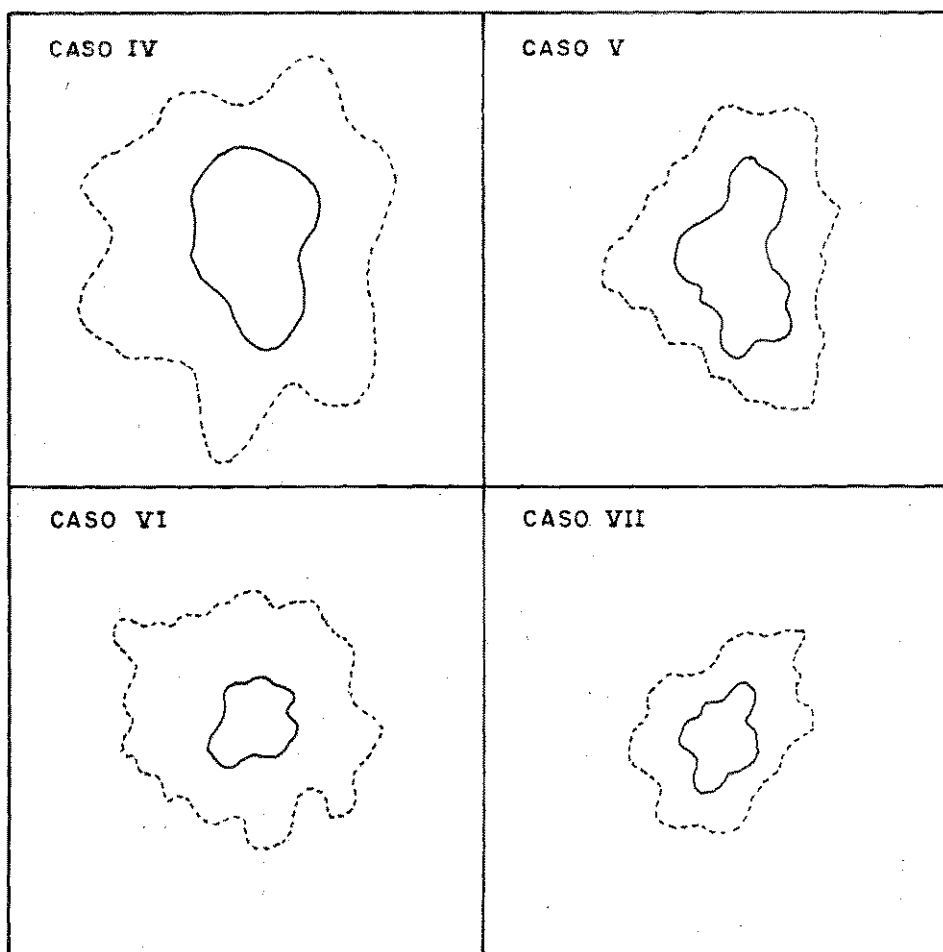


Fig. 5 — Intradermo-reação na Fasciolose hepática humana. Contornos inicial e final da pápula — leitura depois de 30 minutos da injeção intradérmica de 0,05 ml de antígeno.

beça (casos 4 e 5). Apenas um caso (5) apresentou febre no início da doença, segundo acreditamos, tendo sido tratada, na época, como se fôsse brucelose.

O número de casos por nós estudado ainda é, sem dúvida, insuficiente para conseguir elementos para um diagnóstico clínico mais preciso e uniforme; a falta destes dificulta a ação do médico que deverá, no entanto, em casos suspeitos, solicitar os exames necessários, ou seja, pesquisa de ovos da *Fasciola hepatica* nas fezes, na bile e, ainda, a reação intradérmica específica.

É necessário que as autoridades sanitárias tomem providências imediatas preventivas e de saneamento das zonas já infestadas. É preciso combater não só o caramujo transmissor da esquistossomose (*Biomphalaria tenagophila*) como também os caramujos transmissores das fasciolose, possivelmente a *Lymnaea sp.*³, ou a *Physa sp.*⁶, antes que ela se torne igualmente endêmica.

Meios de combate — São muitos, desde as medidas profiláticas ao tratamento dos doentes, ao confinamento das reses com distomatose, queima de pastos, interdição de culturas de agrião nas proximidades de pastos ou currais e, até combate aos caramujos por meio de lança-chamas ou moluscidas.

A escolha do moluscida varia de acôrdo com o tipo de foco (lagoa, represa, valeta de drenagem ou irrigação, córrego etc.) ou conforme os recursos de que se dispõe ou, ainda, levando em conta a preservação dos peixes e das próprias plantações^{25, 26}.

O BaCl₂ e o BaCO₃^{25, 27, 28}, têm a grande vantagem de ser eletivos pois, a 150 p.p.m e durante 48 h, eliminam totalmente da água apenas os caramujos. A fauna e a flora aquáticas são inteiramente preservadas. Modernamente surgiram dois moluscidas de grande eficiência e que atuam mesmo em doses baixíssimas: Bayluscid que, utilizado na dosagem de 1,0 p.p.m. durante 5/6 horas, elimina totalmente os caramujos^{26, 29}; Frescon, líquido, 16,5%, que pode ser empregado na dose 0,05 p.p.m., por 24 horas, eliminando 100% dos caramujos³⁰.

As medidas propostas são urgentes e inadiáveis a fim de se evitar o que aconteceu com a esquistossomose no Vale do Paraíba (PIZA³¹) onde as providências foram proteladas por se julgar que o caramujo *Austroorbis tenagophilus* (*Biomphalaria tena-*

gophila) não era o hospedeiro intermediário e, portanto, não haveria perigo de a doença se instalar no Estado ou expandir-se. Hoje, a esquistossomose é endêmica na região.

Para o combate à fasciolose, OLLERENSHAW³² recomenda o tratamento das áreas infestadas com moluscidas, para reduzir a contaminação dos pastos, além de trabalhos complementares de drenagem e armazenamento do capim nas temporadas mais susceptíveis.

Deve-se notar que, nas regiões onde os ratos são numerosos, a redução da taxa de infestação não deve ser esperada, pois os ratos também podem ser parasitados pela *Fasciola hepatica* do mesmo modo que os bois, carneiros e o próprio homem⁴.

O problema da fasciolose hepática no Brasil tem sido ignorado completamente pelas autoridades e olvidado inteiramente pelos médicos e veterinários; mas, a verdade é que a Distomatose hepática não é mais um problema exclusivamente econômico e veterinário mas também essencialmente humano, assumindo, portanto, real importância e requerendo adoção de medidas extraordinárias. O lado social e humano do problema assim o exige.

RESUMO

A elevada incidência da *Fasciola hepatica* em bovinos do Vale do Paraíba (10%) encontrada por Ildeo França, em 1967, despertou-nos a atenção para a possibilidade da ocorrência de casos humanos nesta região.

Assim, em poucos meses foi possível diagnosticar sete casos humanos de *Fasciola hepatica*, todos autóctones do Vale do Paraíba. Anteriormente, no Brasil, apenas um caso havia sido assinalado por Luis Rey em Mato Grosso (1958).

Os diagnósticos foram feitos através do encontro de ovos de *Fasciola hepatica* em exames de fezes e reforçados pelos exames da bile e pela reação intradérmica a antígenos específicos.

Todos os pacientes referem ter residido por alguns anos em fazendas da região onde freqüentemente comiam agrião (*Naturtium officinale*) e bebiam água de valetas ou regatos.

Êstes achados sugerem uma avaliação em maior escala para estimar a intensidade da disseminação da doença em nosso país, e evitar disseminação maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRUMPT, E. — Précis de parasitologie. 6. éd. Paris, Masson, 1949. v. 1, p. 1231.
2. MONIEZ, R. L. — Parasitologie animale et vegetale appliquée a la Medicine. Paris, Bailliere & Fils, 1896. p. 90-144.
3. LUTZ, A. — Sobre a ocorrência da *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. Bol. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) 1:9-13, 1921.
4. MAIA, C. — A propósito de 5 casos humanos de fasciolose hepática. Journ. Méd. 18(442): 49-66, 1951.
5. DAMIN, G. I. — *Fascioliasis*. In HARRISON. Principles of internal medicine. 4. ed. New York, Mac Graw, 1962. p. 1231.
6. REY, L. — *Fasciola hepatica* no gado, no Rio Grande do Sul. Investigações sobre a possibilidade de ocorrência de casos humanos. Rev. Brasil Malar. 9(4):473-483, 1957.
7. REY, L. et alii — Primeiro encontro de ovos de *Fasciola hepatica* em inquérito helmintológico de populações brasileiras (Campo Grande. Mato Grosso). Rev. Paul. Med. 53:60, 1958. Resumo.
8. FRANÇA, I. — Fasciolose hepática em bovinos no Vale do Paraíba, Est. de S. Paulo. Ocorrências. Incidência e distribuição geográfica. Apresentado ao 10.º Congresso Brasileiro de Veterinária. Goiânia, fevereiro, 1967.
9. BELDING, D. L. — Text book of clinical parasitology. 2. ed. New York, Appleton, 1952. p. 625-630.
10. GRAIG, C. F. & FAUST, E. C. — Clinical parasitology. 15. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1951. p. 501-507.
11. MALDONADO, J. F. — Helminthiasis del hombre en America. Barcelona, Edit. Cient. Méd., 1965.
12. LUTZ, A. — Estudios de Zoologia y Parasitologia Venezolanos. Caracas. Univ. Central de Venezuela, 1928. Reimpr. 1955.
13. BACIGALUPO, J. — Hallazgo en la ciudad de Buenos Aires de *Lymnaea viatrix*, d'orb infectada espontaneamente con cercarias de *Fasciola hepatica*, L. Rev. Soc. Argent. Biol. 8(7-8):511-558, 1932.
14. TAGLE, I. — Observaciones sobre la evolución de la *Fasciola hepatica*. Rev. Chil. Hist. Nat. 46(47):232-241, 1944.
15. AMATO Neto, V.; CAMPOS, R. & FERREIRA, C. S. — Diagnóstico das parasitoses intestinais pelo exame de fezes. 2. ed. São Paulo, Atheneu, 1963.
16. PESSOA, S. B. — Parasitologia médica. 6.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1963. p. 421-422.
17. PESSOA, S. B. — Endemias parasitárias da zona rural brasileira. São Paulo, Prociencx, 1963.
18. ASOCIACION NORTEAMERICANA DE ANALISTAS CLINICOS — Métodos seleccionados de analisis clinicos. Versión española de Vicente & Carlos V. Palasi. 2.ª ed. Madrid, Aguilar, 1961. v. 1.
19. BALCELLS-GORINA, A. — La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales. 5.ª ed. Rio de Janeiro, Marín, c1964.
20. CECIL, [R. L.] & LOEB, [R. S.] — Tratado de Medicina Interna. Versión española de Alberto Solichy. 11. ed. Mexico, Interamericana, c1964. v. 1.
21. RUIZ CASTANEDA, M. — Brucelosis. 2.ª ed. México, Prensa Médica Mexicana, c1954. p. 57-58.
22. COLEMAN INSTRUMENTS — Manual of clinical methods for the Coleman Junior spectrofotometer. 4. ed. Maywood, Ill., Coleman Instr., 1962.
23. PINTO, C. — Zoo-parasitos de interesse médico e veterinário. Rio de Janeiro, Pimenta de Mello, 1938. p. 294-347.
24. FONSECA, F.; MARQUES, M. & AZEVEDO, I. F. — Eosinofilia e fasciolose hepática. O Médico 192/93: 447-452 e 467-473, 1955.
25. SANTOS, L. & SCHMIDT, N. — O carbonato de bário como planorbicida. Experiências de campo. Ciênc. Cult. 17(3): 375-376, 1965.
26. SANTOS, L.; SCHMIDT, N. & PEREIRA, M. I. — Experiências de campo com

SANTOS, L. & VIEIRA, T. F. — Considerações sobre os sete primeiros casos de fasciolose humana encontrados no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:95-109, 1965/67.

- o Bayluscid no combate aos planorbídeos do Vale do Paraíba (*A. tenagophilus*). Ciênc. Cult. 17(3): 378, 1965.
27. SANTOS, L.; BRANDÃO, C. S. H. & CALAZANS, S. C. — Observações sobre o emprego do cloreto de bário como planorbicida. I. A. L. — Boletim do Instituto Adolfo Lutz (S. Paulo) 2 (1):32-36, 1962.
28. SANTOS, L. — Observações sobre o emprego do carbonato de bário como planorbicida. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:33-37, 1964.
29. SANTOS, L. — Observações sobre o Bayluscid no combate aos planorbídeos do Vale do Paraíba. Ciênc. Cult. 17 (3): 377, 1965.
30. CROSSLAND, N. O. — Field trials to evaluate the effectiveness of the molluscicide N-tritylmorpholine (WL 8008) in irrigation systems. Sittingbourne, Engl., Shell Research, [1966?]. Mimeografado.
31. PIZA, J. T. — A esquistossomose em São Paulo. O que nos ensina a experiência de seis anos de trabalhos de campo. Contribuição para o Simpósio sobre Esquistossomose, promovido pela Associação Médica Brasileira, realizado em São Paulo, maio, 1965.
32. OLLERENSHAW, C. B. — The control of fascioliasis — The need for a planned approach. Outl. Agric. 3(6):278-281, 1962.

Recebido para publicação em 12 abril de 1967.

INQUÉRITO SOROLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSES ENTRE CORTADORES DE CANA DE AÇÚCAR DE ALGUNS MUNICÍPIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO (1)

LEPTOSPIROSIS AMONG SUGARCANE CUTTERS IN SÃO PAULO, BRAZIL: SEROLOGICAL INVESTIGATION

SABURÔ HYAKUTAKE (2)
MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA (2)
VAIL NATALE (2)
MOACYR DA COSTA COUTO (3)
ROMEU MAZZARI (4)
ANINOEL PACHECO (5)

SUMMARY

A serological investigation was made among sugar cane workers, to detect the possible occurrence of leptospirosis, disease considered in other Countries (Austrália) as related with the diseases caused by the conditions of work. The diagnostic method employed was the serumagglutination in carved China plates with formoled antigen; the antigens were obtained from 20 different serotypes of leptospiras.

It was examined 210 samples of serum from workers of the district of Piracicaba, 114 samples from Cosmópolis, 36 from Araraquara and 76 from Lins, with a total of 436 samples; there were four positive cases in the tests of serum-agglutination: one for *Leptospira andamana* with the title 1/400; one for *L. ictero-haemorrhagiae* with the title 1/800; one positive for *L. pyrogenes* and *L. saakoebing*, with the title of 1/400 and one positive for *L. djasiman* at 1/600 and for *L. javanica* at the title of 1/800.

In spite of the hard summer during which the investigation was carried out, the low incidence of leptospirosis as indicated, less than 1% of samples examined permits to affirm that there is no correlation of this occurrence of leptospirosis and the characteristic disease related with professional activity.

INTRODUÇÃO

De acôrdo com ALSTON & BROOM¹ 1933 e 1934, em North Queensland, Austrália, ocorreram surtos epidêmicos de uma doença infecciosa com os característicos clínicos semelhantes aos da clássica leptospirose ictero-hemorrágica ou Moléstia de Weil, com sintomas de menor intensidade e de menor gravidade; a doença incidiu em lavradores de cana de açúcar, pois na referida

região predominava quase que com exclusividade a cultura dêsse vegetal. Cotters e Sawers em 1934 isolaram amostras de leptospiras de tais pacientes, bem como de ratos capturados nas plantações de cana de açúcar; Lumley em 1937 por meio do estudo sorológico de tais amostras concluiu que dois novos sorotipos de leptospiras se constituíam nos agentes etiológicos das leptospi-

(1) Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz.
(2) Da Secção de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.
(3) Da Usina Açucareira Ester S/A — Cosmópolis.
(4) Da Refinaria Paulista S/A — Usina Monte Alegre — Piracicaba.
(5) Da Usina Piracicaba (Sucreries Brésiliennes) — Piracicaba.

roses que acometiam, de preferência, os lavradores de cana de açúcar, a saber: *L. australis* A e *L. australis* B. Esta última foi posteriormente identificada à *L. pyrogenes*, enquanto a primeira passou a se denominar simplesmente *L. australis*.

Em 1950, Johnson efetuou revisão sobre as leptospiroses observadas na Austrália, verificando-se que de 47 casos atribuídos à *L. pyrogenes*, 38 eram lavradores de cana de açúcar, sendo os 9 restantes, lavradores dedicados a outras culturas; em 9 casos atribuídos à *L. australis*, 6 eram lavradores de cana de açúcar, sendo os demais lavradores dedicados a outras atividades.

Em Queensland do Norte, Derrick em 1956 relatou os resultados de 219 casos de leptospiroses ocorridos de 1951 a 1954, entre os quais 120 pacientes eram lavradores de cana de açúcar; em 58 casos o agente etiológico era a *L. pyrogenes*, cabendo 48 casos à *L. australis*.

Doherty examinou 52 roedores capturados nas plantações de cana de açúcar, encontrando soro-aglutinação positiva para *L. australis* em 11 de 16 espécimens de *R. conatus*, dos quais 9 exemplares eliminavam leptospiroses pela urina. A *L. pyrogenes* é transmitida por vários roedores principalmente pelo *R. rattus*.

A relação entre intensidade de precipitação das chuvas e incidência das leptospiroses foi patenteada à evidência nas pesquisas de Doherty, Derrick e outros, demonstrando-se inclusive que as leptospiroses, eliminadas pelos roedores — que pululam nas lavouras de cana de açúcar — através da urina, podem sobreviver no solo. Os cortadores de cana de açúcar apresentam numerosas soluções de continuidade nas mãos, braços, pernas e pés, através das quais as leptospiroses podem penetrar facilmente.

Na Austrália, o solo das plantações é lamacento, cortado por numerosos canais que conduzem água, onde muitos lavradores se infectam durante o transplante da cana, na drenagem dos canais e na extirpação das plantas parasitas. O corte da cana de açúcar se inicia em maio, prolongando-se até dezembro, e nessa tarefa se engajam imigrantes, em sua maioria italianos.

O governo australiano conta com inspetores sanitários que controlam as plantações de cana de açúcar para, dentre ou-

tros intuitos, ajuizar da população murina; se houver abundância de roedores, dá-se ordem para que a plantação seja incendiada antes do corte, com os devidos cuidados, sendo então possível, queimando apenas as folhas, destruir ou afastar os roedores e eliminar, através do calor, as leptospiroses presentes.

As leptospiroses das plantações da cana de açúcar apresentam como regra uma evolução benigna com escassa mortalidade; o gênero de trabalho executado facilita a ocorrência de pequenas lesões cutâneas que servem de porta de entrada às leptospiroses. Existe pois nexa causal entre o tipo de trabalho executado e a doença contraída, caracterizando-se assim a leptospirose dos lavradores da cana de açúcar como moléstia profissional, a exemplo do que ocorre com a leptospirose dos lavradores de arroz, com as leptospiroses dos trabalhadores de esgoto, dos mineiros de carvão, veterinários etc.

Dentro da mesma problemática e para exemplificar, na Itália a leptospirose ou febre dos arrozais se constitui em sério problema social econômico, pois em um total de 100 000 lavradores a morbidade média anual é de 10 000 casos, segundo dados de BABUDIERI² (1961), o qual informa que a perda causada por cada caso grave de leptospirose é da ordem de 175 000 liras.

Em 1954, CORRÊA *et alii*³ efetuaram inquérito sorológico entre lavradores de arrozais do vale do Paraíba, examinando amostras de soro de 208 lavradores, quando então encontraram dois casos com soro-aglutinação positiva para *L. canicola* e outro positivo para *L. pyrogenes*. Concluíram pela não existência da leptospirose ou febre dos arrozais como moléstia profissional entre os lavradores da região onde foi efetuado o inquérito.

Com o intuito de investigar a possível ocorrência de leptospiroses entre cortadores de cana de açúcar, efetuamos um inquérito sorológico de cujos resultados damos contas, a seguir.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtivemos amostras de sangue de cortadores de cana de açúcar de vários municípios do Estado de São Paulo, escolhidos dentre os que se dedicam com maior inten-

sidade ao cultivo daquele vegetal, a saber os municípios de Piracicaba, Cosmópolis, Araraquara e Lins. As amostras de sangue retiradas por punção venosa eram colocadas em tubos esterilizados convenientemente identificados, e enviados à Secção de Parasitologia do Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz, onde o sôro era separado após centrifugação. Com os soros assim obtidos foram efetuadas reações de aglutinação em placa de porcelana escavada, com antígenos formolados, sendo as leituras realizadas em campo escuro, após duas horas de permanência em estufa a 30°C, sendo o título mínimo diagnóstico o de 1/200.

No quadro seguinte discriminamos os sorotipos utilizados pela Secção de Parasitologia neste inquérito:

SOROTIPO	Amostra padrão
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	RG A
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	M 20
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	N 3294
<i>L. grippotyphosa</i>	Moskva V
<i>L. canicola</i>	Hond Utrecht IV
<i>L. pomona</i>	Pomona
<i>L. australis</i>	Ballico
<i>L. bataviae</i>	Swart
<i>L. sejrøe</i>	M 84
<i>L. pyrogenes</i>	Salinem
<i>L. hyos</i>	Mitis Johnson
<i>L. saxkoebing</i>	Mus 24
<i>L. andamana</i>	C H 11
<i>L. autumnalis</i>	Akiyami A
<i>L. djasiman</i>	Djasiman
<i>L. sentot</i>	Sentot
<i>L. wolffii</i>	3705
<i>L. javanica</i>	Veldrat Batavia 46
<i>L. hebdomadis</i>	Pasteur

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Foram examinadas 210 amostras de sôro de trabalhadores do município de Piracicaba, 114 amostras do município de Cosmópolis, 36 do município de Araraquara e 76 do município de Lins, perfazendo o total de 436 amostras. Foram encontrados quatro

casos de sôro-aglutinação positiva, a saber: um para *L. andamana* ao título de 1/400, e outro positivo a 1/1600 para *L. djasiman* e a 1/800 para *L. javanica*, provenientes de Piracicaba; um para *L. ictero-haemorrhagiae* ao título de 1/800, proveniente de Araraquara e um positivo para *L. pyrogenes* e *L. saxkoebing*, ao título de 1/400, proveniente de Cosmópolis.

O inquérito sorológico foi efetuado em sua maior parte no decurso de uma estiagem excepcional de há muito não registrada (1964) que certamente concorreu para um índice tão baixo de incidência de leptospiroses, inferior a 1% das amostras examinadas. Tal índice autoriza a negar, na amostra examinada, de cortadores de cana de açúcar, a ocorrência de leptospirose com características de doença correlacionada à atividade profissional.

RESUMO

Os autores efetuaram um inquérito sorológico entre lavradores que trabalham no corte de cana de açúcar visando a pesquisar a possível ocorrência de leptospiroses, doenças que ocorrem em outros países como a Austrália por exemplo, com características de doenças relacionadas às condições do trabalho. Como método diagnóstico foi utilizada a sôro-aglutinação com antígeno formolado, em placas de porcelana escavadas, empregando-se como antígenos 20 sorotipos diferentes de leptospiras.

Foram examinadas 210 amostras de sôro de trabalhadores do município de Piracicaba, 114 amostras do município de Cosmópolis, 36 do município de Araraquara e 76 do município de Lins, perfazendo o total de 436 amostras; foram encontrados quatro casos de sôro-aglutinação positiva: um para *Leptospira andamana* ao título de 1/400, um para *L. icterohaemorrhagiae* ao título de 1/800, um positivo para *L. pyrogenes* e *L. saxkoebing*, ao título de 1/400 e um positivo para *L. djasiman* a 1/1600 e para *L. javanica* a 1/800.

A baixa incidência de leptospiroses assinalada, inferior a 1% das amostras examinadas, embora o inquérito tenha sido efetuado no decurso de estiagem excepcional (1964), autoriza a negar, na amostra exa-

HYAKUTAKE, S.; CORRÊA, M. O. A.; NATALE, V.; COUTO, M. C.; MAZZARI, R.; PACHECO, A. — Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre os cortadores de cana de açúcar de alguns municípios do Estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:111-114, 1965/67.

minada de cortadores de cana de açúcar, a ocorrência de leptospiroses com características de doenças correlacionadas à atividade profissional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALSTON, J. M. & BROOM, J. C. — Leptospirosis in man and animals. Edinburgh, Livingstone, 1958.

2. BADUDIERI, B. — Le leptospirosi quali malattie professionali degli agricoltori. Estratto dal volume degli atti delle "Tredicesime giornate mediche triestine", 1960.

3. CORRÊA, M. O. A.; AMATO Netto, V.; VERONESI, R.; BRANDÃO, C. H. — Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre lavradores de arrozais do Vale do Paraíba. Rev. Inst. Adolfo Lutz 14(1):33-38, 1954.

Recebido para publicação em 14 de abril de 1967.

DETERMINATION OF PANTOTHENATE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS (1)

DETERMINAÇÃO DE PANTOTENATO DE CÁLCIO EM MEDICAMENTOS

WALDOMIRO PREGNOLATTO (2)

IONE IRULEGUI (2)

RESUMO

Descrevemos neste trabalho um método simples para a dosagem de pantotenato de cálcio, sódio ou ácido pantotênico em preparados farmacêuticos.

Utilizamos a propriedade que têm os compostos acima de formarem, na hidrólise ácida, beta-alanina, que é então cromatografada em papel circular. O cromatograma é revelado com ninhidrina e o composto formado é eluído e determinado espectrofotometricamente a 520 μ , como preconizado por Giri, Radhakrishnam & Vaidyanathan.

Estabelecemos as condições ideais de hidrólise, a possibilidade de interferência de aminoácidos presentes em preparados farmacêuticos e a concentração ideal de trabalho. Fizemos, também, testes de recuperação.

INTRODUCTION

One of the products of the acid hydrolysis of calcium pantothenate is beta-alanine. Most of the literature published on calcium pantothenate analysis involves purification of the compound by means of column chromatography followed by hydrolysis and determination of beta-alanine. SCHMALL & WOLLISH¹ separated calcium pantothenate followed by alkaline hydrolysis. YAMAGISHI & YOSHIDA² determined pantothenates after purification by means of paper chromatography and acid hydrolysis, with ninhydrin. RODRIGUES & SILVA³ separated the vitamins from complex B, by descendent chromatography and detected each component by specific reactions. They studied a few solvents and found that 80% ethanol gave the best separation. They did not attempt, though, a quantitative determination. SICHE & KAKAK⁴ described a method for the determination of pantothenates using paper chromatography. Both

authors condensed the butyrolactone formed by acid hydrolysis of pantothenate with hydroxylamine and separated the resulting hydroxamic acid by paper chromatography. Detection of this compound was achieved with FeCl₃. Nevertheless this method involves too many steps to be suitable for routine laboratory work. HUBBARD *et alii*⁵ described a method for the determination of calcium pantothenate in pharmaceutical preparations, which is a modification of ZAPPALA & SIMPSON⁶'s method. Column chromatography which was used for the separation of pantothenate from other components of the B complex is a somewhat painful process and also not suitable for daily routine.

Our finality is to render the determination of pantothenic acid and its salts in pharmaceutical preparations a simple method, which may be used in the daily routine of our laboratory. We find it simpler

(1) Trabalho realizado na Seção de Química Biológica e Espectrografia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

to make the hydrolysis first and purify the resulting beta-alanine by paper chromatography.

Pharmaceutical preparations may deteriorate on storage and its pantothenate may be decomposed producing beta-alanine. To avoid any errors in the determination of the pantothenate actually present, an aqueous extract of sample not hydrolysed must be chromatographed simultaneously to verify the possible presence of any beta-alanine resulting from decomposition of pantothenate on storage. The method involves:

- 1) Acid hydrolysis of the mixture containing pantothenate.
- 2) Separation of the beta-alanine formed by circular paper chromatography.
- 3) Reaction of beta-alanine with ninhydrin.
- 4) Elution and spectrophotometric determination of the compound formed.

METHOD

Reagents

- a) D-calcium pantothenate — E. Merck AG.
- b) Trichloroacetic acid solution — 10% aqueous solution.
- c) Ethanol 80% v/v.
- d) Ninhydrin solution — 0,4% p/v ninhydrin in acetone 95% (aqueous v/v).
- e) Copper sulphate solution — 0,02% aqueous p/v solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- f) Copper sulphate solution — 0,005% p/v dilute solution e 1:4 with absolute ethanol (prepare daily).

Determination

a) *Hydrolysis* — Transfer to separate 10 ml glass stoppered flasks a quantity of samples containing 3-10 mg of calcium or sodium pantothenate and approximately the same quantity of pantothenate standard. Add 0,5 ml of 10% trichloroacetic acid solution per mg of pantothenate.

Stopper the flasks and let them stay at the temperature of 90°C, in an oven. Release the pressure within the flasks a few times, at the beginning of the heating. After heating for at least 12 hours, take the mixtures from the oven, allow them to cool and transfer them quantitatively into 10 ml volumetric flasks, filtering if necessary.

b) *Chromatography* — Circular chromatography is done on Whatman paper n. 1, 40 x 40 cm. Transfer to the paper, with micro-pipets, quantities of hydrolysed sample and standard containing 3.5-11 micrograms of beta-alanine, corresponding to approximately 10-30 micrograms of calcium pantothenate. Transfer to the same chromatographic paper an equivalent amount of non hydrolysed sample. Develop the chromatogram with 80% ethanol, let it dry and soak it by means of a brush, with 0,4% ninhydrin. Heat the chromatogram in an oven at exactly 65°C for 30 minutes. Elute the stain formed (Rf 0,77-0,83) with 4 ml of 0,005% copper sulfate solution, letting the eluent in contact with the paper, for 30 minutes. Filter and read in spectrophotometer at 520 milimicra, setting the 100% transmittance, with the eluent solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Beer's law is followed over a suitable working range for analysis of pharmaceutical preparations. It is advisable not to use a standard curve though, but to run simultaneously a standard treated as for the samples, due to the small variations on the intensity of the color resulting from variations of the heating temperature after spraying with ninhydrin.

Ten per cent trichloroacetic acid was satisfactory for hydrolysis. Beta-alanine was completely decomposed by a final solution of 3 N HCl, after heating for 30 minutes in an oven at 90°C.

From all the solvents studied for the development of the chromatogram, 80% ethanol gives the best results. We tried also butyl alcohol-acetic acid-water (4:1:1); 40% fenol; sec. butyl alcohol-88% formic acid-water (75:15:10); water saturated butyl alcohol.

Pharmaceutical preparations containing methionine, besides pantothenate, may be analysed for this amino-acid by the same method.

The method described in this report measures total pantothenate (d and l forms).

Recovering tests were made, by adding a known amount of standard to pharmaceutical preparations which did not contain pantothenic acid in any form. Volumes of the hydrolysates theoretically containing 11 micrograms of pantothenate were chromatographed. The results obtained from these tests are given in the table below:

Type of sample	Amount of standard (recovered — mcg)	Recovery %
Trivitamin injection	11,1	101
Liver injection	11,9	108
Liver tablet	12,0	109
Vitamin and mineral elixir	9,9	90
Multivitamin elixir	11,0	100
Average	11,2 ± 0,76	102 ±

The figures given represent an average of at least two determinations. The method described in this report is being used in our laboratory routine work for the last five months.

SUMMARY

A simple method for the determination of calcium or sodium pantothenate and pantothenic acid in pharmaceutical preparations is presented. The property of the mentioned compounds of forming beta-alanine by a acid hydrolysis is used. The beta-alanine formed is purified by paper chromatography and detected with ninhydrin. The stain is eluted and the absorbance measured accord-

ing to Giri, Radhakrishnam & Vaidyamathan. Hydrolysis conditions were studied as well as the possible interference of other amino-acid which may be present. Several kinds of solvent for development of the chromatogram were also studied.

REFERENCES

1. SCHMALL, M. & WOLLISH, E. G. — Determination of panthenol and pantothenates in multivitamin preparations. Anal. Chem. 29:1509-513, 1957.
2. YAMAGISHI, M. & YOSHIDA, T. — Ninhydrin reaction. IV. Determination of pantothenic acid. J. Pharm. Soc. Japan 74:1001-4, 1954. Resumo in Chem. Abstr. 49:1488a, 1955.
3. RODRIGUES, L. D. & SILVA, J. A. — Separation and identification in pharmaceutical products of the principal vitamins of the B complex with chromatographic paper. Rev. Port. Farm. 5:75-88, 1955. Resumo in Chem. Abstr. 50:1264d, 1956.
4. SICHO, V. & KAKAO, B. — Estimation of pantothenic acid by means of paper chromatography. Casopis Lékaru Ceskych. 92:1372-3, 1953. Resumo in: Chem. Abstr. 51:18084i, 1957.
5. HUBBARD, W. D. *et alii* — Chemical Determination of calcium pantothenate. J. Ass. Off. Agric. Chem. 48:1217-20, 1965.
6. ZAPPALA, A. F. & SIMPSON, C. A. — Sensitive colorimetric method for the determination of panthenol in multivitamin preparation. J. Pharm. Sci. 50:845, 1961.
7. GIRI, K. V.; RADHAKRISHNAN, A. N. & VAIDYANATHAN, C. S. — Some factors influencing the quantitative determination of amino acids separated by circular paper chromatography. Anal. Chem. 24:1677-678, 1952.

Recebido para publicação em 26 de maio de 1967.



PROTEÇÃO *IN VITRO* CONFERIDA PELA GAMA-GLOBULINA (1) CONTRA O VIRUS DO SARAMPO

PROTECTION "*IN VITRO*" BY GAMMA GLOBULIN AGAINST THE MEASLES VIRUS

ADELA ROTH (2)
MARTHA IRENA MALACHOWSKA (2)
LUÍS FLORÊNCIO DE SALLES GOMES (2)
CLÉLIA H. O. MARTINEZ (2)

SUMMARY

The gamma globulin obtained from the ISA Laboratory was tested on continuous line of human kidney cells. In experimental conditions the gamma globulin showed a significant protection against measles virus, when used in doses of 0,1 mg per ml, and total protection with 0,2 or 0,3 mg per ml.

INTRODUÇÃO

A gama-globulina tem sido usada^{1, 2, 3, 5, 6, 7} como arma preventiva ou terapêutica em numerosas infecções virais. Particularmente no sarampo, é aconselhável seu uso conjuntamente com a vacinação, tendo em vista amenizar a infecção causada pelo vírus vacinante e suas complicações.

Este trabalho teve como finalidade verificar, em culturas celulares, se a gama-globulina nacional⁽³⁾ oferece proteção contra o vírus de sarampo.

MATERIAL E MÉTODOS

A gama-globulina foi fornecida em forma liofilizada (partida de 15-20/66) em frascos contendo 250 mg de substância. O material foi mantido em temperatura ambiente até a hora de usar.

Células — Foram escolhidas células de rim humano (RH), linhagem contínua, mantidas no laboratório de cultura de tecidos da Seção de Vírus deste Instituto.

Meios — Para o crescimento das células foi usado o meio de Hanks com 20% de soro de vitelo e como meio de manutenção, o de Hanks com 5% de soro de vitelo.

Vírus — Usou-se o vírus sarampo, amostra Edmonston, após 25 passagens nas células RH. O vírus foi titulado em diluições logarítmicas começando da diluição 10^{-1} , usando-se 4 tubos de células para cada diluição; a temperatura de incubação foi a de 35°C e a leitura final foi feita após 6-7 dias. O cálculo do TCD_{50%} foi feito segundo método de REED & MUENCH⁴ e foi igual a $10^{-3,48}$.

Procedimento

A gama-globulina foi dissolvida em meio de manutenção num volume tal cuja concentração final correspondesse a 1 mg/ml. Procedemos à verificação de sua ação de três maneiras diversas: a) inoculamos conjuntamente o vírus mais a gama-globulina nas células, após 1 hora de contacto a 4°C; b) adicionamos gama-globulina às células e, após 24 horas, inoculamos o vírus; c) ino-

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

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Fornecida pelo Laboratório ISA (S. Paulo).

culamos o vírus nas células e, após 3 horas, adicionamos gama-globulina.

Nestes procedimentos foram utilizados seis tubos de culturas celulares para cada uma das diferentes quantidades de gama-globulina combinadas com as diversas doses de vírus utilizados. As quantidades de gama-globulina foram: 0,1; 0,2 e 0,3 mg e as doses de vírus, 30; 100 e 300 TCD 50% .

Todos os tubos foram incubados a 35°C e observados diariamente. A leitura final foi feita aos 6-7 dias de incubação, isto é, quando os controles dos vírus demonstravam 75% ou mais de células lesadas pelo ECP (++++ a +++++).

Além dos controles de células e das unidades de vírus usadas, foi controlada a gama-globulina isoladamente nas concentrações usadas, para testar uma eventual ação tóxica.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Observamos que a gama-globulina adicionada 3 horas após a inoculação do vírus não conferiu qualquer proteção às células contra a ação do vírus. A gama-globulina inoculada juntamente com o vírus, após 1 hora de contato a 4°C, ou quando adicionada às células 24 horas antes da inoculação do vírus, comportou-se da mesma maneira, isto é, conferiu uma proteção visível e da mesma intensidade, segundo o demonstra a tabela:

Percentagem de proteção das células pela gama globulina *

Quantidade de gama globulina mg	Unidades de vírus. TDC 50%		
	30	100	300
0,1	75	75	50
0,2	100	100	100
0,3	100	100	100

* Cálculo feito com média de 6 tubos.

Considerando-se 50% ou mais de proteção como dado significativo, podemos concluir que a gama-globulina usada protege significativamente as células dentro das con-

dições experimentais, quando usada nas dosagens de 0,1; 0,2 e 0,3 mg, sendo que 0,2 mg foi a menor quantidade de gama-globulina que deu proteção total às células, mesmo na presença de 300 TCD 50% de vírus de sarampo.

Em experiências preliminares observamos que 0,05 mg de gama-globulina não proporcionou proteção significativa contra a menor dose do vírus usada; por outro lado, foi também observado que 0,4 mg de gama-globulina já acarretava algum efeito tóxico para as células, enquanto que 0,5 mg da substância apresentou efeito tóxico apreciável.

Estes resultados sugerem que a gama-globulina usada protege as culturas celulares de rim humano contra a ação de vírus do sarampo. O mecanismo da proteção, segundo sugestões de vários autores^{1, 2, 3, 7}, deve correr por conta de uma reação antígeno-anticorpo de neutralização que se processa durante o período de incubação ou, ainda, pelo bloqueio dos receptores celulares, pela gama-globulina⁶, quando adicionada às células anteriormente à inoculação do vírus.

RESUMO

A gama-globulina fornecida por um laboratório nacional experimental em culturas celulares de linhagem contínua de rim humano conferiu proteção apreciável contra a ação do vírus do sarampo, em doses de 0,1 mg/ml, e proteção total em doses de 0,2 ou 0,3 mg/ml.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GROSS, P. A. M.; GITLIN, D. & JANEWAY, C. A. — The gamma globulins and their clinical significance. IV. Therapeutic uses of gamma globulins. *New Eng. J. Med.* 260:170-178, 1959.
2. KEMPE, C. H.; BERGE, T. O. & ENGLAND, B. — Hyperimmune vaccinal gamma globulin. Source, evaluation and use in prophylaxis and therapy. *Pediatrics*, N. Y. 18:177-187, 1956.
3. KRUGMAN, S. *et alii* — Infectious hepatitis. Studies on the effect of gamma globulin and on the incidence of inapparent infection. *J. Am. Med. Ass.* 174:823-830, 1960.

ROTH, A.; MALACHOWSKA, M. I.; SALLES GOMES, L. F.; MARTINEZ, C. H. — Proteção "in vitro" conferida pela gama-globulina contra o vírus do sarampo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:119-121, 1965/67.

4. REED, L. J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent end points. Amer. J. Hyg. 27:493-497, 1938.
5. RHODES, A. J. & Van ROOYEN, C. E. — Textbook of virology for students and practitioners of medicine. 4th. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1962.
6. STOKES, J., Jr., *et alii* — Length of protection by immune serum globulin (gamma globulin) during epidemics. J. Am. Med. Ass. 147:714-719, 1951.
7. STOKES, J., Jr. — Immunisation in viral hepatitis. J. Am. Med. Ass. 172:652-655, 1960.

Recebido para publicação em 29 de junho de 1967