



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA
do
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN 0073 - 9855

RIAL6

VOLUME 41

NÚMERO 2

DEZEMBRO, 1981



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
SÃO PAULO, SP - BRASIL

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

REDATOR RESPONSÁVEL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

COMISSÃO DE REDAÇÃO

MARCELO OSWALDO ÁLVARES CORRÊA, *Presidente*

ELZA SCHWARZ GASTALDO BADOLATO

LUIS FLORENCIO DE SALLES GOMES

MYRNA SABINO

NEUS PASCUET PREGNOLATTO

ODAIR ZENEBO

PEDRO PAULO CHIEFFI

ROBERTO A. PINTO PAES

MERCEDES DELLA FUENTE, *Secretário*

REDATOR-SECRETÁRIO

DEBORA DOMINGUES ESTRELLA REBOCHO

Endereço/*address*

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 — Caixa Postal 7027
01000 — São Paulo, SP — Brasil
Endereço telegráfico: IALUTZ

Publicação semestral/*Bi-annual publication*
Solicita-se permuta/*Exchange desired*

(*)

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (Secretaria de Estado
da Saúde) São Paulo, SP — Brasil, 1941 —

1941-1980, 1-40

1981, 41 (1, 2)

ISSN 0073-9855

CDD₁₈ 614.07205

RIALA6



(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas.* São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, Tropical Diseases Bulletin e Virology Abstracts.

REVISTA
DO
INSTITUTO
ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6

Rev. Inst. Adolfo Lutz, 41(2):75-150, dez. 1981

SUMARIO/CONTENTS

- 527 Verificação da interferência de carbonato de cálcio na dosagem de iodo em sal refinado
Iodine levels of samples of refined cooking salt collected in groceries of São Paulo City, Brazil
Neusa Vitória Valério SILVEIRA & Clementina AMATO 75-78
- 528 Contagem de filamentos micelianos pelo método de Howard em sucos de tomate, maracujá, caju e uva
Mycelia filaments count by Howard's method in juices of tomato, passion-fruit, cashew and grape
Claydes de Quadros ZAMBONI; Maria Izilda Esteves BARION & Nazareth SPITERI 78-82
- 529 Aflatoxina B₁ em feijão
Aflatoxin B₁ in bean
Myrna SABINO & Maria José S. CORRÊA 83-87
- 530 Importância de *Rattus norvegicus* capturados no Município de São Paulo, SP, Brasil, como hospedeiros paratênicos de *Toxocara canis* (Ascaroidea, Nematoda)
Public health importance of Rattus norvegicus as paratenic host to Toxocara canis (Ascaroidea, Nematoda) in São Paulo county, SP, Brazil
Pedro Paulo CHIEFFI; Vânia Martins Fontes DEL GUERCIO; Mirthes UEDA & Lilian Barros de MELLO 89-91
- 531 Estado imunológico na leptospirose
Immunologic study of patients with leptospirosis
Everaldo COSTA; Ivo Coelho SILVA; Genaro MIRANDA FILHO; Valteci Valverde da SILVA; Eulódio Moreira CALDAS; Edilson BRITO & Marilena B. SAMPAIO 93-100
- 532 Parasitas do gênero *Eimeria* (Coccidia, Eimeriidae), *E. separata* e *E. nieschulzi*, em *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil
The occurrence of Eimeria parasites (Coccidia, Eimeriidae) in Rattus norvegicus captured in São Paulo county, SP, Brazil
Rosa Maria D. Souza DIAS; Pedro Paulo CHIEFFI; Domingas Maria A. Grispino Vieira TORRES & Ana Célia S. MANGINI 101-105

533	<i>Herpesvirus hominis</i> : estado atual da freqüência dos anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil <i>Present status of the frequency of antibodies against Herpesvirus hominis in inhabitants of São Paulo City, Brazil</i> Luís F. de SALLES-GOMES; Mary Eixo SAKUMA & Suely Pires CURTI	107-114
534	Lesões viscerais em dois casos fatais conseqüentes ao manuseio de agrotóxicos <i>Visceral lesions in two fatal cases occurring in farm workers handling pesticides</i> Evandro Pimenta de CAMPOS; Leonel COSTACURTA; Ruggero Bernardo Guidugli FELICE; Roberto A. Pinto PAES & Conceição Gonçalves Caldeira CURY	115-120
535	Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para <i>Paracoccidiodie brasiliensis</i> dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença <i>Class IgG, IgM and IgA antibodies specific for Paracoccidiodis brasiliensis titrated through indirect immuno-fluorescence in the serum of 18 patients and their relationship to clinical form and duration of disease manifestations</i> Sônia França Corrêa BARBOSA; Augusta Kiyomi TAKEDA; Jorge CHACHA; Luiz Carlos CUCE & Celeste FAVA NETTO	121-126
536	Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva <i>Immunodiagnosis of human leptospirosis. 1. Polysaccharide antigen for passive hemagglutination test</i> Márcy Alves RIBEIRO; Massami KAWARABAYASHI & Augusta Kiyomi TAKEDA	127-133
537	Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta <i>Immunodiagnosis of human leptospirosis. 2. Comparative study of microscopic agglutination, passive hemagglutination and indirect immunofluorescence tests</i> Márcy Alves RIBEIRO; Massami KAWARABAYASHI; Lúcia Kaoru YAMADA; Augusta Kiyomi TAKEDA & Marcelo Oswaldo Álvares CORREIA	135-143
	ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX	145-146
	ÍNDICE DE ASSUNTO	147-148
	SUBJECT INDEX	149-150

VERIFICAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE CARBONATO DE CÁLCIO NA DOSAGEM DE IODO EM SAL REFINADO *

Neusa Vitória Valério SILVEIRA **
Clementina AMATO **

RIALA6/527

SILVEIRA, N.V.V. & AMATO, C. — Verificação da interferência de carbonato de cálcio na dosagem de iodo em sal refinado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2): 75-78, 1981.

RESUMO: Foi determinado o teor de iodo em 52 amostras de sal refinado exposto à venda no comércio da cidade de São Paulo, coletadas pela fiscalização da Divisão de Alimentação Pública da Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo. Observou-se que a maioria das amostras não apresentava o teor de iodo exigido pela legislação brasileira pertinente, que é de 10 mg por 1000 g de sal refinado. Foi verificado que o antiemectante CaCO_3 não interfere significativamente na dosagem do iodo.

DESCRITORES: carbonato de cálcio, interferência na dosagem de iodo em sal refinado; sal refinado, determinação de iodo; sal refinado, legislação brasileira.

INTRODUÇÃO

Estudos efetuados por François Cordet, em 1820, comprovaram a ação curativa do iodo no tratamento do bócio. Posteriormente, KIMBALL¹⁰, em 1916, e MARINE¹¹, em 1917, confirmaram a importância do iodo na cura da mesma moléstia.

Com base nesses estudos, em vários países, por iniciativa das autoridades sanitárias, foi administrado iodo às populações carentes, através de comprimidos, soluções, água potável, óleo, sal, etc., tendo sido escolhido este último elemento por ser o veículo ideal para a distribuição homogênea entre a população².

A preocupação das autoridades brasileiras tem sido a de criar mecanismos legais que obriguem os produtores de sal destinado ao consumo humano a adicionarem iodo ao mesmo, e meios de controle para fiscalizar o cumprimento destes dispositivos.

O Conselho Deliberativo do Instituto Brasileiro do Sal, usando da atribuição que lhe confere a alínea "1" do artigo 2.º, capítulo 1, Lei 3.137 de 13 de maio de 1957⁴, editou a resolução 25/57, em 30 de dezembro do mesmo ano⁵.

Em 4 de dezembro de 1974 entrou em vigor a Lei n.º 6.150, dispondo sobre a iodação do

sal, revogando as disposições em contrário⁶. Esta lei está em vigor até hoje e proíbe, em todo o território nacional, expor ou entregar ao consumo sal refinado e moído que não contenha iodo na proporção de 10 mg de iodo metálico por quilograma do produto.

De acordo com a Resolução 4/79 da Comissão Executiva do Sal⁷, o sal moído, quando destinado ao consumo humano, deverá obedecer às especificações constantes da Lei n.º 6.150, de 3 de dezembro de 1974, e do Decreto 75.697 de 6 de maio de 1975^{8,9}.

Face a toda essa legislação, foram desenvolvidos métodos analíticos para o controle do iodo adicionado ao sal^{1, 12, 14}.

Conforme a tabela I do Decreto Federal n.º 55.871 de 26 de março de 1965, e o anexo I do Decreto Federal n.º 75.697 de 6 de maio de 1975, é permitida a adição de antiemectante ao sal, sendo o carbonato de cálcio o mais usado pelos produtores, podendo ser adicionado até o limite de 2,5 g/100 g de sal refinado^{3, 3, 7}.

A principal finalidade deste trabalho foi pesquisar a influência do antiemectante carbonato de cálcio como interferente nas determinações analíticas do iodo no sal. Ao mesmo tempo foi feito um levantamento para verifi-

* Realizado na Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.
** Do Instituto Adolfo Lutz.

car se está sendo cumprida a exigência legislativa referente à adição de iodo em sal refinado.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram realizadas determinações de iodo em 52 amostras de diferentes marcas de sal refinado para consumo humano, expostas à venda no comércio da cidade de São Paulo, isentas de CaCO_3 , antes e após a adição de 2% do referido antiúmectante. Foram também efetuadas dosagens de iodo em amostras de cloreto de sódio, p.a., às quais foram adicionadas 2 gramas por cento de carbonato de cálcio e 10 mg por 1000 g de iodo em iodato de potássio.

Reagentes

- Ácido sulfúrico 1 N
- Iodeto de potássio
- Solução de amido a 1%
- Solução de tiosulfato de sódio 0,005 N

Método

Pesar 10 g da amostra bem homogeneizada e transferir para um Erlenmeyer de 500 ml, com auxílio de 200 ml de água bidestilada.

Agitar até dissolução. Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico 1 N. Adicionar 0,1 g de iodeto de potássio, 2 ml de solução de amido, como indicador, e titular o iodo liberado com tiosulfato de sódio 0,005 N, usando microbureta.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos estão representados na tabela, que relaciona o teor de iodo em sal refinado, sem e com adição de carbonato de cálcio.

O teste de significância aplicado aos resultados de dosagem de iodo ao sal, sem adição e com adição do antiúmectante carbonato de cálcio, apresentou o valor de 'encontrado' = 0,679 p/GL = 102. O valor do 'crítico a nível de significância $\alpha = 0,05$ e grau de liberdade 102 foi igual a 1,98 p/GL = 102. Pela comparação do valor 'encontrado' com o valor 'crítico', podemos afirmar que não há diferença significativa entre os dois valores do teor de iodo obtido sem e com adição de CaCO_3 . Podemos também agrupar os valores em classes, a fim de estudar suas freqüências e, com estes dados, construir os gráficos das figuras 1 e 2 da página seguinte, visualizando assim a distribuição estatística dos resultados obtidos.

TABELA

Determinação de iodo em amostras de sal refinado

Amostras	Teor de iodo		Amostras	Teor de iodo	
	Sal sem CaCO_3 mg/1000 g	Sal com CaCO_3 mg/1000 g		Sal sem CaCO_3 mg/1000 g	Sal com CaCO_3 mg/1000 g
1	16,9	16,7	27	9,9	9,7
2	10,1	9,1	28	20,3	19,4
3	14,3	12,4	29	10,3	9,7
4	11,2	10,9	30	9,1	8,6
5	11,2	10,8	31	8,9	8,6
6	8,8	7,9	32	6,8	5,9
7	7,0	6,1	33	13,5	12,9
8	14,8	14,6	34	13,8	12,9
9	9,5	9,2	35	13,4	13,2
10	10,1	9,8	36	14,3	14,0
11	14,3	14,0	37	15,4	15,2
12	10,1	9,7	38	15,3	15,1
13	11,6	11,3	39	7,6	6,8
14	14,3	14,1	40	6,0	5,9
15	10,1	9,7	41	11,3	11,2
16	21,3	20,8	42	14,4	14,1
17	7,7	7,3	43	13,9	13,5
18	5,6	4,9	44	11,9	12,1
19	9,8	9,2	45	10,0	9,7
20	13,6	13,5	46	13,8	13,5
21	13,2	12,9	47	12,7	11,9
22	9,8	9,4	48	9,9	9,3
23	11,2	10,4	49	5,5	4,9
24	12,7	12,4	50	10,0	9,2
25	14,5	13,9	51	8,8	8,3
26	9,2	9,8	52	8,9	8,4

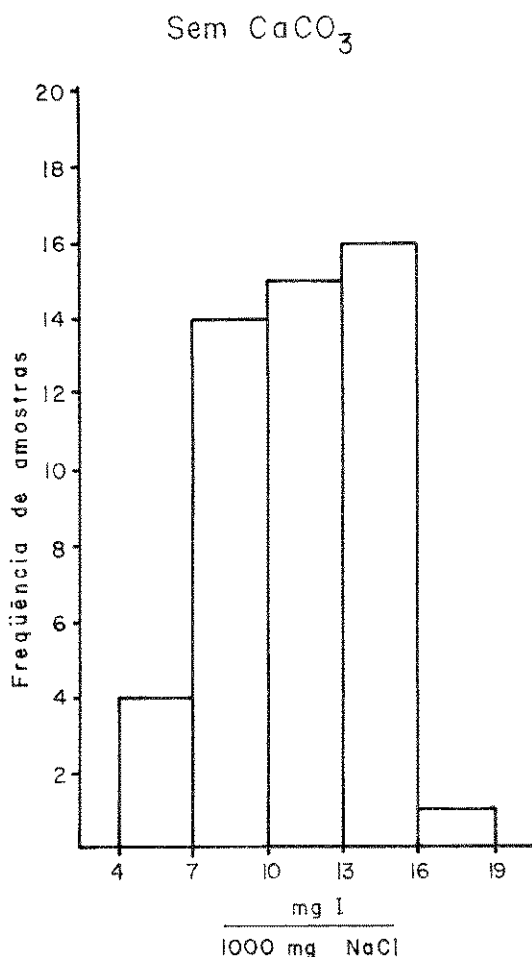


FIGURA 1 — Distribuição por classes dos resultados obtidos a partir de amostras sem CaCO_3 .

Na análise dos resultados, admitindo-se um erro de 5% nos valores encontrados, verificamos que aproximadamente 70% das amostras analisadas (37 unidades) contém um teor de iodo fora do limite estabelecido pela legislação vigente, que é de 10 mg de iodo por 1000 g de sal. Destas 37 amostras, em desacordo com a lei, 23 apresentaram pequeno teor acima do limite permitido, fato que não prejudica o organismo.

Tendo em vista a importância dada pelo Ministério de Saúde Pública à prevenção do bócio; apoiadas em dados publicados no anexo I da Portaria n.º 27, de 3 de fevereiro de 1982, que diz: "... aproximadamente 15 milhões de brasileiros em decorrência de ingestão deficiente de iodo são em graus variáveis vítimas desta enfermidade"⁴ e, ainda,

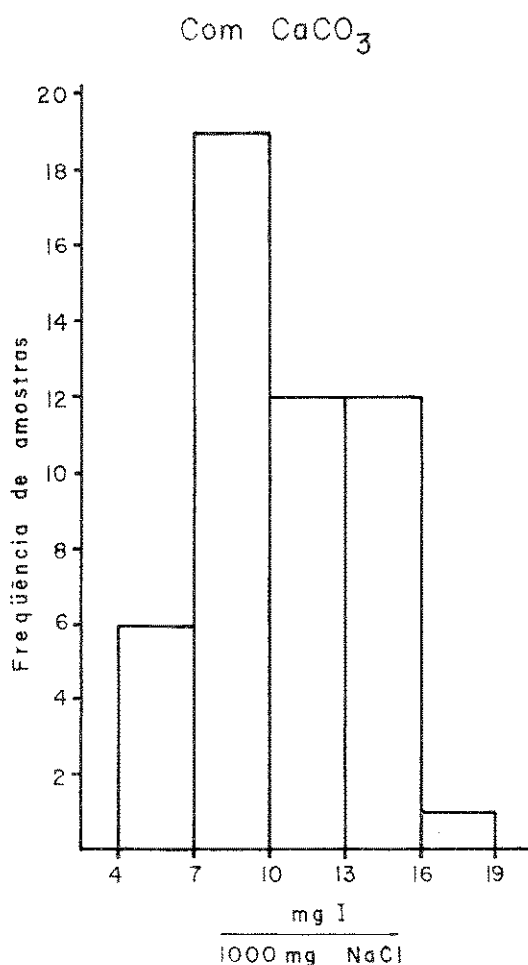


FIGURA 2 — Distribuição por classes dos resultados obtidos a partir de amostras com CaCO_3 .

considerando a legislação de outros países, como Estados Unidos¹⁰, que determina adição de iodeto de potássio ao sal refinado, em proporção de 100 mg/kg, Finlândia¹¹, que considera necessários 250 mg/kg, México¹², 20 mg/kg, Guatemala¹³, 67 mg/kg, quantidades estas maiores que a quantidade permitida pela legislação brasileira, sugerimos que seja feita uma revisão na Lei Federal n.º 6.150/74, estabelecendo um aumento no iodato de potássio a ser adicionado ao sal correspondente a um intervalo de 10 a 20 mg de iodo por 1000 g de sal.

Agradecimento

A Dra. Rosa Kiyoko Koga, pela colaboração na parte de estatística do presente trabalho.

SILVEIRA, N.V.V. & AMATO, C. — Iodine levels of samples of refined cooking salt collected in groceries of São Paulo City, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):75-78, 1981.

ABSTRACT: The iodine content of 52 samples of refined cooking salt obtained in groceries of São Paulo City was lower than 10 mg/1kg of salt required by Brazilian law. The anti-humectant CaCO_3 does not interfere with the iodine determination.

DESCRIPTORS: calcium carbonate, interference in iodine determination in refined cooking salt; refined cooking salt, iodine determination; refined cooking salt, brazilian legislation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.E.W. — Sobre o teor de iodo em sais marinhos do Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 17:47-54, 1957.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Decreto n.º 55.871 de 26 de março de 1965. *Diário Oficial*, Brasília, 9 abr. 1965. Seq. 1, pt. 1, p. 3610. Modifica o decreto n.º 50.040 de 24 jan. 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos...
3. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Decreto n.º 75.697 de 6 de maio de 1975. *Diário Oficial*, Brasília, 7 maio 1975. Seq. 1, pt. 1, p. 5393. Aprova padrões de identidade e qualidade para o sal...
4. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Lei n.º 3.137 de 13 de maio de 1957. Cap. 1, art. 2.º, alínea 1. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, 16 maio 1957. Seq. 1, p. 12.201. Denomina Instituto Brasileiro do Sal ao Instituto Nacional do Sal, dando-lhe nova organização.
5. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Lei n.º 6.150 de 3 de dezembro de 1974. *Diário Oficial*, Brasília, 4 dez. 1974. Seq. 1, pt. 1, p. 13733. Dispõe sobre a obrigatoriedade da iodação do sal destinado ao consumo humano, controle pelos órgãos sanitários e dá outras providências.
6. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Portaria n.º 27, de 03 de fevereiro de 1982. *Diário Oficial*, Brasília, 5 fev. 1982. Seq. 1, p. 2247. Aprova as diretrizes e as atividades do Programa de Combate ao Bócio Endêmico...
7. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 4/79 da Comissão Executiva do Sal (Ministério da Indústria e Comércio). *Diário Oficial*, Brasília 11 dez. 1979. Seq. 1, pt. 1, p. 18.743. Estabelece normas para registro, instalação e funcionamento de moagem de sal...
8. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 25/57 do Instituto Brasileiro do Sal. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, 30 dez. 1957. Seq. 1, p. 29.065. Estabelece especificações para o sal refinado.
9. DE MAYER, F.M.; LOWENSTEIN, F.W. & THILLY, C.H. — *La lucha contra el bocio endêmico*. Ginebra, OMS, 1979. 89 p.
10. KIMBALL, O.P. — History of the prevention of endemic goitre. *Bull. Org. mond. Santé*, 9:241-8, 1953.
11. MARINE, P. apud CRUICKSHANK, E.W.H. — *Food and nutrition*. 2ª ed. Edinburg, Livingstone, 1951. p. 156-7.
12. OHWEILER, O.A. — *Teoria e métodos da análise quantitativa*. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Sal, 1957. p. 709.
13. STANBURY, J.B.; ERMANS, A.M.; HETZEL, B.S.; PRETELL, E.A. & QUERIDO, A. — Goitre et crétinisme endémiques: importance en santé publique et prévention. *Chron. OMS*, 28:243-52, 1974.
14. VOGEL, A.I. — *Química analítica quantitativa: teoria y practica*. v. 1: *Volumetria y gravimetria*. Version castellana de Miguel Catalano Y Elsiades Catalano. Buenos Aires, Kapelus, 1960. p. 466.

Recebido para publicação em 6 de março de 1981.

CONTAGEM DE FILAMENTOS MICELIANOS PELO MÉTODO DE HOWARD EM SUCOS DE TOMATE, MARACUJÁ, CAJU E UVA *

Claydes de Quadros ZAMBONI **
Maria Izilda Esteves BARION **
Nazareth SPITERI **

RIALA6/528

ZAMBONI, C.Q.; BARION, M.I.E. & SPITERI, N. — Contagem de filamentos micelianos pelo método de Howard em sucos de tomate, maracujá, caju e uva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):79-82, 1981.

RESUMO: Foram analisadas 210 amostras de sucos de frutas, sendo 51 de suco de tomate, 66 de suco de maracujá, 43 de suco de caju e 50 de suco de uva, utilizando-se o método de Howard para contagem de filamentos micelianos. Concluiu-se que 30% dos sucos de tomate e de suco de maracujá apresentaram contagem superior a 20% de campos positivos com filamentos de fungos, e foram produzidos com matéria-prima deteriorada. Por outro lado, verificou-se que as frutas utilizadas na produção de sucos de caju e uva estavam em condições higiênicas satisfatórias. Recomenda-se a exigência, na legislação brasileira pertinente, de limite de tolerância de até 20% de campos positivos com filamentos micelianos em sucos de frutos.

DESCRITORES: suco de fruto, caju (*Anacardium occidentale*), maracujá (*Pasiflora*), uva (*Vitis*), tomate (*Lycopersicon*); fungos em suco de fruto; contagem de micélios pelo método de Howard.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de microrganismos em sucos de frutas, produtos com pH abaixo de 4,0, é muito reduzido, pois a maioria dos microrganismos não se desenvolve em meio muito ácido¹. Além disso, o processamento tecnológico de preservação a que são submetidos esses alimentos emprega a pasteurização, processo que destrói as bactérias lácticas e acéticas, leveduras e bolores que seriam os contaminantes potenciais desse tipo de alimento. Também, a embalagem sob vácuo impede o desenvolvimento de bolores que, em sua grande maioria, são aeróbios obrigatórios.

Em trabalho anterior, verificamos a presença de fungos em amostras de purês de tomate e empregamos a contagem de filamentos micelianos como meio de verificação da qualidade desses alimentos²⁰. Do mesmo modo, observamos que alguns sucos de frutas apre-

sentam-se nas mesmas condições que os purês de tomate, isto é, embora não se verifique crescimento de microrganismos, podemos constatar e determinar quantitativamente fungos não viáveis, caracterizando o emprego de matéria-prima não selecionada, e deteriorada.

A finalidade deste trabalho foi a de verificar a qualidade dos sucos de tomate, maracujá, caju e uva disponíveis no comércio da capital de São Paulo, através da contagem de filamentos de fungos, empregando o método de Howard.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas 210 amostras de sucos de frutas, assim distribuídas:

sucos de tomate 51
sucos de maracujá 66
sucos de caju 43
sucos de uva 50

* Realizado na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

As amostras foram colhidas aleatoriamente pela Divisão de Alimentação Pública da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, nos diversos supermercados e mercearias da Capital, constituindo, portanto o produto que é oferecido normalmente à população.

Foi aplicado o Método de Howard para a contagem de filamentos micelianos, segundo a técnica preconizada por "Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists"^{2, 7, 8}.

Na determinação de sólidos solúveis totais nos sucos, verificou-se haver, em média, uma concentração de 13,4g por cento no suco de tomate, 21,9g por cento nos de maracujá, 18,8g por cento nos de caju e 25,6g por cento nos de uva.

Aos sucos, depois de homogeneizados, foi adicionada uma solução de carboximetilcelulose sódica a 0,5%, na proporção de 1:2,5 para os sucos de maracujá e caju e de 1:3 para os de uva, a fim de se obter a concentração de 8,3% de sólidos; os sucos de tomate não foram diluídos.

As preparações foram coradas com solução de azul de algodão a 0,1%, em lactofenol, segundo Rivas, e colocadas na câmara de Howard, procedendo-se depois à contagem de filamentos micelianos^{6, 7}.

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1

Porcentagem de campos positivos com filamentos de fungos em sucos de tomate e maracujá

Campos positivos com filamentos de fungos (%)	Sucos de tomate		Sucos de maracujá	
	N.º de amostras	% entre as amostras	N.º de amostras	% entre as amostras
0 a 10	25	49,03	29	43,94
11 a 20	14	27,45	16	24,25
21 a 30	5	9,80	6	9,09
31 a 40	5	9,80	4	6,06
41 a 50	2	3,92	8	12,12
51 a 60	0	0,00	1	1,51
61 a 70	0	0,00	0	0,00
71 a 80	0	0,00	2	3,03
Total	51	—	66	—

TABELA 2

Porcentagem de campos positivos com filamentos de fungos em sucos de caju e uva

Campos positivos com filamentos de fungos (%)	Sucos de caju		Sucos de uva	
	N.º de amostras	% entre as amostras	N.º de amostras	% entre as amostras
0	21	48,84	42	84,00
2	7	16,28	2	4,00
4	7	16,28	2	4,00
6	5	11,63	3	6,00
8	2	4,65	0	0,00
10	1	2,32	1	2,00
Total	43	—	50	—

A legislação de alguns países, como Estados Unidos, Inglaterra e Argentina, tolera a contagem de 20% de campos positivos com filamentos de fungos para os sucos de tomate^{4, 8}; para os sucos de maracujá, uva e caju não há nessas legislações referências quanto aos limites de tolerância.

Fazendo uma comparação entre os sucos e comparando os resultados obtidos com o padrão de 20%, vamos considerar:

aceitável — a unidade cuja percentagem de campos positivos com filamentos micelianos é, no máximo, de 20%.

inaceitável — a unidade cuja percentagem de campos positivos com filamentos micelianos está acima de 20%.

Classificando, de acordo com o critério acima, as unidades dos quatro sucos em aceitáveis e inaceitáveis, encontramos os resultados apresentados na tabela 3.

TABELA 3

Classificação das amostras de sucos de tomate, maracujá, caju e uva analisadas, comparando com padrões internacionais fixados de 20% de campos positivos com filamentos de fungos

Amostras	Suco s			
	Tomate	Maracujá	Caju	Uva
Aceitáveis	39 (76,47%)	45 (68,18%)	43 (100%)	50 (100%)
Inaceitáveis	12 (25,53%)	21 (31,82%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	51	66	43	50

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, verifica-se que aproximadamente 30% dos sucos de tomate e de maracujá estão sendo produzidos com matéria-prima deteriorada, enquanto que as condições higiênicas das frutas utilizadas na produção dos sucos de caju e uva são satisfatórias. Por este motivo, concluímos que deve ser incluída no Código Brasileiro de Alimentos a exigência de contagem de filamentos micelianos em sucos de tomate e maracujá, visto apresentarem, respectivamente, de 25 a 30% de amostras inaceitáveis frente aos padrões internacionais.

Quanto aos sucos de caju e uva, embora tenham se apresentado em condições higiênicas satisfatórias, propomos que também devam ser controlados, a fim de que possamos nos certificar se essas condições aceitáveis foram devidas ao acaso.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos à Divisão de Alimentação Pública da Coordenadoria de Saúde da Comunidade pelo envio das amostras e à Seção de Bebidas do Instituto Adolfo Lutz pela determinação de sólidos solúveis totais nos sucos.

RIALA6/528

ZAMBONI, C.Q.; BARION, M.I.E. & SPITERI, N. — Mycelia filaments count by Howard's method in juices of tomato, passion-fruit, cashew and grape. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):79-82, 1981.

ABSTRACT: Howard mycelia count method were made in 210 comercial samples of Brazilian fruit juices distributed as follows: 51 samples of tomato juice, 66 samples of passion-fruit juice, 43 samples of cashew-fruit juice and 50 samples of grape juice. The counts disclosed that 30% of tomato and passion-fruit juices were processed with mold-contaminated raw material. The samples of cashew-fruit and grape juices did not countain mycelia. It is suggested that the Brazilian legislation could tolerate up to 20% of mold positive juices of tomato and passion-fruit.

DESCRIPTORS: fruit juice, cashew (*Anacardium occidentale*), passion-fruit (*Passiflora*), grape (*Vitis*), tomato (*Lycopersicon*); mold (fungus) in fruit juice; Howard mycelia count method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMANAC of the canning, freezing, preserving industries. Westminster, Ma., Judge & Sons, 1978.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis*. 12. ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1975. p. 824 (Techn. 40.085)
3. FUNGI associated with food decomposition. *FDA by-lines*, 5(3):117-35, 1974.
4. LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I.; EIROA, M.N.U. & ARIMA, H.K — Avaliação de sucos, refrigerantes, refrescos, néctares e xaropes em face dos padrões microbiológicos brasileiros. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 49:75-91, 1977.
5. PADRON G., J. & MENEZES JÚNIOR, J.B.F. — Contribuição ao estudo e à aplicação do método de Howard nas contagens de cogumelos dos produtos de tomate. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 8:99-136, 1948.
6. POTTER, N.N. — *Food science*. Westport, Conn., AVI publ., 1968. 653 p.
7. SOUTO, A.B. & GODOY, O. — Investigações sobre produtos de tomate. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2:100-79, 1942.
8. TOWNSEND, C.T. — *A laboratory manual for the canning industry*. 2. ed. Washington, D.C., Nac. Canners Ass., 1956.
9. TRESSLER, D.K. & JOSLYN, M.A. — *Fruit and vegetable juice: processing technology*. Westport, Conn., AVI publ., 1961. 1028 p.
10. ZAMBONI, C.Q.; PACHECO, J.A.; ALVES, H.I.; SPITERI, N. & RORIZ, T. — Estudo comparativo de qualidade entre quatro marcas de purês de tomate, através da contagem de filamentos micelianos pelo método de Howard. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40(1):23-7, 1980.

Recebido para publicação em 30 de março de 1981.

AFLATOXINA B₁ EM FEIJÃO *

Myrna SABINO **
Maria José S. CORRÊA **

RIALA6/529

SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. — Aflatoxina B₁ em feijão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):83-87, 1981.

RESUMO: Foi pesquisada aflatoxina B₁, por cromatografia em camada delgada, em 100 amostras de feijão de várias espécies provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Em 10% destas amostras foi detectada aflatoxina B₁ em concentrações que variaram de 30 a 500 µg/kg (ppb), valores estes superiores aos tolerados pela legislação brasileira vigente.

DESCRITORES: aflatoxina B₁, determinação em feijão; feijão (*phaseolus*), determinação de aflatoxina B₁.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos carcinogênicos altamente tóxicos, produzidos pelas espécies de fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

A contaminação de alimentos por aflatoxinas pode variar com as regiões geográficas, métodos de produção e estocagem, e também com o tipo de alimento, pois alguns produtos alimentícios são substratos mais susceptíveis para o crescimento de fungos do que outros.

Os mais altos índices de contaminação por micotoxinas (aflatoxinas) são encontrados em alimentos provenientes de regiões tropicais e semitropicais, onde o clima quente e úmido favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos.

Considerando que o feijão é alimento básico na população brasileira, e que praticamente todos os alimentos, principalmente os grãos oleaginosos, cereais, frutas são passíveis de conter micotoxinas, achamos justificável um estudo desta contaminação neste tipo de leguminosa, em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODO

Cem amostras de feijão de diferentes regiões foram analisadas para determinar a afla-

toxina B₁. Algumas delas foram adquiridas nos mercados da cidade de São Paulo, e outras foram remetidas ao Instituto Adolfo Lutz para análise.

O método empregado foi o descrito por PREGNOLATTO & SABINO². A técnica consiste em:

Pesar 50 g de grãos de feijão triturados em liquidificador e extrair a aflatoxina com 100 ml de clorofórmio, em agitador mecânico, durante 2 horas.

Filtrar em papel Whatmann n.º 1 e concentrar o solvente clorofórmico para a identificação e avaliação da aflatoxina B₁, por cromatografia em camada delgada. Desenvolver o cromatograma com benzeno-acetato de etila-etanol, na proporção de 30:19:1. Examinar, sob luz ultravioleta, e comparar a mancha fluorescente, correspondente à aflatoxina B₁, com a do padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 resume os resultados obtidos na determinação da aflatoxina B₁ e indica a procedência das amostras de feijão analisadas. Estes resultados foram expressos em µg/kg (ppb) e a sigla n.d. (não detectada) significa o não aparecimento de fluorescência no

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 14.º Congresso Latinoamericano de Química, San José, Costa Rica, 1981.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

TABELA 1

Determinação de aflatoxina B₁ em feijão por cromatografia em camada delgada

Amostras analisadas n.º	Procedência	Variedade	Aflatoxina B ₁ µg/kg (ppb)
1	Paraguaçu Paulista	Aroana	n.d.
4	Ribeirão Preto	Carioca	n.d.
18	Paraguaçu Paulista	"	n.d.
6	Lucélia	"	n.d.
4	Aguai	"	n.d.
4	Bauru	"	n.d.
5	Campinas	"	n.d.
6	Tatuí	"	n.d.
2	Sorocaba	"	n.d.
2	Pirassununga	"	n.d.
2	Presidente Prudente	"	n.d.
3	São José do Rio Preto	"	n.d.
2	Ibitinga	"	n.d.
2	Marília	"	30
2	Araçatuba	"	n.d.
1	Paraguaçu Paulista	Piratan	n.d.
1	São Paulo *	Preto	n.d.
1	Presidente Prudente	Regente	30
1	Santo Anastácio	"	30
1	Lucélia	"	n.d.
1	Ribeirão Preto	Rosinha	n.d.
1	Aguai	"	n.d.
2	São José do Rio Preto	...	n.d.
1	Aguai	...	n.d.
3	Taubaté	...	n.d.
4	Avaré	...	n.d.
1	Presidente Prudente	...	n.d.
4	Sorocaba	...	n.d.
6	São Paulo *	...	n.d.
1	São Paulo *	...	n.d.
2	São Paulo *	...	30
1	São Paulo *	...	40
2	São Paulo *	...	50
1	São Paulo *	...	200
1	São Paulo *	...	300
1	São Paulo *	...	500

* Região do Estado de São Paulo não identificada.

Observações:

O sinal de pontuação (...) indica: variedade de feijão não identificada.

A sigla n.d. indica: aflatoxina não detectada.

TABELA 2

Identificação de microrganismos em amostras de feijão deteriorado

Variedade de feijão	Microrganismo	Procedência
Aroana	Leveduras	Paraguaçu Paulista
Carioca	<i>Aspergillus</i> sp.	Marília
Regente	<i>Aspergillus</i> sp.	Santo Anastácio
Rosinha	<i>Mycellia sterilia</i>	Aguai
Piratan	<i>Mycellia sterilia</i>	Paraguaçu Paulista

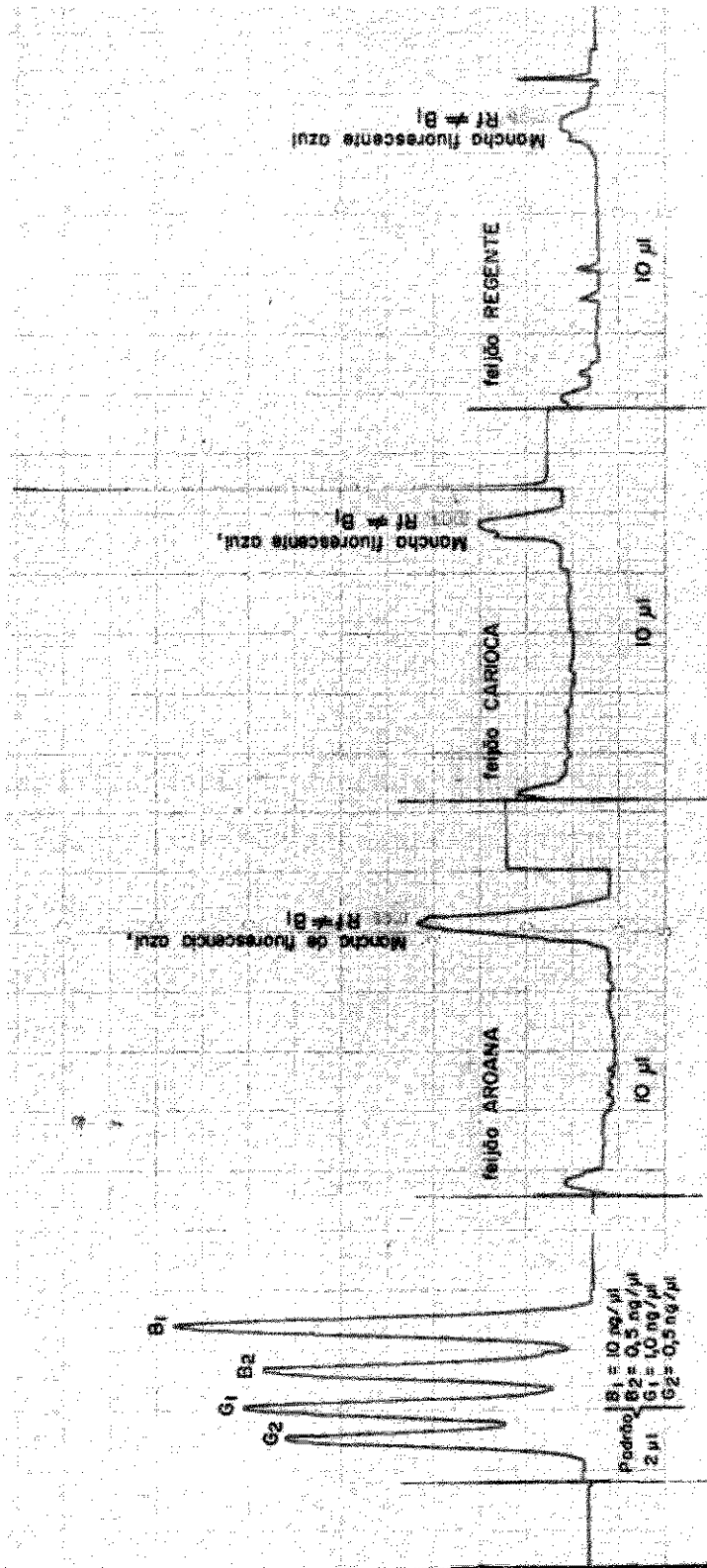


FIGURA 1 — Desintograma de aflatoxina B₁ padrão e amostras.

cromatograma. Como se pode deduzir desta tabela, foi mínima a porcentagem de contaminação das amostras de feijão por aflatoxina B₁.

Nas amostras analisadas, foi detectada aflatoxina B₁ em apenas 10%, em concentrações que variaram de 30 a 500 µg/kg (ppb). Salientamos que o índice máximo de tolerância, permitido pela legislação brasileira para a aflatoxina, é de 30 ppb (µg/kg).

Um fato curioso, observado na cromatografia, foi a presença de uma mancha fluorescente semelhante à da aflatoxina B₁, que poderia ser erroneamente considerada como sendo desta toxina; porém, comprovamos não corresponder ela ao metabólito tóxico pro-

curado. Esta comprovação foi realizada em três amostras de feijão (amostra A, variedade Aroana; amostra B, variedade carioca e amostra C, variedade regente), pelo método da A.O.A.C. (CB)¹, onde os extratos clorofórmicos das amostras aplicadas em cromatografia em camada delgada apresentaram uma mancha fluorescente azul, com R_f diferente do da aflatoxina B₁. A avaliação e identificação final foi feita por densitometria* (fig. 1).

O espectro de absorção, na região ultravioleta**, deste mesmo componente fluorescente, eluído em metanol, comprovou definitivamente não pertencer ao da aflatoxina B₁ (fig. 2). Nossos estudos continuam com o objetivo de identificar este composto fluorescente.

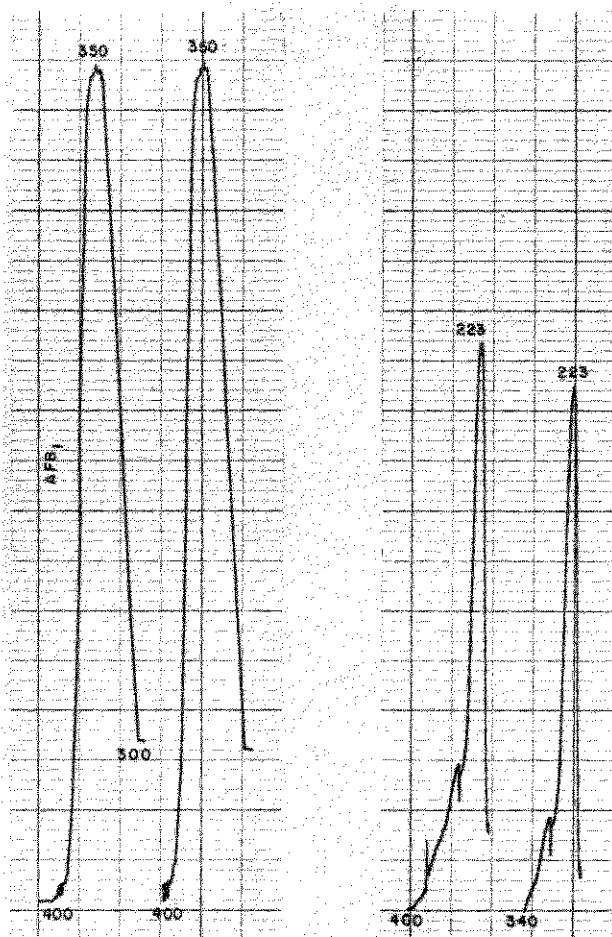


FIGURA 2 — Espectros de absorção, na região ultravioleta, do padrão de aflatoxina B₁ e componente fluorescente.

* Densitômetro Zeiss, acoplado ao espectrofotômetro PMQIL, excitação UV 366nm (monocromador).
** Espectrofotômetro UV-Varian, mod. 635, com registrador.

Finalmente, fez-se uma análise microbiológica das amostras que, vistas a olho nu, se apresentaram mofadas, onde foram identificados microrganismos, conforme tabela 2.

Pode-se notar que, das cinco amostras analisadas, somente na amostra de feijão carioca se identificou *Aspergillus* sp., que é um dos fungos produtores de aflatoxina. Coincidentemente foi detectada, nesta amostra, aflatoxina na concentração de 30 µg/kg, conforme está demonstrado na tabela 1.

CONCLUSÃO

Foi detectada aflatoxina B₁ em 10% das 100 amostras analisadas, em concentrações

que variaram de 30 a 500 µg/kg (ppb), valores estes superiores aos tolerados pela legislação brasileira vigente (30 µg/kg de aflatoxina B₁ e G₁ somadas)¹.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração do Dr. Oswaldo Luiz Marmo, da Cia. Ind. Com. Brasileira de Produtos Alimentares, que nos auxiliou na confirmação da não detecção da aflatoxina B₁ em algumas amostras; à Dra. Dilma Scala Gelli, do Instituto Adolfo Lutz, pela identificação dos microrganismos.

RIALA6/529

SABINO, M. & CORRÊA, M.J.S. — Aflatoxin B₁ in bean. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):83-87, 1981.

ABSTRACT: The presence of aflatoxin B₁ was investigated by thin-layer chromatography in 100 samples of beans of several varieties sold in various cities from the state of São Paulo. Aflatoxin B₁ was detected in 10% of the samples, the content varying between 30 and 500 µg/kg (ppb). These values are higher than those permitted by the pertinent Brazilian laws.

DESCRIPTORS: aflatoxin B₁, determination in bean; bean (*phaseolus*), aflatoxin B₁, determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS — *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12.^a ed. Washington, A.O.A.C., 1975. p. 465-66.
2. BRASIL. Leis, decretos, etc. — Resolução n.º 34-76. *Diário Oficial*, Rio de Janeiro, 19 jan. 1977. Seção I, pt. 1, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
3. PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Pesquisa e dosagem de aflatoxina B₁ em amendoim e derivados e em outros cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:65-71, 1969/70.
4. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. v. 1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*. 2.^a ed. São Paulo, 1976. p. 223-25.

Recebido para publicação em 7 de abril de 1981.

IMPORTANCIA DE *RATTUS NORVEGICUS* CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, SP, BRASIL, COMO HOSPEDEIROS PARATÊNICOS DE *TOXOCARA CANIS* (ASCAROIDEA, NEMATODA) *

Pedro Paulo CHIEFFI **
Vânia Martins Fontes DEL GUERCIO **
Mirthes UEDA **
Lilian Barros de MELLO **

RIALA6/530

CHIEFFI, P.P.; DEL GUERCIO, V.M.; UEDA, M. & MELLO, L.B. — Importância de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil, como hospedeiros paratênicos de *Toxocara canis* (Ascaroidea, Nematoda). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):89-91, 1981.

RESUMO: Analisaram-se os soros de 121 exemplares de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, através de reação de hemaglutinação passiva, para pesquisar a presença de anticorpos anti-*Toxocara*, com a finalidade de avaliar o potencial destes roedores como hospedeiros paratênicos de *Toxocara canis*. Considerando como positivos os soros cujo título foi igual ou superior a 1:20, em 28 ratos (23,12%) revelaram-se anticorpos anti-*Toxocara*, indicando que é freqüente a infecção destes animais por *T. canis* em nosso meio e a possibilidade de atuarem estes murídeos como hospedeiros paratênicos para o nematóide.

DESCRIPTORIOS: *Rattus norvegicus*, hospedeiro paratênico; *Toxocara canis*; roedores.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversos aspectos da biologia de *Toxocara canis*, ascarídeo parasita habitual de cães, têm sido estudados, especialmente os relativos a seu comportamento zoonótico e a possibilidade de ocorrência de infecções em seres humanos^{1, 9, 10}.

Em nosso país, alguns trabalhos mostraram que *T. canis* é parasita freqüente em cães, sobretudo naqueles menores de um ano de idade^{3, 4, 7, 11}. Além disso, em diversas ocasiões, detectaram-se ovos semelhantes aos de *T. canis* contaminando o solo de logradouros públicos^{4, 6}, tornando-se patente o risco de ocorrência de infecções em seres humanos, principalmente crianças.

Entre os diversos mecanismos descritos como responsáveis pela transmissão de *T. canis* entre canídeos, aventou-se a possibili-

dade de pequenos mamíferos atuarem como hospedeiros paratênicos², albergando larvas de terceiro estágio do parasita em seus tecidos e transmitindo-as aos canídeos através de processo de predação. No presente trabalho investiga-se a importância de *Rattus norvegicus*, murídeo muito comum em nosso meio, como hospedeiro paratênico de *T. canis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre 191 exemplares de *Rattus norvegicus* capturados vivos em diversos pontos do município de São Paulo, no período compreendido entre maio de 1977 e agosto de 1979, obtiveram-se, por punção cardíaca, amostras de sangue de 121 animais, nas quais se pesquisou a presença de anticorpos anti-*Toxocara* através de reação de hemaglutinação passiva, realizada com hemácias humanas do tipo O, Rh

* Realizado no Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

negativo, formolizadas, taninizadas e sensibilizadas com antígeno extraído de larvas de *T. canis*, obtidas de acordo com técnica descrita por FAIRBAIRN⁵.

Para obtenção de antígeno, larvas de segundo estágio de *T. canis* foram lavadas em solução fisiológica e rompidas com o emprego de ultra-som (15 ciclos/seg/30 min). Centrifugou-se a suspensão resultante a 4.000 rotações/min, a 4°C, utilizando-se o sobrenadante como antígeno. Determinou-se o conteúdo protéico do antígeno através do método de biureto.

Um soro sabidamente positivo e outro negativo para anticorpos anti-*Toxocara* foram usados como controles das reações de hemaglutinação. Consideraram-se positivos os soros cujo título foi igual ou superior a 1:20.

RESULTADOS

Dos 121 soros analisados, 28 (23,12%) revelaram a presença de títulos positivos e, entre estes últimos, 11 (9,9%) apresentaram títulos bem elevados, iguais ou superiores a 1:160, conforme se pode perceber na tabela abaixo.

TABELA

Distribuição de títulos de anticorpos anti-*Toxocara* em soros de 121 exemplares de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, entre maio de 1977 e agosto de 1979

Título	Número de exemplares
< 1:20	93
1:20	5
1:40	6
1:80	6
1:160	4
1:320	2
1:640	5

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A avaliação do parasitismo por *T. canis*, por intermédio de métodos sorológicos, costuma gerar controvérsias pela possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros nematódeos, principalmente ascarídeos.

No caso de *Rattus norvegicus* não há parasitismo intestinal por *Ascaris* ou outros ascarídeos, nem se conhece relação de paratenose entre *A. lumbricoides* e este roedor, tornando-se pouco provável a ocorrência de reações cruzadas. Por outro lado, o antígeno utilizado no presente trabalho, obtido de larvas vivas de segundo estágio de *T. canis*, apresenta especificidade maior do que antígenos extraídos de outras fases evolutivas do nematóide⁵.

Desta forma, podem-se aceitar, com razoável segurança, como positivos os títulos iguais ou superiores a 1:20 na reação de hemaglutinação passiva utilizada. Além disso, a ocorrência de número considerável de roedores com títulos sorológicos bem elevados (9,9%) também é uma indicação da inexistência de reações inespecíficas no presente caso.

Os resultados sugerem que é freqüente o encontro de exemplares de *R. norvegicus* apresentando anticorpos anti-*Toxocara* em nosso meio. Tal fato permite supor que este roedor atua como hospedeiro paratênico para *T. canis*, albergando em seus tecidos larvas vivas do nematóide e transferindo-as a canídeos ao sofrer predação.

RIALA6/530

CHIEFFI, P.P.; DEL GUERCIO, V.M.F.; UEDA, M. & MELLO, L.B. — Public health importance of *Rattus norvegicus* as paratenic host to *Toxocara canis* (Ascaroidea, Nematoda) in São Paulo county, SP, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):89-91, 1982.

ABSTRACT: Antibodies against *Toxocara canis* were investigated through passive hemagglutination test in the serum of 121 specimens of *Rattus norvegicus* captured in São Paulo county, state of São Paulo, Brazil. Titers of 1:20 or higher were found in 23.2% of the specimens. The possibility of this species being a paratenic host to *T. canis* is suggested.

DESCRIPTORS: *Rattus norvegicus*, parathenic host; *Toxocara canis*; rodents.

CHIEFFI, P.P.; DEL GUERCIO, V.M.F.; UEDA, M. & MELLO, L.B. — Importância de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil, como hospedeiros paratênicos de *Toxocara canis* (Ascaroidea, Nematoda). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):89-91, 1981.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAVER, P.C. — Toxocarosis (visceral larva migrans) in relation to tropical eosinophilia. *Bull. Soc. Path. exot.*, 55:555-76, 1962.
2. BEAVER, P.C. — The nature of visceral larva migrans. *J. Parasit.*, 55:3-12, 1969.
3. CARNEIRO, J.R.; FREITAS, J.S.; PEREIRA, E.; CAMPOS, D.M.B. & JARDIM, C.V. — Prevalência de helmintos em "Canis familiaris" no município de Goiânia. *Rev. Pat. trop.*, 2:401-4, 1973.
4. CHIEFFI, P.P. & MÜLLER, E.E. — Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp. no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, 10:367-72, 1976.
5. FAIRBAIRN, D. — The "in vitro" hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Can. J. Zool.*, 39:153-62, 1961.
6. FERREIRA, L.F.; OLIVEIRA, E.L. & CAMILLO-COURA, L. — Sobre a presença de ovos de *Toxocara* em praças da cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 10:51-4, 1976.
7. FERREIRA, L.F.; SILVA, M.L. & CAMILLO-COURA, L. — *Toxocara* e outros helmintos, em cães, na cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 10:361-5, 1976.
8. JESKA, E.L. — Purification and immunochemical analysis of genus-specific cuticular antigens of *Toxocara canis*. *J. Parasit.*, 55:465-71, 1969.
9. PESSÓA, S.B. — Comentários sobre algumas helmintoses humanas, pouco conhecidas ou ainda não assinaladas no Brasil. *Rev. Pat. trop.*, 2:159-69, 1973.
10. WOODRUFF, A.W. — Toxocariasis. *Brit. med. J.*, 3:663-9, 1970.
11. ZAGO FILHO, H. & BARRETO, M.P. — Estudo sobre prevalência e intensidade de infestação por helmintos em cães e gatos de Ribeirão Preto. *Rev. bras. Malariol. Doenças trop.*, 9:295-304, 1957.

Recebido para publicação em 1.º de julho de 1981.

ESTADO IMUNOLÓGICO NA LEPTOSPIROSE *

Everaldo COSTA **
Ivo Coelho SILVA **
Genaro MIRANDA FILHO **
Valteli Valverde da SILVA **
Eulólio Moreira CALDAS ***
Edilson BRITO ***
Marilena B. SAMPAIO ***

RIALA6/531

COSTA, E.; SILVA, I.C.; MIRANDA FILHO, G.; SILVA, V.V.; CALDAS, E.M.;
BRITO, E. & SAMPAIO, M.B. — Estado imunológico na leptospirose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):93-100, 1981.

RESUMO: Vinte e dois pacientes com leptospirose, internados no Hospital Couto Maia, Salvador, Bahia, foram investigados no sentido de se detectar possível envolvimento imunológico na patogênese da doença. A alergia cutânea na doença foi avaliada mediante injeção de 0,1 ml de suspensão de leptospiros inativadas, denominada Leptospirin, obtendo-se 91% de positividade. Em cinco pacientes procedeu-se à biópsia da lesão dérmica, sendo o estudo histopatológico e a imunofluorescência compatíveis com processo de hipersensibilidade retardada (tipo IV). O estudo das imunoglobulinas e complemento sérico mostraram elevação de IgG e IgM, e redução de C1q e C3. A imunoeletroforese demonstrou redução da pré-albumina, ampliação de IgM (predominante) e IgG, além de aumento marcante da alfa-2-macroglobulina. Os achados sugerem que possíveis mecanismos imunológicos possam estar contribuindo na patogênese da doença.

DESCRITORES: leptospirose humana, estudo imunológico de pacientes.

INTRODUÇÃO

A leptospirose determina lesões sistêmicas atribuídas a possível toxina (s) ainda não demonstrada experimentalmente.

Estudos recentes^{1, 2, 5} revelaram a formação de imune-complexos determinando lesão tissular, tanto no modelo experimental como no homem. Assim, BRITO demonstrou a ocorrência de redução discreta de C₃ e C₃, depósitos de IgG, IgM e C₃ em músculo da panturrilha e membrana basal glomerular, sendo nesta última observados ainda depósitos de IgA e fibrina, sugerindo o autor que as lesões musculares e renais são mediadas por complexos imunes, com participação de imunoglobulinas do hos-

pedeiro e presumíveis produtos antigênicos da leptospira.

Estudos poloneses e alemães^{2, 5} demonstram que na leptospirose ocorre mecanismo de hipersensibilidade cutânea, caracterizada como do tipo IV. COSTA *et alii*⁴ estudaram em nosso meio este fato, encontrando 84,6% de concordância da intradermorreação com Leptospirin para com a prova de soroaglutinação microscópica.

O presente trabalho visa avaliar as alterações imunológicas ocorrentes na doença, bem como investigar possíveis mecanismos imunológicos que possam explicar, pelo menos em parte, sua patogênese.

* Realizado no Hospital Couto Maia, Salvador, Bahia, Brasil.

** Do Hospital Couto Maia.

*** Da Universidade Federal da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 22 pacientes (19 do sexo masculino), internados no Hospital Couto Maia, Salvador, BA, com diagnóstico de leptospirose, os quais foram submetidos a exames de rotina laboratorial, visando compatibilizar o diagnóstico clínico com os dados fornecidos pelo laboratório. Assim, foram solicitados: hemograma, bilirrubinas, transaminase, tempo de protrombina, uréia, creatinina, soroaglutinação microscópica em campo escuro, exame sumário de urina e telerradiografia do tórax; exceto o exame radiológico, os demais foram repetidos pelo menos uma vez por semana.

A avaliação imunológica consistiu em: dosagem das imunoglobulinas G, M e A, dosagem de C₃, C₄, Clq e imunoeletroforese. Estes exames foram realizados quando da admissão do paciente e repetidos uma semana após a mesma. O método utilizado para dosagem das imunoglobulinas foi o da imunodifusão em placa Hyland.

A partir do 10.^o dia de doença, era aplicado 0,1 ml de Leptospirin na face anterior do antebraço esquerdo, realizando-se leituras após 8 e 24 horas da aplicação; 48 horas após a aplicação do Leptospirin, fazia-se a reação de Mantoux, utilizando o PPD Rt 23.

A positividade do teste alérgico com Leptospirin foi avaliada através de eritema e/ou enduração no local da aplicação, adotando-se a seguinte graduação:

- 0 = negativa — eritema/enduração entre 0 e 9 mm de diâmetro;
- + = eritema/enduração entre 10 e 19 mm;
- ++ = eritema/enduração entre 20 e 29 mm;
- +++ = eritema/enduração acima de 29 mm.

Foram feitas biopsias das lesões dérmicas de 5 pacientes que apresentaram reação positiva ao Leptospirin.

Sempre que se aplicava o Leptospirin era colhido previamente sangue para soroaglutinação microscópica, realizada com bateria de antígenos vivos de 20 cepas de leptospirosas, cultivadas em meio EMJH e enriquecidas com "Bac-leptospira enrichment", usadas entre o 5.^o e 7.^o dias de crescimento. O título de 1:200 ou mais foi adotado como parâmetro de positividade. A doença foi considerada como tendo forma leve ou moderada quando havia boa evolução clínica e laboratorial, era anictérica ou havia icterícia sem hemorragias graves, sem sinais de comprometimento miocárdico e sem insuficiência renal aguda (IRA).

O Leptospirin foi preparado com cepas dos sorotipos *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippotyphosa*, *tarassovi*, *pomona*, *patoc* e *são paulo*, fornecidas pelo Instituto Von Ostertag, de Berlim, Alemanha.

RESULTADOS

Os dados laboratoriais de rotina foram idênticos aos já amplamente observados na literatura desta doença.

Dentre os achados clínicos chamou a atenção a ocorrência de miocardite em dois pacientes e hemorragia digestiva em três; insuficiência renal aguda oligúrica ocorreu em dois pacientes e com diurese normal em treze outros; dois pacientes faleceram.

A distribuição por sexo e grupos etários encontra-se na tabela 2: nas tabelas 3, 4 e 5 encontram-se os valores obtidos na dosagem das imunoglobulinas G, M e A, tanto na primeira como na segunda avaliação, notando-se que IgG esteve elevada nas duas avaliações, predominando na última; IgM esteve igualmente elevada; em relação a IgA, 90% ou mais dos pacientes mantiveram-na em valores normais nas duas avaliações.

Segundo se vê na tabela 6, a imunoeletroforese mostrou redução da pré-albumina em mais de 50% dos casos, ampliação de IgG e IgM, sendo esta marcante na 2.^a dosagem para IgM, e aumento da alfa-2-macroglobulina, que chegou a 100% na 2.^a avaliação.

Das dosagens de complemento observa-se redução de C₃ e Clq, mais acentuada na 2.^a avaliação, sugerindo consumo do complemento em processo imunológico, conforme se vê nas tabelas 7, 8 e 9.

Cinquenta e seis por cento (56%) dos pacientes foram reagentes ao teste tuberculínico, sendo que 19% foram reatores fortes (tabela 10).

Os dados de inoculação com Leptospirin encontram-se na tabela 11, sendo de chamar a atenção o alto grau de positividade do mesmo (91%), quando comparado com a soroaglutinação microscópica que se mostrou negativa em 3 casos (13,6%).

Os achados de biopsias de pele mostraram uma dermatite crônica ou subaguda e a imunofluorescência com padrão granular, multifocal, positivo para IgM, IgG, B1C; ausência de IgE, IgA e fibrina, achados estes compatíveis com uma reação de hipersensibilidade do tipo retardada. Os "sorovars" mais frequentes, nesta investigação, foram: *autumnalis*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa* e *canicola*.

TABELA 1

Bateria de antígenos utilizados

Sorogrupo	Sorotipo	Cepa de referência
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	R.G.A.
Javanica	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia
Celledoni	<i>celledoni</i>	Celledoni
Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
Ballum	<i>castellonis</i>	Castellon 3
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
Cynopteri	<i>butembo</i>	Butembo
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
Australis	<i>australis</i>	Ballico
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
Hebdomadis	<i>wolffi</i>	3705
Bataviae	<i>bataviae</i>	Van Tienen
Tarassovi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin
Panama	<i>panama</i>	Cz 214 K
Shermani	<i>shermani</i>	LT 821
Andamana	<i>andamana</i>	CH 11
Semaranga	<i>são paulo</i>	São Paulo
—	<i>buenos aires</i>	Buenos Aires
—	<i>rufino</i>	Rufino

TABELA 2

Distribuição por sexo e grupo etário de 22 pacientes com leptospirose no Hospital Couto Maia, 1979

Grupo etário (anos)	Sexo		Total
	Masculino	Feminino	
< 10	—	—	—
11 — 20	4	—	4
21 — 30	4	1	5
31 — 40	8	1	9
41 — 50	1	0	1
51 — 60	1	1	2
> 60	1	0	1
Total	19	3	22

TABELA 3

Valores de IgG encontrados em pacientes com leptospirose, no Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mg/dl)	1. ^a avaliação		2. ^a avaliação	
	n.º	%	n.º	%
< 1500	4	20,0	1	8,0
1501 — 1981	5	25,0	3	25,0
1982 — 2463	9	45,0	6	50,0
2464 — 2944	2	10,0	2	17,0
Total	20	100,0	12	100,0

Valores normais de IgG: 800 — 1500 mg/dl.

TABELA 4

Valores de IgM encontrados em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mg/dl)	1. ^a avaliação		2. ^a avaliação	
	n.º	%	n.º	%
< 280	5	25,0	3	25,0
281 — 359	1	5,0	1	8,0
360 — 438	7	35,0	2	17,0
439 — 517	7	35,0	6	50,0
Total	20	100,0	12	100,0

Valores normais de IgM: 60 — 280 mg/dl.

TABELA 5

Valores de IgA encontrados em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mg/dl)	1. ^a avaliação		2. ^a avaliação	
	n.º	%	n.º	%
< 400	18	90,0	11	92,0
401 — 484	1	5,0	1	8,0
485 — 568	1	5,0	—	—
Total	20	100,0	12	100,0

Valores normais de IgA: 100 — 400 mg/dl.

TABELA 6

Dados de imunoelektroforese observados em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, 1979

Achados	1. ^a avaliação (21 pacientes)		2. ^a avaliação (12 pacientes)	
	n.º	%	n.º	%
Redução pré-albumina	11	52,0	7	58,0
Ampliação de alfa-2-glicoproteína	2	9,5	1	8,0
Ampliação IgM	12	57,0	11	92,0
Ampliação pré-albumina	1	5,0	—	—
Aumento alfa-2-macroglobulina	12	57,0	12	100,0
Redução B-2 glicoproteína	—	—	1	8,0
Nórmal	1	5,0	—	—

TABELA 7

Valores de C₃ encontrados em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mg/dl)	1. ^a avaliação		2. ^a avaliação	
	n.º	%	n.º	%
< 55	9	45,0	6	55,0
55 — 120 *	11	55,0	5	45,0
> 120	—	—	—	—
Total	20	100,0	11	100,0

* Valores normais

TABELA 8

Valores de C₃ encontrados em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mg/dl)	1. ^a avaliação		2. ^a avaliação	
	n.º	%	n.º	%
< 20	—	—	1	9,0
20 — 50 *	20	100,0	10	91,0
> 50	—	—	—	—
Total	20	100,0	11	100,0

* Valores normais

TABELA 9

Valores de C_q encontrados em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mg/dl)	1. ^a avaliação		2. ^a avaliação	
	n.º	%	n.º	%
< 10	4	20,0	4	40,0
10 — 25 *	16	80,0	6	60,0
> 25	—	—	—	—

* Valores normais

TABELA 10

Resposta à reação de Mantoux realizada com PPD Rt-23, observada em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, 1979

Valores	Frequência	
	N.º	%
< 4	7	43,8
5 — 9	5	31,2
> 9	4	25,0
Total	16	100,0

TABELA 11

Resultados obtidos pela inoculação de Leptospirin em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, em 1979

Valores (mm)	N.º	%
< 9 (negativo)	2	9,0
10 — 19 (positivo +)	16	73,0
20 — 29 (positivo ++)	2	9,0
> 29 (positivo +++)	2	9,0
Total	22	100,0

TABELA 12

Sorotipos de leptospira identificados pela soroaglutinação microscópica em pacientes com leptospirose, Hospital Couto Maia, 1979

Sorotipos	Freqüência
<i>Patoc</i>	2
<i>Grippotyphosa</i> + <i>icterohaemorrhagiae</i> + <i>autumnalis</i>	1
<i>Icterohaemorrhagiae</i> + <i>grippotyphosa</i>	2
<i>Autumnalis</i> + <i>javanica</i>	1
<i>Autumnalis</i>	2
<i>Andamana</i>	1
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1
<i>Grippotyphosa</i>	1
<i>Canicola</i>	2
<i>Autumnalis</i> + <i>canicola</i>	1
<i>Autumnalis</i> + <i>andamana</i>	1
<i>Grippotyphosa</i> + <i>canicola</i>	1
<i>Autumnalis</i> + <i>icterohaemorrhagiae</i>	3
Total	19

Observação: 3 pacientes apresentaram soroaglutinação negativa, perfazendo um total de 22 pacientes estudados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A patogenia da leptospirose carece ainda de dados definitivos que a expliquem, pois as tentativas de identificação de produtos tóxicos das leptospiros fracassaram. Recentemente têm surgido evidências de envolvimento imunológico na doença¹ e os achados verificados sugerem que, na leptospirose humana, a reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) possa ocorrer com consumo de complemento e que

as lesões musculares e renais possam ser mediadas por imune-complexos, com participação de imunoglobulinas do hospedeiro e outros possíveis fatores tóxicos e antigênicos da leptospira.

Também a alergia dérmica estudada através da inoculação de antígeno de leptospiros, denominado Leptospirin, mostra que a doença se caracteriza por processo de hipersensibilidade retardada, de alta especificidade e elevado grau de positividade^{3, 4, 5}.

RIALA6/531

COSTA, E.; SILVA, I.C.; MIRANDA FILHO, G.; SILVA, V.V.; CALDAS, E.M.; BRITO, E. & SAMPAIO, M.B. — Immunologic study of patients with leptospirosis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):93-100, 1981.

ABSTRACT — Immunologic tests were conducted in 22 patients with leptospirosis who had been admitted to Couto Maia Hospital, Salvador, state of Bahia, Brazil. Cutaneous allergy was disclosed through intradermal injection of 0.1 ml of a suspension of inactivated leptospiros, 91% of the patients giving a positive reaction. Immunofluorescence tests conducted in skin biopsies made in 5 patients as well as the pathologic picture suggested delayed type IV hypersensitivity. Electrophoresis showed increase of IgG and IgM and a reduction of serum complement Clq and C₃. Immunoelectrophoresis disclosed a reduction of pre-albumin, increase of IgM and IgG, besides a marked increase of alpha-2-macroglobulin. These findings suggest a participation of immunity mechanisms in the pathogenesis of leptospirosis.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunologic study of patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITO, E. — *Imunopatologia das leptospiroses*. [Apresentado ao 16.º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador, 1978.]
2. BRZYK, T. & PARNAS, J. — Die allergische Intrakutanprobe bei Leptospirose mit Leptospirin P. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 206: 272-5, 1968.
3. CALDAS, E. M.; SCHONBERG, A.; SAMPAIO, M.B.; COSTA, E. & PLANK, S.J. — Teste alérgico intracutâneo para o diagnóstico de leptospirose. *Arq. Esc. Med. vet. Univ. Fed. Bahia*, 3:11-25, 1978.
4. COSTA, E.; CALDAS, E.M.; SAMPAIO, M.B.; PLANK, S.J. & SCHONBERG, A. — Teste intradérmico para diagnóstico da leptospirose. *Rev. méd. Bahia*, 24:43-48, 1978.
5. OBIGER, G. & SCHONBERG, A. — Die intrakutane Leptospirin-test an schuein im Rahenen der schlachttieruntersuchung und der piersenchenbkampfung. *Fleishwirtschaft*, 54:1649-50, 1974.

Recebido para publicação em 1.º de julho de 1971.

PARASITAS DO GÊNERO *EIMERIA* (COCCIDIA, EIMERIIDAE), *E. SEPARATA* E *E. NIESCHULZI*, EM *RATTUS NORVEGICUS* CAPTURADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, SP, BRASIL *

Rosa Maria D. Souza DIAS **

Pedro Paulo CHIEFFI **

Domingas Maria A. Grispino Vieira TORRES **

Ana Célia S. MANGINI **

RIALA6/532

DIAS, R.M.D.S.; CHIEFFI, P.P.; TORRES, D.M.A.G.V. & MANGINI, A.C.S. — Parasitas do gênero *Eimeria* (*Coccidia*, *Eimeriidae*), *E. separata* e *E. nieschulzi*, em *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):101-105, 1981.

RESUMO: Durante o período compreendido entre maio de 1977 e agosto de 1978, necropsiaram-se 166 exemplares de *Rattus norvegicus* capturados vivos, em diversos pontos do município de São Paulo, com o objetivo de determinar a prevalência de parasitismo por coccídeos do gênero *Eimeria*. Dos 166 ratos examinados, 81 (48,79%) apresentaram-se parasitados por *Eimeria*; entre estes, 56 (33,73%) albergavam *E. separata*, 11 (6,63%) *E. nieschulzi* e 14 (8,43%) estavam parasitados por ambas as espécies. Esta é a primeira vez em que se assinala a presença de *E. separata* no Brasil. Analisando a prevalência de parasitismo conforme o peso (idade) dos ratos capturados, evidenciou-se nítido decréscimo com o aumento de peso (idade) dos roedores, fato que sugere o estabelecimento de mecanismos imunitários de resistência a reinfecções. Não se notou influência do sexo dos roedores na prevalência de parasitismo por *Eimeria*. Os ratos capturados na zona sul do município de São Paulo apresentaram prevalência de infecção, por ambas as espécies de *Eimeria*, em nível significativamente mais elevado do que os procedentes da zona norte.

DESCRIPTORIOS: *Rattus norvegicus*, parasitismo por *Eimeria*; *Eimeria* em *Rattus norvegicus*, São Paulo, SP, Brasil; *Eimeria separata*; *Eimeria nieschulzi*; ratos (murídeos), parasitismo por coccídeos.

INTRODUÇÃO

O estudo da coccidiose em ratos e a validade de espécies do gênero *Eimeria* nestes hospedeiros deu origem a muitas controvérsias, que só foram elucidadas a partir do esclarecimento dos ciclos evolutivos destes protozoários.

OHIRA¹³, em 1912, foi o primeiro autor a descrever uma espécie de coccídeo parasita de *Rattus norvegicus*, denominando-a *Eimeria miyarii*. Em 1924, DIEBEN⁵ refere o encon-

tro de nova espécie dando-lhe o nome de *E. nieschulzi*. E, em 1931, BECKER & HALL² descrevem *E. separata*, parasita do ceco de *Epemys norvegicus* (= *Rattus norvegicus*). Outra espécie, *E. carinii*, considerada válida por PINTO¹⁰, foi incluída na sinonímia de *E. miyarii*; também não são mais consideradas válidas espécies descritas posteriormente, como *E. halli* e *E. contorta*. Atualmente, considera-se a ocorrência de apenas três espécies (*E. miyarii*, *E. nieschulzi* e *E. separata*) como parasitas de *R. norvegicus*^{11 16}.

* Realizado no Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

No Brasil, já foram encontradas duas espécies — *E. nieschulzi*¹⁰ e *E. miyarii*¹² — parasitando o tubo digestivo de *R. norvegicus*.

O objetivo do presente trabalho é determinar a prevalência de parasitismo por *Eimeria* em exemplares de *R. norvegicus* capturados no município de São Paulo, além de estudar alguns aspectos das relações hospedeiro-parasita. Ao mesmo tempo, relata-se, pela primeira vez, a presença de *E. separata* em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

No período compreendido entre maio de 1977 e agosto de 1978, capturaram-se vivos 166 exemplares de *R. norvegicus*, em diversos pontos do município de São Paulo. Após anestesia com éter, pesavam-se os ratos com o objetivo de avaliar sua idade, segundo critério descrito por CALHOUN⁵, de acordo com o qual ratos com até 100 gramas são considerados jovens, os com peso entre 100 e 200 gramas são adolescentes e os com peso corporal superior a 200 gramas são adultos.

Após a necropsia dos animais, determinou-se a prevalência de infecção por coccídeos do gênero *Eimeria* através do exame micros-

cópico de material obtido por raspagem da mucosa intestinal. Quando se encontravam oocistos de *Eimeria*, estes eram medidos com ocular micrométrica e, a seguir, o material era conservado em solução de dicromato de potássio a 2%, para permitir a esporulação dos oocistos e novo exame microscópico.

A classificação das espécies obedeceu a critério descrito por ROUDABUSH¹⁸.

RESULTADOS

Encontraram-se duas espécies de coccídeos do gênero *Eimeria*, distinguíveis por sua morfologia e dimensões: *E. nieschulzi* e *E. separata* (ver figura).

Entre os 166 ratos examinados, 81 (48,79%) albergavam uma ou ambas as espécies de *Eimeria*. Encontrou-se *E. separata* em 56 (33,73%) animais, *E. nieschulzi* em 11 (6,63%); 14 (8,43%) animais apresentavam-se parasitados por ambas as espécies. Não se assinalou a presença de *E. miyarii* em nenhum dos murídeos examinados.

As tabelas 1 e 2 mostram a prevalência de parasitismo por *Eimeria* conforme o peso (idade), sexo e local de captura dos roedores.

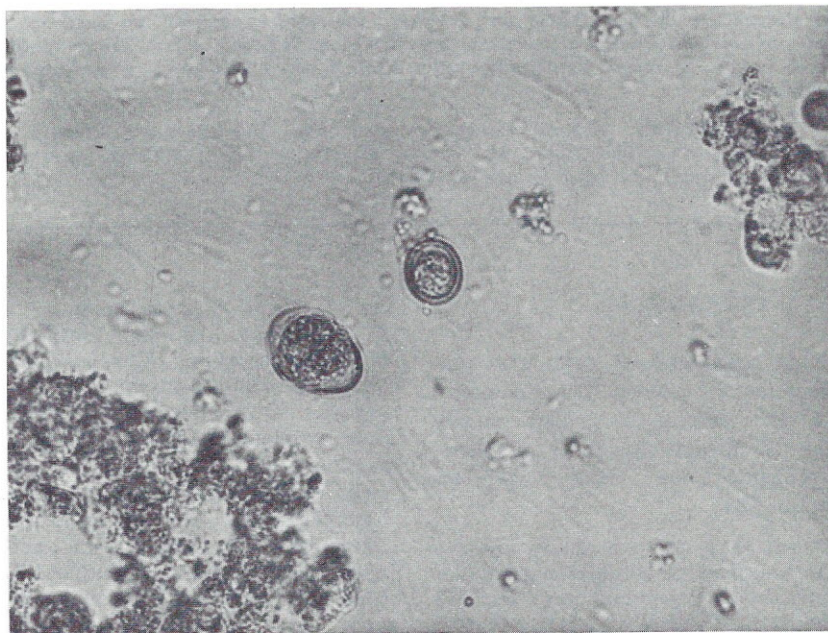


FIGURA — Oocistos imaturos de *Eimeria nieschulzi* (maior diâmetro) e de *Eimeria separata* (menor diâmetro). 600 x.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

São escassos os trabalhos que estudaram a ocorrência de coccídeos parasitas de ratos em nosso país. PINTO¹³, em 1928, assinala a presença de *E. carinii*, posteriormente considerada sinonímia de *E. miyarui*, em *R. norvegicus*, e FRÓES¹⁰, em 1976, registra a infecção deste mesmo roedor por *E. nieschulzi*. Em outros países, diversos pesquisadores demonstraram a ocorrência dessas espécies e de *E. separata* como parasitas de *R. norvegicus*^{3, 4, 14}.

Nossos resultados mostram a ocorrência de infecção por *Eimeria* em 48,79% dos animais necropsiados, assinalando-se a presença de duas espécies diferentes, *E. nieschulzi* e *E. separata*, facilmente distinguíveis por suas dimensões e morfologia características. É interessante destacar que esta é a primeira vez em que se assinala *E. separata* em nosso meio e que esta espécie apresentou nítido predomínio sobre *E. nieschulzi*.

Diversos estudos, em nível experimental, demonstraram a existência de mecanismos de resistência imunitária nas infecções de vertebrados por protozoários do gênero *Eimeria*, resultando em proteção total ou parcial a reinfeições^{2, 10, 15, 17}. Os dados obtidos em condições de campo, no presente trabalho,

falam a favor da existência destes mecanismos protetores, uma vez que ocorreu nítido e significativo decréscimo na prevalência de infecção quando aumentou o peso (idade) dos ratos examinados. Assim, enquanto 80,64% dos animais com menos de 100 gramas se mostrou parasitado por alguma espécie de *Eimeria*, apenas 29,80% dos ratos com peso superior a 100 gramas eliminou oocistos do parasita.

A análise dos dados expressos na tabela 2 mostra que não houve diferença significativa na prevalência de infecção de *R. norvegicus* por *Eimeria* quando se considerou o sexo dos animais parasitados e que os ratos procedentes da zona sul do município apresentaram maior prevalência de infecção do que os capturados na zona norte.

Com relação à ocorrência de parasitismo associado entre *E. nieschulzi* e *E. separata* no mesmo roedor, os resultados sugerem a inexistência de interações negativas ou mecanismos competitivos entre ambas as espécies, pois a prevalência de parasitismo associado verificada (8,43%) é significativamente superior à que teoricamente se esperaria e que se pode representar matematicamente pelo produto das prevalências de cada espécie⁷. Tal fato corrobora o achado de DUSZYNSKI⁹ em condições experimentais.

TABELA 1

Prevalência de parasitismo por *Eimeria nieschulzi* e *Eimeria separata* em 166 exemplares de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo (1977-78), conforme peso do hospedeiro

Murídeos	Até 100 g		101 — 200 g		201 — 500 g		Total	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Coccídeos								
<i>E. nieschulzi</i>	7	11,29	3	5,76	1	1,92	11	6,63
<i>E. separata</i>	33	53,22	15	23,85	8	15,38	56	33,73
Parasitismo associado	10	16,13	2	3,85	2	3,85	14	8,43
Negativos	12	19,86	32	61,54	41	78,85	85	51,21
Total	62	—	52	—	52	—	166	—

TABELA 2

Prevalência de parasitismo por *Eimeria nieschulzi* e *Eimeria separata* em 166 exemplares de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo (1977-78), conforme sexo e local de captura do hospedeiro

Murídeos Coccídeos	Sexo				Local de Captura						Total	
	Macho		Fêmea		Zona Norte		Zona Sul		Outras		N.º	%
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%		
<i>E. nieschulzi</i>	7	7,60	4	5,40	1	1,28	6	7,79	4	36,36	11	6,63
<i>E. separata</i>	31	33,68	25	33,78	23	29,48	31	40,27	2	18,18	56	33,73
Parasitismo Associado	9	9,77	5	6,77	3	3,85	11	14,28	—	—	14	8,43
Negativos	45	48,95	40	54,05	51	65,39	29	37,66	5	45,46	85	51,21
Total	92	—	74	—	78	—	77	—	11	—	166	—

DIAS, R.M.D.S.; CHIEFFI, P.P.; TORRES, D.M.A.G.V. & MANGINI, A.C.S. — Parasitas do gênero *Eimeria* (Coccidia, Eimeriidae), *E. separata* e *E. nieschulzi*, em *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):101-105, 1981.

DIAS, R.M.D.S.; CHIEFFI, P.P.; TORRES, D.M.A.G.V. & MANGINI, A.C.S. — The occurrence of *Eimeria* parasites (Coccidia, Eimeriidae) in *Rattus norvegicus* captured in São Paulo county, SP, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2): 101-105, 1981.

ABSTRACT: The prevalence of coccidial parasitism in *Rattus norvegicus* in São Paulo county, state of São Paulo, Brazil, was determined. Of the 166 rat specimens captured during the period from May 1977 to August 1978, 48.8% were parasitized by parasites belonging to the *Eimeria* genus. Of the 81 parasitized specimens, 33.7% harboured *E. separata*, 6.6%, *E. nieschulzi* and 8.4% harboured both species. There was a clear decrease with age (estimated from the weight) which suggest operation of immunity but there was no apparent influence of sex. The specimens captured in the southern subdivision of the county showed a significantly higher prevalence as compared with those rats captured in the northern subdivision.

DESCRIPTORS: *Rattus norvegicus*, parasitism by *Eimeria*; *Eimeria* in *Rattus norvegicus*, São Paulo, SP, Brasil; *Eimeria separata*; *Eimeria nieschulzi*; rats, coccidial parasitism.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKER, E.R. & HALL, P.R. — *Eimeria separata*, a new species of coccidium from the Norway rat (*Epemys norvegicus*). *Iowa St. Coll. J. Sci.*, 6:131, 1931.
2. BECKER, E.R.; HALL, P.R. & HAGER, A. — Quantitative, biometric and host-parasite studies on *Eimeria miyarui* and *Eimeria separata* in rats. *Iowa St. Coll. J. Sci.*, 6:299-316, 1932.
3. BELTRÁN, E. & PEREZ, R. — Protozoarios parásitos de las ratas en la ciudad de México. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop.*, 11:71-8, 1950.
4. BONFANTE, R.; FAUST, E.C. & GIRALDO, L.E. — Parasitological surveys in Calli (Colombia). IX. Endoparasites of rodents and cockoactihes in Vard Siloe, Calli, Colombia. *J. Parasit.*, 47:843-6, 1961.
5. CALHOUN, J.B. — *The ecology and sociology of the norway rat*. Washington, U.S. Gov. Print Off., 1962.
6. CHIEFFI, P.P.; GRISPINO, D.M.A.; DIAS, R.M.D.S.; MANGINI, A.C.S. & GUEDES, M.L.S. — Interação entre helmintos parasitas intestinais de murídeos capturados no município de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:159-63, 1980.
7. CONDER, G.A. & DUSZYNSKI, D.W. — The immunizing potential of sporulated oocysts of *Eimeria nieschulzi* exposed to heat and Co-60 gamma-radiation. *J. Parasit.*, 63: 206-9, 1977.
8. DIEBEN, C.P.A. apud BECKER².
9. DUSZYNSKI, D.W. — Host and parasite interactions during single and concurrent infections with *Eimeria nieschulzi* and *E. separata* in the rat. *J. Protozool.*, 19: 82-8, 1972.
10. FRÖES, O.M. — Novos registros para a fauna parasitária do Rio Grande do Sul. *An. Fac. Med. Porto Alegre*, 36:23-6, 1976.
11. LEVINE, N.D. — *Protozoan parasites of domestic animals and of man*. 2nd ed. Minneapolis, Minn., Burgess, c1973.
12. OHIRA, apud BECKER, E.R. — Catalog of *Eimeriidae* in genera occurring in vertebrates and not requiring intermediate hosts. *Iowa St. Coll. J. Sci.*, 31:85-139, 1956.
13. PINTO, C. — *E. carinii* nova espécie. Parasita de *Mus (E.) norvegicus* do Brasil. *Bol. Biol. Lab. Parasit.*, 1:127-8, 1928.
14. ROMERO RODRIGUEZ, J. — Contribución al estudio de los *Protozoa-Eimeriidae* parásitos de *Epemys norvegicus* (B.) en Granada (España). *Rev. Iber. Parasit.*, 39:73-9, 1979.
15. ROSE, M.E. & LONG, P.L. — Resistance to *Eimeria* infection in the chicken; the effects of thymectomy, bursectomy, whole body irradiation and cortisone treatment. *Parasitology*, 60:291-9, 1970.
16. ROUDABUSH, R.L. — The endogenous phases of the life cycles of *Eimeria nieschulzi*, *Eimeria separata*, and *Eimeria miyarui* coccidian parasites of the rat. *Yowa St. Coll. J. Sci.*, 11:135-63, 1937.
17. WAXLER, S.H. — Immunization against cecal coccidiosis in chickens by the use of X-ray attenuated oocysts. *J. Am. vet. med. Ass.*, 99:481-5, 1941.

Recebido para publicação em 6 de julho de 1981.

HERPESVIRUS HOMINIS: ESTADO ATUAL DA FREQUÊNCIA DOS ANTICORPOS EM HABITANTES DA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL *

Luís F. de SALLES-GOMES **
Mary Eixo SAKUMA **
Suely Pires CURTI ***

RIALA6/533

SALLES-GOMES, L.F.; SAKUMA, M.E. & CURTI, S.P. — *Herpesvirus hominis*: estado atual da frequência dos anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 41(2):107-114, 1981.

RESUMO: De 485 soros colhidos entre maio e julho de 1980 de habitantes da cidade de São Paulo, Brasil, submetidos a titulações para a presença de anticorpos para *Herpesvirus hominis*, pelo método de imunofluorescência indireta, 389 (80%) foram positivos. Verificou-se que até 4 anos de idade, 38% dos habitantes e até os 14 anos, mais de 90% já possuíam estes anticorpos no sangue circulante. Na idade de 3 anos foi verificada a maior frequência da infecção. Não foram constatadas maiores diferenças entre os achados atuais e os verificados anteriormente em São Paulo. Em relação à tendência da curva de frequência dos anticorpos, nossos dados são similares aos de alguns autores e diferentes dos de outros.

DESCRITORES: *Herpesvirus hominis*, frequência de anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

Atualmente os herpesvirus têm merecido atenção especial dos pesquisadores em razão de apresentarem três manifestações básicas resultantes da interação vírus-célula e vírus-hospedeiro, quais sejam: provocarem infecções sintomáticas ou assintomáticas no hospedeiro; capacidade de persistirem no hospedeiro na forma latente; alguns têm capacidade comprovada de transformar células, produzindo neoplasias no seu hospedeiro natural ou em outros.

Não sabemos até hoje, no caso do *Herpesvirus hominis* (HVH) ou vírus do herpes simples, que tipo de interação se estabelece entre o vírus, a célula e o hospedeiro, que resulta em infecção completamente assintomática em alguns casos e, em outros, em manifestações clínicas moderadas ou graves; em outros, ainda, simplesmente em recorrência da manifestação clínica.

Embora existam teorias para explicar a latência de certos vírus no organismo humano, ainda não há explicação para o fato de o sistema imunitário admitir a persistência ou latência de alguns vírus, em lugar de eliminá-los totalmente. O organismo humano tanto na infecção primária como na recorrência causada pelo vírus do herpes simples defende-se através do sistema imunitário, limitando a infecção ao local infectado, impedindo sua generalização, evoluindo para a cicatrização e cura clínica. Nesta luta contra o vírus, entram em cena, além de outros fatores, os linfócitos T, os macrófagos e os anticorpos específicos (imunoglobulinas), impedindo estes últimos principalmente outras reinfecções, inibindo a disseminação do vírus de célula a célula e favorecendo a lise do vírus pelo sistema retículo-endotelial (SRE).

A presença destes anticorpos no sangue circulante pode ser demonstrada através de provas sorológicas com as quais, conseqüentemente, poderemos avaliar se o organismo

* Realizado no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Estagiária E-1 do Instituto Adolfo Lutz.

foi ou não infectado pelo HVH alguma vez em sua vida. A frequência destes anticorpos é diretamente dependente da incidência da infecção, seja sintomática ou não, e variável, dependendo do nível sócio-econômico da população estudada.

Numerosos autores têm publicado trabalhos sobre a frequência da infecção na população considerada normal de diversos países^{2, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14} e os resultados, no cômputo geral, são similares com variações discretas de um país para outro. No Brasil, em revisão da literatura, só encontramos os dados publicados por RODRIGUES & CARVALHO¹¹, em 1965, que realizaram inquérito sorológico através da prova de neutralização em sistemas celulares, para verificação da frequência dos anticorpos para HVH em número limitado da população da cidade de São Paulo.

Nosso trabalho tem a finalidade de apresentar os resultados obtidos com inquérito sorológico realizado em grupos etários de habitantes de São Paulo, capital, para a verificação atual (em 1980) da frequência da infecção através da titulação de anticorpos específicos para o vírus de herpes simples pelo método da imunofluorescência indireta. Tem também o objetivo de comparar os dados obtidos com os resultados anteriores, em 1965, já que autores¹⁴ demonstraram que, com o correr do tempo, pode haver mudanças na distribuição dos anticorpos, segundo a idade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de soros

Durante três meses, de maio a julho de 1980, foram colhidos 1023 soros de pessoas que procuravam o Instituto Adolfo Lutz para fazer exames de rotina para carteira de saúde e decorrentes de consultas médicas. Foram eliminados aqueles que vinham com guia médica onde a suspeita clínica era de infecção em atividade.

Após o término da colheita, a distribuição da amostra foi julgada satisfatória porque tínhamos mais que 100 soros por faixa etária dividida da seguinte maneira: de 1 a 4 anos de idade, de 5 a 9 anos, de 10 a 14 anos, de 15 a 19 anos, de 20 a 24 anos, de 25 a 29 anos, de 30 a 34 anos, de 35 a 39 anos e maior ou igual a 40 anos de idade. Nesses grupos etários, a distribuição da população quanto ao sexo foi de 2 mulheres para 1 homem.

As 1023 amostras de soros foram numeradas e submetidas a sorteio, das quais 50 a 60 foram escolhidas para representar cada grupo etário. Portanto, 485 amostras foram analisadas sendo que 25 correspondem à faixa etária de 1 a 11 meses de idade.

As amostras foram colhidas com assepsia por punção venosa e, após retração do coágulo em temperatura ambiente, o soro era separado

por centrifugação e conservado em congelador a -20°C , sem ser inativado até o momento de uso.

Vírus

O vírus do herpes simples utilizado neste estudo foi a amostra padrão ou referência denominada McIntyre do *Herpesvirus hominis* tipo 1 (HVH-1), a qual vem sendo mantida em nosso Serviço há anos, em linhagem celular contínua de rim de macaco africano denominado VERO que, por sua vez, foi obtida do Banco de Células dos E.U.A. e mantida pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. As células recebidas para o desenvolvimento deste trabalho foram resultantes do 187.^o repique.

Antígeno

O antígeno para as reações de imunofluorescência indireta era preparado por inoculações do vírus (HVH-1) em tubos de células VERO que, quando demonstravam 3 ou 4 + (plus) de efeito citopático causado pelo vírus, eram removidas do tubo, retirando-se o meio de manutenção e adicionando-se ATV a cada tubo, com a finalidade de se desprenderem as células da parede do tubo. Igual volume de células não infectadas foi removida da mesma maneira.

Na feitura das lâminas, dispúnhamos apenas uma gota de suspensão de células infectadas, equivalendo a 0,025 ml, e o mesmo volume, com as células não infectadas, para controle.

As lâminas após secagem e fixação com acetona gelada (-20°C) eram embrulhadas em papel e estocadas em congelador a -70°C .

A reação de imunofluorescência indireta usada foi basicamente a descrita por RAWLS⁹ e RAWLS *et alii*¹⁰.

Empregaram-se diluições dobradas das amostras de soro a partir de 1:8 em PBS (tampão-fosfato) com pH 7,2.

O resultado em microscopia fluorescente só era computado como positivo quando, na mesma lâmina, os controles do soro nas mesmas diluições, conjugado e células não inoculadas, não demonstravam qualquer fluorescência.

A intensidade da fluorescência foi tomada em escala de 1 a 4 + (plus) e o ponto final da reação foi tomada como a diluição mais alta do soro que resultasse em 50% de intensidade de fluorescência, isto é, 2 + (plus).

A leitura da reação foi sempre realizada, por dois dos autores, em microscópio Zeiss para fluorescência, com filtro 2 F1.

Além dos controles normais, a reação foi sempre controlada com soro anti-HVH tipo 1 obtido de coelhos imunes a partir da amos-

tra padrão do vírus. Soros de coelho antes da inoculação para a imunização e depois de imunizados foram os controles negativos e positivos, respectivamente. As antiglobulinas humana e de coelho, marcadas com fluoresceína, não conferiam qualquer fluorescência nas células infectadas com o vírus (antígeno).

A divisão dos grupos etários com intervalos de 5 anos foi empregada para a avaliação dos resultados porque é a recomendada pela Organização Mundial da Saúde.

RESULTADOS

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada em 485 soros para verificar a presença de anticorpos para HVH. Destes soros, 389 foram considerados positivos, isto é, continham anticorpos para o vírus porque apresentaram na reação intensidade de fluorescência compatível com os valores de 2 ou + (plus), a partir da diluição original do soro que foi de 1:8. Os 96 soros que não apresentaram qualquer traço de fluorescência ou

a apresentaram com discreta ou quase nula intensidade foram considerados negativos.

Os resultados obtidos em nosso trabalho, segundo os grupos etários estudados, são apresentados na tabela 1.

Dos 25 soros de 0 a 11 meses, 10 foram positivos e 15 negativos; a distribuição que mais interessa a epidemiologia é a de 0 a 6 meses, que revelou 75% de soros positivos e a de 7 a 11 meses, que resultou em 7,7% de soros positivos. O exame destes dados indica que a positividade de 75% deve-se, obviamente, aos anticorpos adquiridos pela criança através da mãe, isto é, anticorpos transplacentários. Com muitas probabilidades, os restantes negativos devem-se ao esgotamento destes anticorpos citados: ou ao fato de a mãe nunca ter sido infectada com o vírus do herpes simples.

O resultado de 7,7% nos soros de 7 a 11 meses revela queda da positividade devido ao aumento do esgotamento dos anticorpos maternos. Esta queda atingiu proporções aproximadas de 90% em relação aos dados obtidos com os soros de 0 a 6 meses.

TABELA 1

Frequência de positividade da reação de imunofluorescência indireta para *Herpesvirus hominis*, em 485 soros de doadores de São Paulo, por grupos etários

Grupos etários (anos)	Soros testados n.º	Soros negativos	Soros positivos	
		n.º	n.º	%
0 — 6 m*	12	3	9	75
7 — 11 m*	13	12	1	7,7
1 — 4	50	31	19	38
5 — 9	50	18	32	64
10 — 14	50	4	46	92
15 — 19	50	5	45	90
20 — 24	50	8	42	84
25 — 29	50	7	43	86
30 — 34	60	1	59	98,3
35 — 39	50	5	45	90
≥ 40	50	2	48	96
TOTAL	485	96	389	—

* m = meses

Embora o número de amostras nesta faixa seja relativamente pequeno para afirmações mais categóricas, verificamos que, do 7.^o ao 11.^o mês, o total de soros foram negativos, com única exceção. O único soro positivo poderia ser resultante da demora do esgotamento dos anticorpos maternos ou de uma infecção primária sintomática ou não, pelo vírus de herpes simples.

Verifica-se, de acordo com os dados apresentados, que até os 4 anos de idade menos da metade da população estudada (38%) foi infectada pelo vírus e que entre 5 a 9 anos mais da metade da população (64%) já foi infectada; portanto, apresentando anticorpos para HVH. Ainda, segundo os nossos dados, verifica-se que até os 14 anos de idade mais de 90% da população já teve infecção pelo vírus do herpes simples. Desta idade em diante, as variações obtidas não são dignas de nota; a não ser no último grupo etário estudado (igual ou maior que 40 anos), onde ainda persistem os anticorpos em mais de 90% da população.

Se desdobrarmos a positividade encontrada no grupo etário de 1-4 anos por causa de interesse óbvio de saber em que idade se verifica a maior frequência da infecção, obteremos dados mostrados na tabela 2. Com esses dados, podemos constatar que a média nos dois primeiros anos de vida foi coincidentemente a mesma, isto é, 25% de indivíduos infectados, e que a média dos 3-4 anos agrupados resultou em 50% de infectados. Isto permite afirmar que, na Cidade de São Paulo, a infecção não aumenta gradativamente, ao contrário, na média do 3.^o e 4.^o anos de vida houve adição de 100% a mais de infectados, quando relacionado ao número de infectados obtidos na média de 1 e 2 anos (tabela 2).

Ainda, se considerarmos a percentagem adicional de infectados em cada ano de vida no grupo etário de 1-4 anos, vamos verificar que do 2.^o para o 3.^o ano de vida houve um adicional de 146% (25 a 61,53%) do número de infectados; o que mostra que, exatamente no 3.^o ano de vida, é que se encontrou o maior número de infecções primárias sintomáticas ou não pelo *Herpesvirus hominis* tipo 1.

Generalizando, nossos resultados foram semelhantes àqueles encontrados por outros autores, como BURNET & LUSH², em 1939, BUDDING *et alii*¹, em 1953, KIBRICK & GOODING⁵, em 1965, SMITH *et alii*¹³, em 1967 e no único trabalho da literatura nacional de RODRIGUES & CARVALHO¹¹ publicado em 1965 (ver figura na p. 112).

A inclinação da curva ascendente da frequência dos anticorpos seguiu mais de perto as curvas de Budding, de Burnet & Lush, e de Rodrigues & Carvalho, e diferiu das encontradas em Tóquio (SMITH *et alii*¹³) e Edimburgo (SMITH *et alii*¹³) que revelaram de 70 a 80% de frequência de infectados somente nos grupos etários de 30 a 40 anos.

Algumas diferenças com o trabalho nacional feito anteriormente em São Paulo¹¹ correriam por conta dos 18 anos de diferença em que foram feitos os inquéritos e/ou pela diferença entre as metodologias empregadas.

Os resultados obtidos neste trabalho, em que 82,4% da população estudada (de 1 a 40 ou mais anos) possui anticorpos para a infecção pelo HVH, são pouco superiores (7,2%) aos encontrados por Rodrigues & Carvalho. Isto decorre, com grandes probabilidades, do fato de que a nossa amostragem foi colhida em 1980, isto é, 18 anos após o trabalho desse autor.

TABELA 2

Frequência de positividade da reação de imunofluorescência indireta para *Herpesvirus hominis* encontrada no grupo etário de 1-4 anos, na cidade de São Paulo, 1980

Idade (anos)	Soros testados n. ^o	Soros positivos	
		n. ^o	%
1	12	3	25,00
2	12	3	25,00
3	13	8	61,53
4	13	5	38,46
Total	50	19	—

Enquanto que Rodrigues & Carvalho demonstraram que em 1962 a maior incidência da infecção herpética ocorria no 2.º ano de vida (75%), em nosso trabalho verificamos que a maior prevalência da infecção ocorreu no 3.º ano.

Em relação aos títulos de anticorpos para HVH, verificamos, à simples inspeção, que não houve diferença marcante entre os resultados da Média Geométrica de cada grupo etário estudado (tabela 3).

Ao contrário, as variações mínimas indicam tendência da manutenção pelo organismo humano de níveis destes anticorpos durante o decorrer da idade; provavelmente, através de recorrências esporádicas da infecção, sejam elas clinicamente visíveis ou não, segundo sugerem alguns autores.

TABELA 3

Média geométrica por grupos etários dos títulos obtidos pela reação de imunofluorescência indireta

Idade	Média geométrica dos títulos
1 — 4	27,47
5 — 9	23,63
10 — 14	36,20
15 — 19	30,09
20 — 24	30,49
25 — 29	25,40
30 — 34	29,13
35 — 39	26,19
≥ 40	26,14

DISCUSSÃO

Existe correlação comprovada entre os títulos de anticorpos fluorescentes para HVH e a imunidade apresentada pelo indivíduo a essa infecção; títulos de anticorpos em imunofluorescência indireta, embora mais altos seguem paralelamente aos obtidos pela prova de neutralização realizada em sistemas celulares³.

Diante desses fatos, acrescidos da especificidade do antígeno e do uso de controles padrões, não temos dúvidas em afirmar que em nosso trabalho estávamos titulando os anticorpos específicos para a infecção causada pelo *Herpesvirus hominis*.

A partir de 1965-67 tem-se conhecimento da existência de pelo menos dois tipos de vírus do herpes simples, isto é, HVH tipo 1 e HVH tipo 2. Vários autores afirmam que é simples distingui-los pelos métodos já divulgados, mas, por outro lado, é bastante difícil a distinção dos anticorpos devidos ao tipo 1 e 2. É óbvio que, qualquer que seja o método empregado para distingui-los vamos ter determinado grau de reação cruzada entre os anticorpos para os HVH tipo 1 e tipo 2. Somente processos de adsorção com células infectadas com o tipo de vírus heterólogo e processos como a cinética da neutralização e redução de placas, imunofluorescência indireta após adsorção são capazes de distinguir esses dois anticorpos. No entanto, em nosso trabalho, estávamos titulando anticorpos para a infecção pelo vírus do herpes simples englobando os produzidos pelos tipos 1 e 2, atentando para o interesse da pesquisa que era verificar o número de indivíduos na população que estava imune e/ou susceptível a esta infecção.

Por outro lado, há evidências comprovadas de que o *Herpesvirus hominis* tipo 2 é transmitido, com várias exceções, através do intercuro sexual e que, tanto nos homens como nas mulheres, estes anticorpos começam a ser demonstrados na população somente após os 14-16 anos de vida. É possível desta maneira inferirmos que, até esta faixa de idade, os anticorpos demonstrados em nossas reações com raríssimas exceções, devem-se à infecção pelo HVH tipo 1.

É lógico que há interesse em nosso país em sabermos qual a idade em que se inicia a infecção pelo HVH tipo 2 já que a sua transmissão é feita essencialmente através do intercuro sexual, pois que, cada dia mais vão se avolumando as estatísticas sobre a ocorrência do herpes genital, seja ele primário ou recorrente, e sua correlação com o carcinoma do cervix uterino.

Importante sob o ponto de vista da validade dos nossos dados e inferências é o tamanho da amostragem empregada em nosso trabalho, que foi representativa e homogênea comparados os grupos etários entre si. É de máxima importância que os resultados advindos da amostragem represente ou seja o espelho do momento atual pois, neste trabalho, as amostras foram todas colhidas entre maio a julho de 1980. Evitou-se que a colheita se estendesse em demasia para representar também determinada situação epidemiológica (corte).

A metodologia que usamos é extremamente prática quando comparada a outros métodos como a neutralização clássica em tubos, microneutralização em placas, redução de placas ou lesões, usando camada de ágar, os quais usam sistemas celulares, sendo por esta razão bastante dispendiosos, requerem mais tempo para fazê-los e a leitura final prolonga-se até o quinto ou sétimo dia de observação.

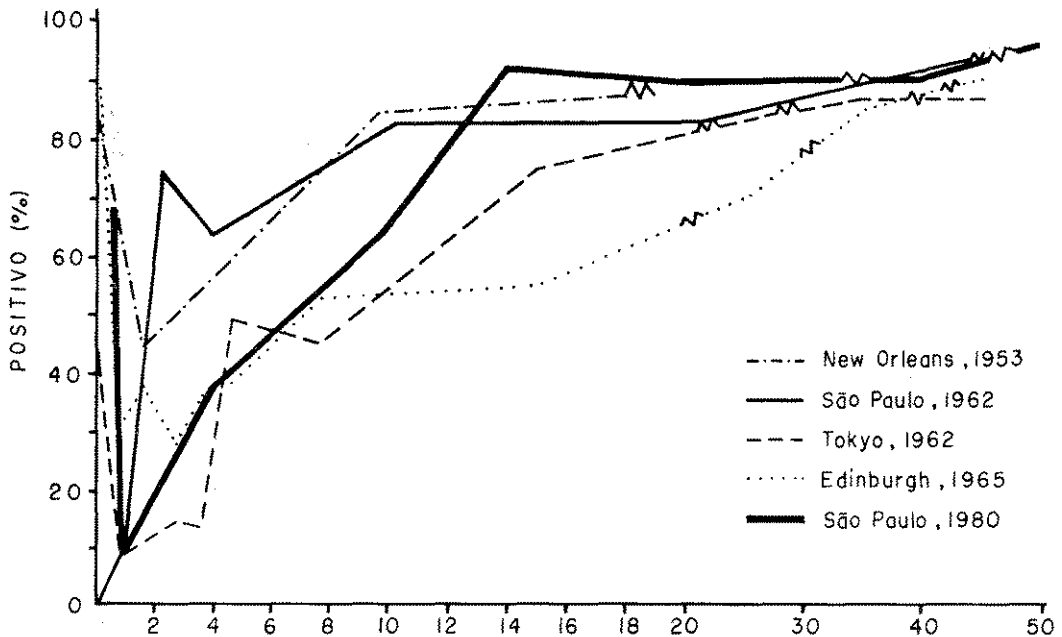


FIGURA — Gráfico demonstrativo da frequência de anticorpos para *Herpesvirus hominis* na cidade de São Paulo (1962 e 1980) e em outras cidades.

Por estas razões a imunofluorescência indireta e a hemaglutinação indireta são os métodos preferidos para qualquer estudo em massa, visando demonstrar anticorpos na população estudada³. É imperioso afirmar que, em amostra do tamanho da que envolve nosso estudo, dificilmente poderíamos utilizar os métodos de sistemas celulares decorrentes das razões citadas.

A reação antigênica cruzada entre herpes simples e varicela-zoster demonstrada por KAPSENBERG⁴, em 1964, e ROSS & SAHRP¹², em 1965, constitui, na realidade, um problema mais diagnóstico que epidemiológico, principalmente para a determinação da etiologia de certos quadros clínicos difíceis de serem diagnosticados como os atípicos e encefalites.

Quando se trata de diagnóstico com soros obtidos na fase aguda e na convalescença, o aumento mais significativo de título é sempre observado na infecção pelo vírus homólogo¹².

Estas reações cruzadas são mais pronunciadas quando os soros examinados são de portadores de infecção heteróloga recente ou

em atividade; em nosso caso, o inquérito foi realizado em indivíduos considerados normais, isto é, sem qualquer evidência clínica de infecção em atividade, principalmente a causada por estes dois vírus. Se em nosso trabalho titulamos também anticorpos heterólogos como o da varicela-zoster, não podemos quantificá-los e, sem dúvida como afirma SMITH *et alii*¹³, todos os inquéritos epidemiológicos feitos até hoje englobam esta possibilidade.

Entretanto, segundo JOHNSON *et alii*⁸, em 1979, o anticorpo fluorescente detectado pela reação de imunofluorescência indireta para herpes simples é tão sensível e específico quanto o demonstrado pela reação de microneutralização em sistemas celulares, sendo os autores taxativos em afirmar que o antígeno de HVH não demonstrou qualquer imunofluorescência em soros contendo conhecidamente anticorpos para varicela, citomegalovírus e Epstein-Barr.

Dos critérios usados para as leituras das reações, vale a pena comentar que se a diluição inicial utilizada fosse de 1:16 e não 1:8, como usamos corretamente, teríamos ao re-

dor de 4,5% de positividade a menos do total encontrado neste trabalho, o que não interferiria em qualquer tendência da distribuição dos dados ou qualquer inferência tomada.

Em relação à tendência ou inclinação da curva de frequência dos anticorpos (infecção) é interessante salientar que Yoshino em 1962, em Tóquio, afirmava que houve diferença visível e bem detectável nos inquéritos feitos com anos de diferença em Tóquio. A diminuição do número total dos infectados deve-se, segundo o autor, a condições de melhoria de vida do indivíduo, moradia, condições de higiene e de saúde pública que melhoraram neste intervalo de tempo¹⁴.

A observação e análise dos resultados de inquéritos realizados por numerosos autores torna cada vez mais aparente que, num levantamento sorológico, as condições sócio-econômicas dos indivíduos têm influência importante nos resultados^{15,16}. Assim, grupos sócio-econômicos mais elevados ou diferenciados

demonstram menor incidência da infecção e, conseqüentemente, menor frequência de anticorpos que os apresentados pelos grupos mais pobres. Provavelmente, se tivéssemos elegido um grupo especial para estudo como, por exemplo, profissionais liberais ou universitários, as probabilidades de infecção pelo vírus do herpes simples seriam, com certeza, menores que as encontradas nos resultados aqui apresentados. Resta indagar em que percentagem estes grupos especiais representariam a população.

Em nosso trabalho, não interessou qualquer outra opção senão a de verificar qual era o número de indivíduos de cada grupo etário que representasse a classe social predominante na cidade de São Paulo, isto é, a grande massa de trabalhadores e familiares que procuram a Previdência Social ou Postos de Saúde do Estado para atendimento gratuito, à procura de carteiras de saúde, atestados e consultas. Aliás, é a situação da grande massa da população do país.

RIALA6/533

SALLES-GOMES, L.F.; SAKUMA, M.E. & CURTI, S.P. — Present status of the frequency of antibodies against *Herpesvirus hominis* in inhabitants of São Paulo City, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):107-114, 1981.

ABSTRACT: Indirect immuno-fluorescence revealed antibodies against *Herpesvirus hominis* in 80% of 485 serum specimens collected during May, June and July 1980 from inhabitants of São Paulo City, state of São Paulo, Brazil. The sera from donors in the 1-4 years age group showed 38% of positivity while 90% was found in the 9-14 year group. The results are similar to those from another study conducted in the same city in 1962 and from some studies conducted in other countries.

DESCRIPTORS: *Herpesvirus hominis*, antibodies, frequency in inhabitants of São Paulo City, state of São Paulo, Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUDDING, G.J.; SCHRUM, D.I.; LANIER, J.C. & GUIDRY, D.J. — Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics*, 11:595-610, 1953.
2. BURNET, F.M. & LUSH, D. — Herpes simplex. Studies on the antibody content of human sera. *Lancet*, 1:629-31, 1939.
3. JOHNSON, L.D.; FUCILLO, D.A.; STALDER, H.; OXMAN, M.A.; FRASER, C.E.O. & MADDEN, D.L. — Comparison of indirect hemagglutination and indirect immunofluorescence tests with microneutralization tests for detection of type-specific *Herpesvirus hominis* antibody. *J. clin. Microbiol.*, 9:384-90, 1979.
4. KAPSENBERG, J.G. — Possible antigenic relationship between varicella-zoster virus and herpes simplex virus. *Arch. gesamte Virusforsch.*, 15:67, 1964.
5. KIBRICK, S. & GOODING, G.W. apud SMITH, I.W.; PEUTHERER, J.F. & MacCALLUM, F.O.¹⁸.
6. McDONALD, A.D.; WILLIAMS, M.C.; WEST, R. & STEWART, J. — Neutralizing antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in Montreal women. *Amer. J. Epidemiol.*, 100:125-9, 1974.
7. NAHMIA, A.J.; JOSEY, W.E.; NAIB, Z.M.; LUCE, C.F. & DUFFEY, A. — Antibodies to *Herpesvirus hominis* types 1 and 2 in humans. I. Patients with genital herpetic infections. *Amer. J. Epidemiol.*, 91:539-46, 1970.

SALLES-GOMES, L.F.; SAKUMA, M.E. & CURTI, S.P. — *Herpesvirus hominis*: estado atual da frequência dos anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):107-114, 1980.

8. NAHMIA, A.J.; JOSEY, W.E.; NAIB, Z.M.; LUCE, C.F. & GUEST, B.A. — Antibodies to *Herpesvirus hominis* types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. *Amer. J. Epidemiol.*, 91:547-52, 1970.
9. RAWLS, W.E. — Herpes simplex virus types 1 and 2 and herpesvirus simiae. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Diagnostic procedures for: viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, D.C., APHA, c1979.
10. RAWLS, W.E.; IWAMOTO, K.; ADAM, E. & MELNICK, J.L. — Measurement of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. *J. Immunol.*, 104:599-606, 1970.
11. RODRIGUES, M.C. & CARVALHO, R.P.S. — Estudo da distribuição etária de anticorpos neutralizantes contra o vírus do herpes simples em São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 7:323-6, 1965.
12. ROSS, C.A.C. & SHARP, J.H.S. — Antigenic relationship of varicella-zoster and herpes simplex. *Lancet*, 2:708-11, 1965.
13. SMITH, I.W.; PEUTHERER, J.F. & MACCALLUM, F.C. — The incidence of *Herpesvirus hominis* antibody in the population. *J. Hyg., Camb.*, 65:395-408, 1967.
14. YOSHINO, K.; TANIGUCHI, S.; FURUSE, R.; NOJIMA, T.; FUGIL, T.; MINAMITARI, M.; TADA, R. & KUBOTA, H. — A serological survey for antibodies against herpes simplex with special reference to comparatively heat-labile complement-fixing antibodies. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 15: 235-47, 1962.

Recebido para publicação em 9 de julho de 1981.

LESÕES VISCERAIS EM DOIS CASOS FATAIS CONSEQUENTES AO MANUSEIO DE AGROTÓXICOS *

Evandro Pimenta de CAMPOS **
Leonel COSTACURTA ***
Ruggero Bernardo Guidugli FELICE ****
Roberto A. Pinto PAES *
Conceição Gonçalves Caldeira CURY *****

RIALA6/534

CAMPOS, E.P.; COSTACURTA, L.; FELICE, R.B.G.; PAES, R.A.P. & CURY, C.G.C. — Lesões viscerais em casos fatais consequentes ao manuseio de agrotóxicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):115-120, 1981.

RESUMO: São apresentados dois casos de pacientes com lesões viscerais do fígado e rins consequentes ao manuseio inadequado de um agrotóxico, o dicloreto de paraquat 1,1'-dimetil-4,4'-dipiridílio dicloreto (Gramoxone) e chamam a atenção para um tipo especial de hepatite tóxica; descrevem o tipo de lesão hepática e sua topografia intralobular, assim como lesões graves nos túbulos renais, com formação de sais de cálcio. São feitas considerações sobre as vias de absorção do tóxico e das áreas de predileção de atuação dentro do lóbulo hepático, assim como sobre o diagnóstico diferencial com outros tipos de hepatite tóxica.

DESCRITORES: hepatite tóxica; envenenamento por herbicida; dicloreto de paraquat (Gramoxone); nefrose.

INTRODUÇÃO

O problema de pragas e doenças na agricultura tem sido discutido desde as mais remotas épocas, passando por fases diversas o seu combate, atingindo a atualidade, na qual são intensamente usados os produtos químicos sintéticos, catalogados como agrotóxicos. Devemos enfatizar que esses agrotóxicos necessários ao aumento da produção de alimentos são, no entanto, responsáveis importantes pelo desequilíbrio ecológico, por provocarem a poluição da água, do solo e dos alimentos, causando a morte de milhares de peixes, anfíbios, aves, mamíferos e do próprio homem. Este é atingido não só por

intoxicações pequenas, mas também pelas sucessivas e acumulativas intoxicações cujos danos raramente são detectados; através de intoxicações maciças, agudas portanto, o indivíduo é conduzido à morte rapidamente, como nos dois casos apresentados.

O Brasil adotou franca e abusivamente os agrotóxicos¹. O uso de defensivos agrícolas — herbicidas, fungicidas e inseticidas — por hectare de terra cultivada alcança uma porcentagem mais alta que a observada em outros países que se dedicam à agricultura. Basta citar que a importação destes produtos, em 1980, ultrapassou a cifra de 330 milhões de dólares, segundo informação da

* Realizado na Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. Apresentado no 15.º Congresso Brasileiro de Patologia, Belo Horizonte, 1981.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

*** Do Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo, S. Paulo, SP.

**** Do Hospital do Vale do Ribeira de Pariquera-Açu, Pariquera-Açu, SP.

***** Estagiária da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz.

ANDEF*. Não é, pois, de se admirar que o nosso homem do campo, menos avisado ou não instruído sobre os agrotóxicos, use e abuse inconscientemente desses defensivos. Sem uma orientação adequada, esses venenos provocaram a morte de indivíduos, várias vezes anunciada pela imprensa de nosso país.

Além de lesões crônicas progressivas provocadas por esses venenos, devem ser esperadas alterações genéticas. Experimentalmente tem sido demonstrada a ação danosa de agrotóxicos**, derivados fosforados e clorados que, agindo com certa cronicidade e em mínimas doses, provocam quebras cromossômicas e causam mutações gênicas.

Há, portanto, necessidade de se educar urgentemente sobre o uso de defensivos agrícolas nas escolas rurais e nas unidades da área da Agricultura, que são os órgãos adequados para isso. O papel da Saúde Pública é o de intensificar a educação sanitária, juntamente com os setores da Secretaria da Agricultura, responsáveis pela orientação no uso de produtos agrotóxicos, junto ao agricultor.

MATERIAL E MÉTODO

O material de nosso trabalho é constituído por fragmentos de vísceras de indivíduos que faleceram em regiões agrícolas do litoral do Estado de São Paulo, os quais haviam manipulado em suas lavouras um agrotóxico à base de dicloreto de paraquat 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (Gramoxone). Dos dois casos recebemos fragmentos de fígado e, de um deles, fragmentos de rins. Não nos foram enviados fragmentos de outras vísceras. As amostras dessas vísceras foram fixadas em solução de formol a 10% e tratadas pelas técnicas usuais em histopatologia.

RESULTADOS

Lesões do fígado — São representadas no caso 1 pela intensa necrose de células hepáticas, com escassa ou nula presença de células inflamatórias, junto à vênula centrolobular, e pela colestase intensa (fig. 1a); essa necrose vai diminuindo de intensidade à medida em que se aproxima dos espaços porta, onde se nota infiltrado inflamatório crônico e alguns eosinófilos (fig. 1b). Há necroses focais de grupos de hepatócitos em todo o parênquima hepático. Observa-se também pigmento biliar em grande número de células citologicamente conservadas. Onde a lesão é mais intensa, a vênula centrolobular perde a sua estrutura, desaparecendo as células endoteliais e permanecendo um tecido eosinófilo levemente granuloso. Trombos biliares são vistos nos colangiolos; nas áreas de necrose,

há raros neutrófilos esparsos e dilatação acentuada dos capilares.

Lesões renais — As preparações histológicas mostram intenso e difuso processo degenerativo tubular (fig. 1c) com precipitação de sais de cálcio (fig. 1d) e conservação da maioria dos glomérulos.

No caso 2 as alterações hepáticas são menos acentuadas, porém com as características do caso 1: nota-se discreta necrose centrolobular (fig. 1e), necroses focais difusas (fig. 1f) e necrose eosinófila de hepatócitos (fig. 1g). Podem ser notados ainda trombos biliares e pigmento biliar intracelular. Há discreta colangite crônica (fig. 1h). A dilatação capilar também é intensa, como no caso 1.

DISCUSSÃO

Os achados histológicos das lesões viscerais permitem-nos discutir o mecanismo de ação dessas substâncias⁷ de alta toxicidade, que são manuseadas pelo homem do campo; elas penetram em seu organismo e vão lesar órgãos vitais através dos seguintes meios: a) pela absorção, em contato com a pele; b) pela respiração, inaladas com a aspersão; c) pela ingestão de alimentos contaminados.

Absorvido através da pele (fig. 2), o tóxico alcança o coração direito pelas cavas superior e inferior; através dos pulmões, chega ao coração esquerdo pelas veias pulmonares. Através dos intestinos, ele chega ao fígado pelo sistema porta, e retorna ao coração direito pelas veias hepáticas e cava inferior. Através da circulação arterial, o tóxico atinge os rins e demais vísceras. Através dos vasos porta direito e porta esquerdo segmentares, interlobulares e seus ramos, os sangues, venoso e arterial, se misturam nos capilares sinusóides hepáticos; estes sangues arterial e venoso fluem da periferia para o centro do lóbulo hepático, levando não só nutrientes, mas também a substância tóxica; esta passa para os espaços de Disse, através das fenestraçãoes existentes entre as junções das células endoteliais de Kupffer. A superfície do hepatócito que olha para o espaço de Disse apresenta numerosos microvilos^{8,9}, que preenchem quase que totalmente o referido espaço; seria através destas formações que a substância tóxica penetraria no citoplasma celular. Desta forma, o paraquat pode concentrar-se e provocar lesões hepáticas centrolobulares, e em outras áreas do lóbulo hepático^{8,9}.

Tal peculiaridade é evidente em patologia; com freqüência as alterações do fígado ocorrem de preferência na região central ou nas áreas mais periféricas do lóbulo hepático. As necroses focais seriam devidas à ação local

* Associação Nacional de Defensivos Agrícolas, São Paulo, SP.

** Informação pessoal de A. Beçak, do Instituto Butantã, São Paulo, Brasil, 1981.

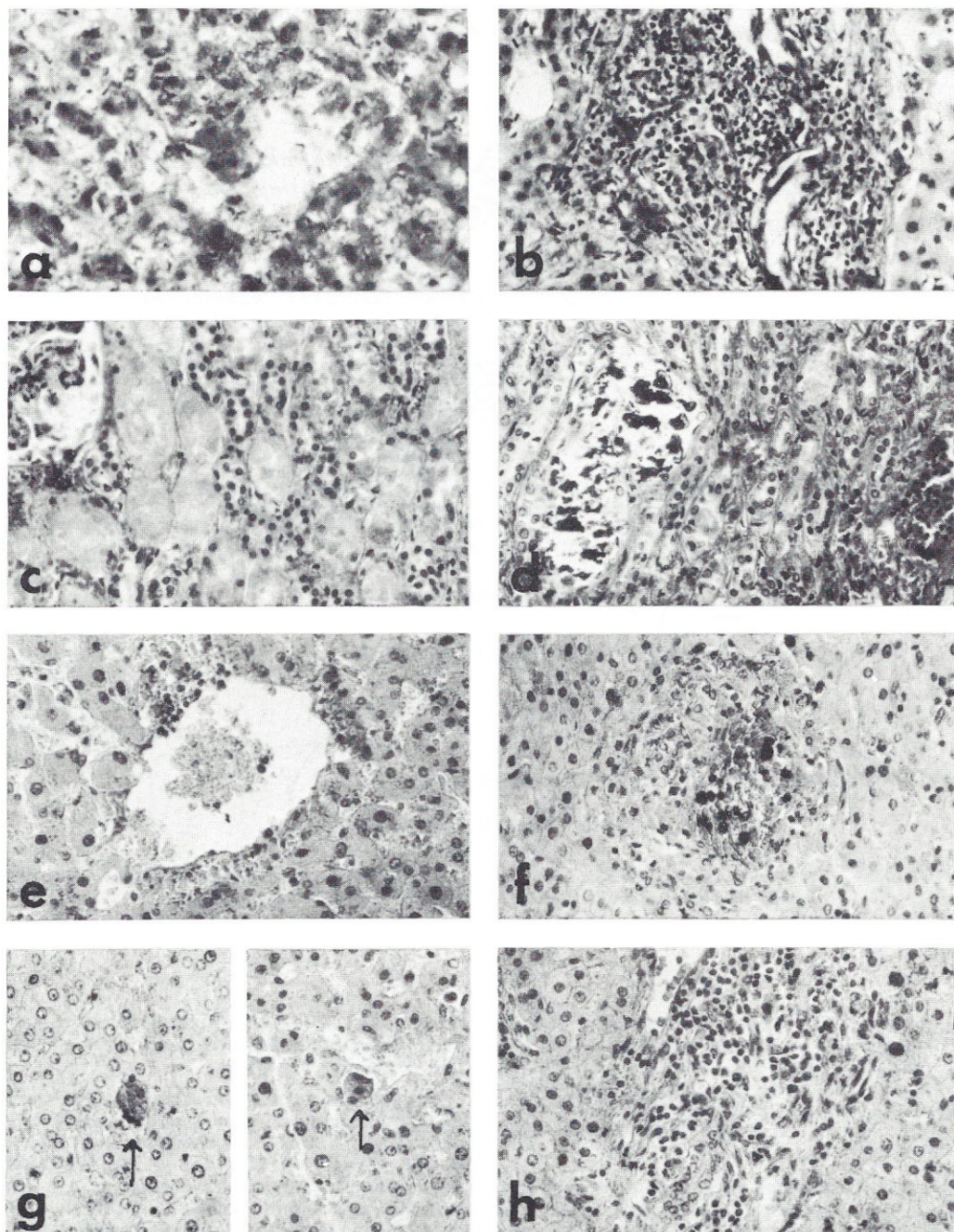


FIGURA 1 — Cortes histológicas das lesões viscerais: a) necrose centrolobular do fígado; b) colangite intensa; c) necrose tubular da camada medular do rim; d) formação de sais de cálcio no rim; e) necrose centrolobular discreta do fígado; f) necrose focal do fígado; g) necrose eosinofílica de hepatócitos; h) colangite discreta. 160 x.

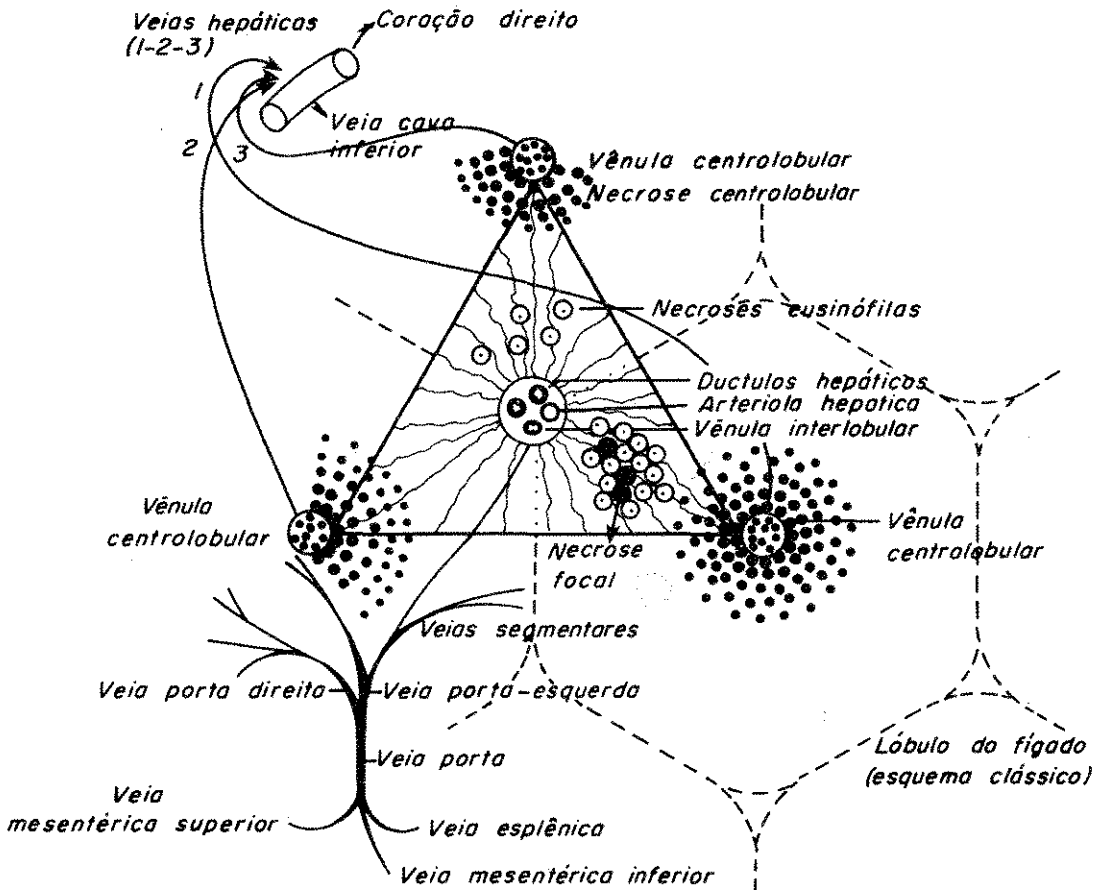


FIGURA 2 — Prováveis vias de absorção e áreas de localização do dicloreto de paraquat. Diagrama baseado no conceito de RAPPAPORT⁷ (1958), referente ao lóbulo porta.

do tóxico em baixa concentração; assim, agindo sobre uma célula, teríamos a necrose eosinófila; o pigmento aparece nas células pouco lesadas, enquanto que os grânulos de pigmento são libertados das células destruídas e se localizam como trombos biliares nos colangiólos.

Se admitirmos que cada tipo de tóxico tem uma área predileta de atuação dentro do lóbulo hepático^{2, 4, 5, 8, 9}, como notamos no envenenamento pelo tetracloreto de carbono, pelo fósforo, pelo antimônio etc., poderíamos sugerir que há grupos de hepatócitos mais sensíveis a determinados tóxicos, assim como haveria também grupos especiais para a loca-

lização de certos vírus como o da febre amarela, que tem preferência pela área mediozonal do lóbulo hepático.

Os agrotóxicos são substâncias empregadas na agricultura, de composição química diversa, o que lhes confere diversos graus de toxicidade, em alguns, tão elevada, que a prática condena seu uso. Seu mecanismo de ação e local de atuação variam também conforme a sua composição química. Nos nossos casos foi usado um produto comercial à base de paraquat, herbicida extremamente perigoso se absorvido pelo organismo humano. Há vários produtos comerciais deste herbicida, sob diferentes nomes de fantasia, alguns mistura-

dos com outros herbicidas, na proporção de 25 g por cento. Em virtude de sua grande solubilidade na água, este herbicida¹⁰ pode facilmente penetrar no organismo humano pelas vias já analisadas. Sua toxicidade¹, DL/50 mg (dose letal 50%) via oral, é de 150 mg por kg de peso corpóreo para cachorros, 70 mg/kg para carneiros, 262 mg/kg para galinhas e de 104 mg/kg para camundongos. Em virtude de casos fatais conhecidos, a dose letal para o homem foi estimada em 4 mg/kg de peso. Diante de tão alta toxicidade, o uso do paraquat deve ser abolido.

Alguns dos efeitos tóxicos para o homem são lesões das unhas, irritação da pele e olhos; quando inalado, há sangramento nasal e dispnéia, provocando lesões pulmonares graves, com fibrose irreversível e morte⁴. Ao apresentarmos este nosso trabalho no Congresso por nós citado em rodapé, os patologistas da Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas confirmaram casos fatais com fibrose pulmonar. O prof. Leo Lencioni, de Rosário, Argentina, referiu também vários casos fatais de agricultores que manusearam agrotóxicos.

Em nossos 2 casos observamos hepatite tóxica e nefrose. Pelos exames histopatológicos das amostras recebidas, constatamos que o paraquat age diretamente sobre as células hepáticas e sobre o epitélio dos túbulos renais, necrosando-os. O tipo de necrose hepática difere daquele encontrado em outros casos de envenenamento, como no de tetracloreto de carbono, onde há necrose centrolobular acompanhada de degeneração gordurosa microgoticular, como no caso do fósforo, em que há necroses focais disseminadas na periferia do lóbulo hepático, como no envene-

namento pelo antimônio, que atinge extensa área do lóbulo hepático, dando aspecto de carta geográfica; no envenenamento pelo arsênico, em que há esteatose hepática difusa e discretíssimo infiltrado inflamatório; no envenenamento pelo chumbo, em que as lesões só são conhecidas quando evoluem para a cirrose do tipo micronodular, lembrando a cirrose de Laennec. Quanto ao paraquat, produz necrose centrolobular, necroses focais, necrose eosinofílica e colangite crônica, variando essas lesões de intensidade, conforme a concentração do tóxico no sangue.

CONCLUSÃO

O uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura, além de provocar o desequilíbrio ecológico, vem ocasionando a morte do homem do campo, que não recebe o necessário ensinamento para seu manuseio. Certos produtos, como os compostos dipiridílicos, entre eles o paraquat, têm alto poder tóxico, desaconselhando-se o seu uso, como foi feito em alguns países. Os casos de morte são conseqüentes às lesões viscerais graves, como as que constatamos em nossos casos, para o lado do fígado e rins, além daquelas já referidas na literatura, para o lado dos pulmões, cérebro, miocárdio e supra-renais¹. Este fato nos obriga a chamar a atenção dos responsáveis, nas áreas dos produtos tóxicos, comercializados para agricultura, no sentido de ser restringido seu uso e ministrados ensinamentos adequados ao homem do campo quanto à sua aplicação. A coleta e análise de fragmentos de todas as vísceras, em casos fatais, devem ser práticas correntes para avaliação histopatológica.

RIALA6/534

CAMPOS, E.P.; COSTACURTA, L.; FELICE, R.B.G.; PAES, R.A.P. & CURY, C.G.C. — Visceral lesions in two fatal cases occurring in farm workers handling pesticides. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):115-120, 1981.

ABSTRACT: Two workers who handled an agrototoxic product, the paraquat dichloride 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (Gramoxone) died. Pathological examination disclosed severe lesions of kidney tubules with calcium deposits as well as a toxic hepatitis whose necrotic lesions were mainly intralobular; Considerations are made on the possible areas of absorption of the toxic, its affinity for the liver lobules and on the differential histologic diagnosis with other types of toxic hepatitis.

DESCRIPTORS: hepatitis, toxic; herbicide poisoning; paraquat dichloride (Gramoxone); nephrosis;

CAMPOS, E.P.; COSTACURTA, L.; FELICE, R.B.G.; PAES, R.A.P. & CURY, C.G.C. — Lesões viscerais em dois casos fatais conseqüentes ao manuseio de agrotóxicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41 (2):115-120, 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Divisão de Defesa Sanitária Vegetal — *Prevenção de acidentes no uso de defensivos*. [Brasília, s.d.] 74 p.
2. CAMPOS, E.P. — Hepatite epidêmica. Estudo histopatológico — Diagnóstico diferencial com as outras hepatites. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 16:14-36, 1956.
3. COSTACURTA, L. — *Histologia*. São Paulo, Artes Médicas, 1969. p. 253-6.
4. DREISBACH, R.T. — *Manual de envenenamentos: diagnóstico, tratamento*. Traduzido e adaptado por Sanuel Schwartzman. São Paulo, Atheneu/Ed. USP, 1975. p. 131-2.
5. ELIAS, H. — A re-examination of the structure of the mammalian liver. II. The hepatic lobule and its relation to the vascular and biliary system. *Am. J. Anat.*, 85:379-456, 1949.
6. MONGIER, C. — *Précis des maladies du foie*. Paris, Octave Doin, 1905. p. 21-37.
7. RAPPAPORT, A.M. — The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat. Rec.*, 130:673-689, 1958.
8. RHODIN, J.A.G. — *An atlas of ultrastructure*. Philadelphia, Saunders, 1963. p. 72-73.
9. STEINER, J.W.; PHILLIPS, M.Y. & MIYAL, K. — Ultrastructural and subcelular pathology of the liver. *Int. Rev. exper. Pathol.*, 13:65-72, 1964.
10. WORTHING, C.R., ed. — *The pesticide manual. A world compendium*. 6th ed. Croydon, British Crop Protection Council, 1979. p. 399-400.

Recebido para publicação em 17 de janeiro de 1981.

ANTICORPOS ESPECIFICOS DAS CLASSES IgG, IgM E IgA PARA PARACOCCIDIOIDE BRASILIENSIS DOSADOS ATRAVÉS DA REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA NO SORO DE PACIENTES E SUA CORRELAÇÃO COM O TEMPO DE EVOLUÇÃO E FORMA CLÍNICA DA DOENÇA *

Sônia França Correia BARBOSA **
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Jorge CHACHA ***
Luiz Carlos CUCE ***
Celeste FAVA NETTO ****

RIALA6/535

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C.
— Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

RESUMO: Foram estudados 18 pacientes com paracoccidiodomicose com a finalidade de comparar a reação de imunofluorescência indireta com as reações de fixação de complemento e precipitação feita em tubos. Foi constatada correlação da reação de imunofluorescência indireta e da reação de fixação de complemento, tendo sido sugerido o seu emprego no diagnóstico da doença. Não foi possível correlacionar a presença de IgG, IgM e IgA específicas para *Paracoccidioide brasiliensis* com as formas clínicas da doença; no entanto, notou-se que imunoglobulinas do tipo IgM estavam presentes em doentes com comprometimento ganglionar. Quanto ao tempo da doença verificou-se que o IgA específico para *P. brasiliensis* apresentava-se sempre positivo em maior porcentagem nos casos de tempo de evolução inferior a um ano.

DESCRIPTORIOS: paracoccidiodomicose, técnicas de diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Atualmente o diagnóstico laboratorial da paracoccidiodomicose é feito em nosso meio através das seguintes provas: pesquisa direta do parasita nas lesões, intradermo-reação (IDR) e reações sorológicas; entre estas, as mais utilizadas são a de fixação de complemento (FC)² e a de precipitação em tubos (PP)¹.

Os títulos de anticorpos, medidos através da reação de fixação de complemento, dão

uma boa avaliação prognóstica da moléstia. A reação de precipitação em tubos detecta anticorpos mais precocemente do que a reação de fixação de complemento. Todavia, existe um bom número de casos em que não se demonstram anticorpos precipitantes, mesmo quando a moléstia se encontra em atividade¹. Quanto à IDR, verificou-se que a positividade não ultrapassava 90% com qualquer dos tipos de antígenos empregados nesta reação. Destaca-se, ainda, que os pacientes gravemente enfermos reagem negativamente ao teste intradérmico.

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.

**** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

Trabalhos de RESTREPO & MONCADA⁶, e de FRANCO *et alii*⁷ sugerem o uso da reação de imunofluorescência indireta (IFI) no diagnóstico da paracoccidiodomicose.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o emprego da reação IFI para o diagnóstico da moléstia e, neste sentido, propomos-nos a: a) comparar a reação de IFI com as reações de FC e PP no soro de pacientes portadores da moléstia; b) quantificar nestes soros, através da reação IFI, com emprego de conjugados monoespecíficos, as diferentes classes de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e tentar relacioná-los com alguns parâmetros clínicos, como a forma da doença e o tempo de evolução da mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros

Foram examinados 18 soros de pacientes de paracoccidiodomicose, provenientes da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todos os casos foram confirmados por exame histopatológico ou biópsia. Realizaram-se levantamento e estudo dos prontuários dos respectivos pacientes, para a obtenção dos seguintes dados: procedência, idade, cor, tempo de evolução da doença e tipo de lesões apresentadas pelos portadores da moléstia. Foram estudados também 30 soros de portadores de outras micoses, com FC negativa (19 com candidíase, 9 com histoplasmose e 2 com a doença de Jorge Lobo).

Como controles normais foram coletados 23 soros de doadores de sangue, supostamente saudáveis. Todos os soros foram inativados a 56°C, durante 30 minutos, e conservados a -20°C, sem a adição de preservativos.

Antígeno para reação de imunofluorescência indireta

A cepa *P. brasiliensis* utilizada para a extração do antígeno foi isolada de doente clinicamente diagnosticado, tendo sido mantida por subcultivo em garrafa de Roux com 150 ml de ágar Sabouraud, por uma semana, a 37°C.

As culturas, após este período de tempo, foram suspensas em solução salina, contendo 0,1% de formaldeído*, e submetidas a agitação constante por 18 horas, a 4°C.

O *P. brasiliensis* foi separado por centrifugação, a 1 400 g, sob a temperatura de -4°C, durante 10 minutos, sendo em seguida lavado 3 vezes em solução salina tamponada (pH 7,2) e acertada a concentração final por leitura em espectrofotômetro** (650 nm para D.O. ± 0,523). O antígeno foi depositado em lâminas de imunofluorescência, que foram

secadas ao ar e/ou em estufa a 37°C, e finalmente fixado em chama, sendo em seguida as lâminas embrulhadas em papel alumínio e mantidas a -20°C.

Conjugado

Foram empregados os conjugados anti-Ig total, anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA humanas, obtidos de coelhos (do Instituto Adolfo Lutz), marcados com isotiocianato de fluoresceína, sendo a especificidade dos conjugados comprovada por imunoelektroforese.

Reação de imunofluorescência indireta

Foi realizada segundo a técnica de RESTREPO & MONCADA⁶, tendo sido feitas diluições sucessivas em todos os soros acima, de razão 2 até 1:1024 (com o uso dos conjugados específicos, foram tituladas as imunoglobulinas totais e as frações IgG, IgM e IgA, específicas para *P. brasiliensis*. Soros com título de anticorpo Ig total igual ou maior de 1:16 foram considerados como positivos.

Reação de fixação de complemento

Foi realizada, segundo a técnica descrita por FAVA NETTO⁸, usando-se os soros acima referidos.

Reação de precipitação em tubos

Foi realizada segundo a técnica descrita por FAVA NETTO⁸, usando-se os soros acima referidos.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados obtidos com os 18 soros de pacientes portadores da moléstia, submetidos às reações de IFI, FC e PP, com antígeno polissacarídico. Nos 18 casos com lesões em atividade, 100% foram positivos nas reações de IFI e FC, enquanto apenas 16,6% foram positivos no teste PP.

A tabela 2 relaciona a forma clínica da doença apresentada nos pacientes com paracoccidiodomicose e a positividade dos anticorpos IgG, IgM e IgA, específicos para *P. brasiliensis*, titulados por IFI. Verifica-se que o IgG apresenta positividade em todas as formas clínicas, enquanto o mesmo não ocorre com o IgM, que se tornou positivo nos casos em que existia lesão ganglionar (2 doentes na forma linfática e 3 doentes na forma mista) e em um caso na forma mista com lesões cutâneas viscerais que acarretaram várias internações. Quanto ao IgA, a positividade encontrada foi de 4 casos de forma tegumentar, 2 de forma linfática e 5 de forma mista.

* E. Merck, solução a 35%.

** Bauch & Lomb, spectronic 88.

TABELA 1

Resultados das reações de imunofluorescência indireta, fixação de complemento e precipitação em tubos em 18 soros de pacientes portadores de paracoccidiodomicose, frente ao tempo de evolução da doença e tipo de lesão apresentada

Paciente	Tempo de evolução	Tipo de lesão	Classificação da lesão	Imunofluorescência indireta (título)				Fixação de complemento	Precipitação em tubos
				Y	IgG	IgM	IgA		
M. T. A.	8 a	cutânea-mucosa-pulmonar	mista	1:256	1:256	neg.	neg.	124,0	neg.
B. A. S.	1 a	cutânea-pulmonar	mista	1:128	1:128	neg.	1:4	23,0	neg.
D. M. P.	3 a	mucosa (lábio)-pulmonar	mista	1:128	1:128	neg.	1:16	12,0	neg.
R. R.	35 d	mucosa-pulmonar	mista	1:256	1:256	neg.	neg.	17,0	neg.
C. A. O.	12 a	cutânea-visceral	mista	1:128	1:128	1:16	1:32	34,0	neg.
L. M. A.	3 a	cutânea-mucosa-ganglionar	mista	1:256	1:32	1:32	neg.	177,0	pos. (++++)
H. H.	1 a	cutânea-pulmonar-ganglionar	mista	1:256	1:256	1:32	1:16	135,0	pos. (++)
R. F. O.	1 a	mucosa-ganglionar	mista	1:64	1:64	1:16	1:4	3,5	neg.
D. S.	1 a	ganglionar	ganglionar	1:128	1:128	1:64	1:16	144,0	pos. (++++)
L. P. F.	5 a	ganglionar	ganglionar	1:256	1:64	1:16	1:32	54,0	neg.
E. R.	6 a	cutânea	tegumentar	1:256	1:256	neg.	neg.	11,0	neg.
H. S.	2 a	cutânea-mucosa	tegumentar	1:256	1:128	neg.	neg.	20,0	neg.
J. R. L.	2 a	cutânea-mucosa	tegumentar	1:512	1:256	neg.	1:16	69,0	neg.
P. P.	4 m	mucosa (lábio)	tegumentar	1:256	1:256	neg.	1:16	26,0	neg.
P. C.	7 a	cutânea-mucosa	tegumentar	1:64	1:64	neg.	neg.	165,0	neg.
L. F. R.	3 m	mucosa (lábio)	tegumentar	1:32	1:32	neg.	1:16	19,7	neg.
J. A. C.	7 a	mucosa (lábio)	tegumentar	1:64	1:64	neg.	neg.	55,0	neg.
P. P.	4 m	mucosa	tegumentar	1:64	1:32	neg.	1:32	2,7	neg.

d = dias
m = meses
a = anos

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCHE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidiodiopsis brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioides brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

TABELA 2

Relação entre a forma clínica apresentada pelos pacientes de paracoccidioidomicose e a positividade dos anticorpos IgG, IgM e IgA demonstrada por imunofluorescência indireta

Forma clínica	N.º de casos	N.º de casos positivos		
		Anticorpos		
		IgG	IgM	IgA
Tegumentar	8	8	0	4
Linfática	2	2	2	2
Mista	8	8	4	5
Total de casos	18			

Relacionando-se o tempo de evolução da doença e a presença de imunoglobulinas G, M e A de anti-*P. brasiliensis* (tabela 3), nota-se que o IgG não apresentou variações, sendo positivo em todos os casos, enquanto que o IgM apresentou maior número de casos, 37,5%, no intervalo compreendido de 1 a 12 meses, e 20%, de 13 meses a doze anos. Estas diferenças não foram significativas porque, como foi demonstrado pelos resultados da tabela 2, a presença de IgM está mais ligada à forma clínica de que ao tempo de evolução da doença.

Quanto à presença de IgA, verifica-se que maior porcentagem, 87,5%, situa-se na faixa de 1 a 12 meses de idade, baixando para 40%, na faixa de 13 meses a 12 anos. Os 8 casos compreendidos num intervalo de 1 a 12 meses apresentaram-se positivos, com exceção de um caso de 35 dias.

Foi verificada a presença de reações cruzadas frente ao antígeno utilizado na IFI (tabela 4). Cinquenta e três soros controle (19 de candidíase, 9 de histoplasmose, 2 de doença de Jorge Lobo e 23 de doadores de sangue, supostamente sadios), negativos na reação de FC, foram testados frente a células de *P. brasiliensis* e os títulos de anticorpos totais foram comparados com os dos pacientes de paracoccidioidomicose.

Observou-se a presença de reação cruzada com os 2 soros provenientes de portadores da doença de Jorge Lobo.

Quanto aos restantes soros do grupo-controle, observamos que 43 soros não foram reativos e 8 não tiveram títulos de anticorpos superiores a 1:8 na IFI para *P. brasiliensis*.

Todos os 18 soros de doentes de paracoccidioidomicose tiveram título de anticorpos igual ou superior a 1:32 na IFI.

TABELA 3

Positividade da imunofluorescência indireta para IgG, IgM e IgA, e tempo de evolução da moléstia

Anticorpos	Tempo de evolução da moléstia			
	1 mês — 12 meses		13 meses — 12 anos	
	Casos		Casos	
	n.º	%	n.º	%
IgG	8	100	10	100
IgM	3	37,5	2	20
IgA	7	87,5	4	40

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

TABELA 4

Títulos de anticorpos em 71 soros determinados por imunofluorescência indireta, em presença de células de *Paracoccidioide brasiliensis*

Grupos	N.º de soros									Total de casos
	Título de anticorpos									
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	Neg.	
Candidíase	2	5	—	—	—	—	—	—	12	19
Histoplasmose	1	—	—	—	—	—	—	—	8	9
Doença de Jorge Lobo	—	—	—	1	1	—	—	—	—	2
Doadores de sangue	—	—	—	—	—	—	—	—	23	23
Paracoccidioidomicose	—	—	—	1	4	4	8	1	—	18

Observação: nota-se presença de reação cruzada somente na doença de Jorge Lobo.

CONCLUSÕES

Das três reações analisadas, a reação de precipitação em tubos mostrou ser a menos sensível, enquanto que houve correlação entre as reações de imunofluorescência indireta e fixação de complemento.

A reação IFI poderá ser utilizada como uma das técnicas com finalidade diagnóstica, apresentando a vantagem de poder ser aplicada em soros anticomplementares.

Embora não se tenha observado nenhuma correlação entre a presença de imunoglobulinas específicas do tipo IgG e IgA e as formas clínicas da doença, a presença de imunoglobulina específica do tipo IgM foi sempre demonstrada nos doentes com comprometimento ganglionar.

A presença de IgA foi verificada em maior porcentagem nos casos de tempo de evolução inferior a um ano.

A reação de IFI para paracoccidioidomicose é específica a partir da diluição de 1:16 do soro.

RIALA6/535

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Class IgG, IgM and IgA antibodies specific for *Paracoccidioidis brasiliensis* titrated through indirect immuno-fluorescence in the serum of 18 patients and their relationship to clinical form and duration of disease manifestations, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

ABSTRACT: A comparison of the indirect immuno-fluorescence test and the complement-fixation and test-tube precipitation tests was made in the sera of 18 patients with confirmed paracoccidioidomycosis. There was agreement between indirect immuno-fluorescence and complement fixation, a result which recommends the use of immuno-fluorescence for diagnosis. No correlation between clinical pictures and the presence of IgG, IgM and IgA specific for *P. brasiliensis* was noted. However, IgM was presented in lymph-node lesions. The specific IgA was found more frequently in patients with illness duration shorter than one year.

DESCRIPTORS: paracoccidioidomycosis, diagnose technics.

BARBOSA, S.F.C.; TAKEDA, A.K.; CHACHA, J.; CUCE, L.C. & FAVA NETTO, C. — Anticorpos específicos das classes IgG, IgM e IgA para *Paracoccidioide brasiliensis* dosados através da reação de imunofluorescência indireta no soro de pacientes e sua correlação com o tempo de evolução e forma clínica da doença. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):121-126, 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAVA NETTO, C. — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 21:99-194, 1961.
2. FAVA NETTO, C. — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com o antígeno polissacarídico. *Arq. Cirurg. clín. exp.*, 18:197-254, 1955.
3. FAVA NETTO, C. — Imunologia da paracoccidiodomicose. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 18:42-53, 1976.
4. FAVA NETTO, C.; FERRI, R.G. & LACAZ, C.S. — Proteinograma e algumas "provas da fase aguda do soro" na blastomicose sul-americana. Estudo comparativo com as reações de fixação do complemento e de precipitação. *Med. Cirurg. Farm.*, 277: 157-63, 1959.
5. FRANCO, M.F.; FAVA NETTO, C. & CHAMMA, L.G. — Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação e comparação dos resultados com a reação de fixação de complemento. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 15:393-8, 1973.
6. RESTREPO, M., A. & MONCADA F., L.H. — Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidiodomycosis. *Appl. Microbiol.*, 24:132-7, 1972.

Recebido para publicação em 20 de julho de 1981.

IMUNODIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA. 1. ANTÍGENO POLISSACARÍDICO PARA A PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA *

Maricy Alves RIBEIRO **
Massami KAWARABAYASHI **
Augusta Kiyomi TAKEDA **

RIALA6/536

RIBEIRO, M.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

RESUMO: Antígenos polissacarídicos F_4 foram extraídos de leptospiros dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *patoc*, cuja relação proteína/carboidrato foi de 1,24 e 0,54, respectivamente. Sua especificidade sorológica foi avaliada na reação de hemaglutinação passiva para o diagnóstico da leptospirose humana. Para tanto, hemácias de carneiro previamente fixadas com glutaraldeído foram sensibilizadas com ambas as preparações. Esta prova foi experimentada em 91 soros obtidos de 35 pacientes com leptospirose, causada presumivelmente pelos sorotipos *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippothyphosa* e *pomona*. Verificou-se que ambas as frações F_4 comportaram-se de maneira semelhante. A reação de hemaglutinação passiva foi gênero específica, bastante sensível, positivando-se precocemente na fase aguda da doença. Foram salientadas as vantagens do emprego do antígeno F_4 *patoc*, por se tratar de sorotipo não patogênico.

DESCRITORES: leptospirose humana, imunodiagnóstico; antígeno polissacarídico de leptospira; prova de hemaglutinação passiva.

INTRODUÇÃO

Desde o trabalho descrito por HINDLE & WHITE¹¹, em 1934, inúmeros autores^{3, 4, 5, 7, 8, 14, 15, 19, 20, 21} têm investigado antígenos estáveis e suas eventuais aplicações em provas diagnósticas das leptospiroses, a fim de substituir ou complementar a prova clássica da soroprecipitação microscópica.

FAINE *et alii*⁹, em 1974, isolaram um antígeno lipopolissacarídico, denominado Fração 4 (F_4), provavelmente situado perto do envelope externo¹⁶ das leptospiros, cujas propriedades biológicas foram estudadas¹⁰, tais como, a produção dos anticorpos anti- F_4 , em coelhos, e seu efeito bactericida *in vitro*, a imunização passiva e ativa com anti- F_4 e F_4 , respectivamente, e sua capacidade protetora em camundongos.

A determinação da eventual especificidade sorológica do F_4 , extraído de sorotipos pertencentes a diferentes sorogrupos, obtida através da hemaglutinação passiva (HAP), mostrou a ocorrência de ampla reação cruzada frente aos respectivos anti-soros específicos de coelhos, quando imunizados por via intravenosa, onde os anticorpos pertenciam à classe de imunoglobulina M, segundo ADLER & FAINE². Estes autores, ao imunizarem coelhos por via intramuscular com o antígeno emulsionado com adjuvante, obtiveram anticorpo IgG, com reações cruzadas muito menos intensas. Todavia, trabalhando com F_4 do sorotipo *patoc*, frente a soros de pacientes acometidos de leptospirose, verificaram reações positivas em altos títulos.

O presente trabalho teve por objetivo a obtenção do antígeno polissacarídico de leptospiros dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

patoc e a sua avaliação na reação de hemaglutinação passiva (HAP) frente a amostras de soros de 35 pacientes com quadro clínico de leptospirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Sorotipos de leptospirosas

Foram utilizados os sorotipos *icterohaemorrhagiae* RGA e *patoc* Patoc I, que foram cultivados em 5,3 litros do meio de Korthoff, modificado, contendo 10% de soro normal de coelho, e incubados a 28°C, durante 9 a 12 dias. As suspensões finais continham aproximadamente 300 organismos por campo microscópico (aumento 400 X).

Antígeno polissacarídico (F₁)

a) Extração

A extração deste antígeno foi feita de acordo com a técnica preconizada por FAINE *et alii*⁹, com algumas modificações, descritas a seguir: culturas de leptospirosas foram fixadas com formaldeído a 1%, a 37°C, por uma hora, e centrifugadas a 16.300 x g*, por 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes com solução salina tamponada fosfatada (SSTF), pH 7,2, ressuspenso nesse mesmo tampão e adicionado a igual volume de NaOH, a 1%. A suspensão foi mantida por 12 horas, a 56°C, com agitação ocasional e, após resfriamento à temperatura ambiente, foi centrifugada a 27.000 x g, por 25 minutos, a 4°C. O precipitado foi desprezado. O sobrenadante teve o pH ajustado para 8,5, com HCl 1 N, e foi adicionado a igual volume de etanol absoluto.

Essa suspensão foi estocada por 12 horas, a 4°C, após o que foi centrifugada a 27.000 x g, por 20 minutos, para remoção do precipitado (fração 1 de Faine⁹); o pH do sobrenadante foi acertado para 3,5 com ácido acético glacial e estocado por 48 horas, a 4°C. O precipitado (fração 2 de Faine⁹) foi removido por centrifugação a 37.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado e precipitado com etanol a 90%, por 3 horas. Após centrifugação a 10.400 x g, por 20 minutos, a 4°C, o precipitado foi ressuspenso em água destilada e, após diálise, reprecipitado 2 vezes com etanol a 90%. O precipitado formado, fração 4 de Faine⁹, que contém o antígeno polissacarídico, foi ressuspenso em salina estéril e estocado a -20°C. Foram obtidos, dessa forma, os antígenos polissacarídicos dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *patoc*, que serão mencionados como F₁ *icterohaemorrhagiae* e F₁ *patoc*.

b) Determinações químicas

O conteúdo de carboidratos foi determinado pelo método da antrona¹⁰, enquanto que a concentração das proteínas foi dosada pelo método de LOWRY *et alii*¹¹.

Prova de hemaglutinação passiva

a) Preparo de hemácias fixadas com glutaraldeído

Hemácias de carneiro foram fixadas com glutaraldeído, conforme técnica descrita por IMAI *et alii*¹².

b) Sensibilização das hemácias fixadas

No momento do uso, as hemácias de carneiro previamente fixadas com glutaraldeído foram lavadas duas vezes em SSTF, pH 7,2. Uma suspensão a 10% dos eritrócitos foi distribuída em 2 tubos marcados, "reação" e "controle", respectivamente. No tubo marcado "reação" foi adicionado 1,9 ml da suspensão de antígeno polissacarídico (F₁), na concentração pré-titulada para cada 0,3 ml da suspensão de hemácias a 10%. No tubo "controle", a suspensão de antígeno foi substituída por SSTF, pH 7,2. Após homogeneização, os eritrócitos foram incubados, a 37°C, por 60 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, as hemácias foram lavadas 3 vezes com SSTF, pH 7,2, e centrifugadas a 755 x g, por 10 minutos. Foram obtidas por essa técnica suspensões a 1%, em SSTF, pH 7,2, de eritrócitos sensibilizados com F₁ *icterohaemorrhagiae* e com F₁ *patoc*.

c) Reação propriamente dita

As amostras de soros a serem examinados foram diluídas em série, na razão log₂, com tampão diluente (soroalbumina bovina a 0,5 g %, diluída em SSTF pH 7,2) em placas de microtitulação em "V", com alças diluidoras de 25 µl. Em cada cavidade da placa foram adicionados 25 µl da suspensão, a 1%, de hemácias sensibilizadas. As placas foram agitadas e colocadas em câmara úmida por 60 minutos, à temperatura de 37°C; em seguida, permaneceram à temperatura ambiente por 18 horas. A leitura foi expressa em título, considerado como sendo a maior diluição do soro onde ainda ocorria a aglutinação de hemácias. Foi considerado significativo o título igual ou maior do que 1:32, com base na mediana de valores obtidos em grupo controle¹⁷.

Soros analisados

Foram utilizadas de 2 a 3 amostras de soro, num total de 91 amostras, obtidas de 35 pacientes com leptospirose cujos títulos de aglutininas específicas foram positivos pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). O intervalo médio, após o início dos sintomas, em que foram colhidas as amostras

* g = aceleração padrão da gravidade (9.807 mm/s²).

foi para a 1.^a amostra de 6 dias, para a 2.^a amostra, de 16 dias e para a 3.^a amostra, de 38 dias. A procedência e os resultados da SAM desses soros estão descritos na parte 2 do presente trabalho (RIBEIRO *et alii*¹⁷). O sorotipo etiológico presumível foi o *icterohaemorrhagiae* em 25 pacientes, o *copenhageni* em 4, o *grippotyphosa* em 3, o *pomona* em um. Nos dois pacientes restantes, os sorotipos não foram claramente determinados pela SAM.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na extração e dosagens químicas dos antígenos polissacarídicos F₁ estão sumarizados na tabela 1, onde se

pode observar que em 5,3 litros de cultura de *icterohaemorrhagiae*, cepa RGA, foram obtidos 28,7 mg, em peso seco, do antígeno polissacarídico (F₁ RGA), sendo 23,43% correspondente a carboidratos e 29,17%, a proteínas. A concentração na diluição ótima sensibilizante foi de 9,56 µg/ml, contendo 2,788 µg/ml de proteína e 2,24 µg/ml de carboidrato.

No mesmo volume de cultura do sorotipo *patoc Patoc I*, foram obtidos 15,6 mg de peso seco de antígeno polissacarídico (F₁ Patoc I), do qual 22,44% corresponde a carboidratos e 12,05% a proteínas; a concentração na diluição ótima sensibilizante foi de 15,60 µg/ml, dos quais 1,879 µg/ml correspondem a proteínas e 3,50 µg/ml, a carboidratos.

TABELA 1

Dosagens químicas dos antígenos polissacarídicos (F₁) obtidos dos sorotipos *icterohaemorrhagiae* RGA e *patoc Patoc I*

Fração F ₁	Cepa de leptospira	
	RGA	Patoc I
Peso seco (mg)	28,70	15,60
Carboidratos (%)	23,43	22,44
Proteínas (%)	29,17	12,05
Concentração na D.O.S. (µg/ml)*	9,56	15,60
Proteínas na D.O.S. (µg/ml)	2,788	1,879
Carboidratos na D.O.S. (µg/ml)	2,24	3,50

* D.O.S. = diluição ótima sensibilizante.

A relação proteína/carboidrato da cepa RGA foi de 1,24, enquanto que a da Patoc I foi de 0,54, demonstrando que este último apresenta um teor de proteína bem menor do que o da cepa RGA, enquanto que o teor de carboidrato se encontra em proporções bem próximas em ambas as cepas.

Os dois F₁ obtidos foram capazes de sensibilizar hemácias de carneiro previamente fixadas com glutaraldeído, possibilitando a execução de reações de hemaglutinação passiva nas amostras de soros humanos em estudo, cujos resultados estão discriminados na tabela 2.

Como se pode observar, os dois lotes de hemácias reagiram com soros provenientes de pacientes cujos agentes infectantes presumíveis eram sorotipos homólogos ou não.

Na tabela 3 encontra-se a comparação dos resultados de HAP, empregando-se eritrócitos sensibilizados com F₁ RGA (cepa homóloga) e com F₁ Patoc I (cepa heteróloga) em cada uma das amostras de soro de pacientes com leptospirose cujo agente etiológico presumível foi o sorotipo *icterohaemorrhagiae*. Com os dois critérios de comparação, isto é, frequência de positividade e frequência de diferença significativa entre os títulos, os resultados obtidos foram idênticos ou similares.

TABELA 2

Títulos das amostras séricas de cada paciente com leptospirose obtidos através de hemaglutinação passiva, empregando-se os antígenos F, icterohaemorrhagiae RGA e F, patoc Patoc I

Paciente	Agente infeccioso presumível Sorotipo	Hemaglutinação Passiva (título 1:)					
		1.ª Amostra		2.ª Amostra		3.ª Amostra	
		RGA	Patoc I	RGA	Patoc I	RGA	Patoc I
1 MFL	<i>icterohaemorrhagiae</i>	128	128	4.096	2.048	512	512
2 ESO	"	8.192	16.384	4.096	1.024	2.048	512
3 IV	"	32	32	4.096	2.048	4.096	1.024
4 LBS	"	32	32	16.384	1.024	512	1.024
5 JAC	"	1.024	512	4.096	1.024	128	512
6 MAS	"	256	512	1.024	1.024	... (*)	...
7 SMA	"	16	64	2.048	512	512	256
8 MS	"	8.192	16.384	4.096	32.768
9 TVP	"	256	256	2.048	2.048
10 PS	"	1.024	1.024	4.096	1.024
11 JCB	"	256	64	512	1.024	256	256
12 MIP	"	1.024	2.048	4.096	8.192
13 ASS	"	1.024	1.024	2.048	2.048
14 FJA	"	1.024	2.048	4.096	8.192
15 JLR	"	1.024	256	512	256	256	256
16 KI	"	4.096	8.192	8.192	8.192
17 JM	"	8.192	8.192	4.096	16.384
18 CRS	"	8	32	1.024	512	256	128
19 MCAS	"	8.192	16.384	2.048	1.024
20 MHK	"	4.096	1.024	512	2.048	512	512
21 JRO	"	512	512	1.024	1.024
22 AN	"	256	512	1.024	2.048
23 FTS	"	256	512	512	1.024	256	256
24 JCS	"	64	64	512	256	64	128
25 CAS	"	512	256	16.384	16.384	8.192	8.192
26 MTS	<i>copenhageni</i>	512	512	1.024	512	512	256
27 JAS	"	256	256	1.024	2.048
28 ACD	"	16	2.048	16	2.048	2.048	1.024
29 IMG	"	1.024	2.048	65.536	8.192	4.096	32.768
30 YK	<i>grippotyphosa</i>	512	256	16.384	2.048	8.192	2.048
31 ARS	"	64	2.048	16.384	65.536	8.192	32.768
32 EVC	"	128	64	512	256	128	256
33 JPM	<i>pomona</i>	512	256	1.024	1.024	128	128
34 JAF	<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>copenhageni</i>	2.048	2.048	1.024	2.048	256	2.048
35 RJS	<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>grippotyphosa</i>	32	64	512	512

(*) As casas vazias (...) indicam amostra não colhida.

TABELA 3

Comparação dos resultados de hemaglutinação passiva executada com os dois antígenos (F₁ RGA e F₁ Patoc I) em cada uma das amostras de soro de pacientes com leptospirose presumivelmente devida ao sorotipo icterohaemorrhagiae

	Soros	N.º de casos			
		Fração F ₁	1.ª amostra	2.ª amostra	3.ª amostra
Frequência de positividade *	RGA		23/25 **	25/25	13/13
	Patoc I		25/25	25/25	13/13
Frequência de diferença significativa *** entre os títulos, favorável a	RGA		3/25	5/25	2/13
	Patoc I		2/25	3/25	2/13

* A mediana dos títulos no grupo controle foi de 1:16.

** Frequência expressa como n.º de casos positivos sobre o total de casos analisados.

*** Diferença de duas ou mais diluições duplas.

DISCUSSÃO

Da análise dos resultados obtidos pode-se constatar que hemácias sensibilizadas com F₁ icterohaemorrhagiae e com F₁ patoc dão reações cruzadas com anticorpos produzidos por vários sorotipos pertencentes a diferentes sorogrupos causadores de leptospirose humana.

Ambas as extrações de F₁ foram preparadas exatamente da mesma maneira e, por conseguinte, as reações cruzadas configuradas na tabela 2 contrastam com os achados de ADLER & FAINE², que não encontraram reatividade cruzada no soro de coelho heterólogo contra F₁ patoc. Tal contraste é bem compreensível, uma vez que é sabido que o sorotipo patoc não funciona como antígeno polivalente de triagem, frente a anticorpos anti-leptospiras produzidos pelas diferentes espécies de animais domesticados.

CHERNUKHA *et alii*⁶, estudando a dinâmica de elaboração dos anticorpos aglutinantes específicos em 1047 soros de 669 pacientes com histórico de doença leptospirótica, verificaram que a formação de microglobulinas e macroglobulinas era simultânea, porém a concentração dos anticorpos 19 S (IgM) excedia consideravelmente a dos anticorpos 7 S (IgG) e a queda de imunoglobulinas da classe G, em toda a evolução da doença, era consideravelmente menor que a de imunoglobulinas da classe M. Assim é que, durante a primeira semana de doença circulam no sangue prin-

cipalmente anticorpos da classe M, cujos títulos aumentam em até 10 vezes até a 4.ª semana da doença, enquanto os níveis de anticorpos IgG atingem os maiores títulos em torno do 20.º dia da doença. Segundo esses mesmos autores, os anticorpos da classe M possuem espectro de reação cruzada bem maior do que aquele pertinente às imunoglobulinas da classe G.

Por outro lado, de acordo com ADLER & FAINE¹, os anticorpos anti-F₁ humanos pertencem à classe de imunoglobulina M, mesmo quando detectados até 10 meses após o início da infecção, o que explicaria o fato de não terem esses anticorpos sua especificidade aumentada durante os diferentes estágios da doença.

O amplo espectro de reação cruzada inerente às imunoglobulinas da classe M ficou evidente em nossa casuística, pois as provas de hemaglutinação passiva com eritrócitos sensibilizados com antígeno F₁ de ambos os sorotipos (icterohaemorrhagiae e patoc) detectaram anticorpos na maioria dos pacientes, independentemente da cepa com que foram infectados. O fato é de importância clínica pois, com a utilização de apenas uma única cepa, chega-se ao diagnóstico de leptospirose humana, o que é suficiente para o médico clínico, desde que não existe tratamento medicamentoso diferente para cada uma das diversas cepas de leptospiras causadoras das leptospiroses humanas.

Quanto à estabilidade dos antígenos polissacarídicos F₁, observou-se que puderam ser estocados por um período de um ano sem perda de suas propriedades sensibilizantes de eritrócitos.

CONCLUSÕES

As reações de hemaglutinação passiva com eritrócitos sensibilizados com antígenos polissacarídicos F₁ de ambos os sorotipos (*icterohaemorrhagiae* e *patoc*) detectaram anticorpos nos pacientes com leptospirose, independentemente do sorotipo infectante. Por conseguinte, as reações com ambos os sorotipos são gênero-específicas. Os resultados obtidos com F₁ Patoc I foram idênticos ou

similares aos obtidos com F₁ RGA. Todavia, a análise, por inspeção, deste estudo que pode ser considerado como exploratório, indica a necessidade de se trabalhar com um número bem maior de amostras de soro, para que tais conclusões sejam definitivas.

O confronto dessa prova com a soroaglutinação microscópica e com a imunofluorescência indireta está descrito em RIBEIRO *et alii*¹⁷

É vantajosa a utilização do antígeno F₁ *patoc*, devido à facilidade de sua obtenção e à ausência de patogenicidade em caso de contaminação laboratorial.

A estabilidade do antígeno polissacarídico F₁, quando estocado a -20°C, é de cerca de 12 meses.

RIALAG/536

RIBEIRO, M.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Immunodiagnosis of human leptospirosis. 1. Polysaccharide antigen for passive hemagglutination test. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

ABSTRACT: F₁ polysaccharide antigen were extracted from leptospires belonging either to *icterohaemorrhagiae* or *patoc* serovars, the protein/carbohydrate ratio being respectively 1.24 and 0.54. The serological specificity was tested through passive hemagglutination test. Preparations of glutaraldehyde-fixed sheep red blood cells were sensitized with either *L. icterohaemorrhagiae* or *L. patoc* antigens. Each final preparation was employed in tests carried out in 91 blood specimens obtained from 35 patients suffering from leptospirosis presumably due to serovars *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippothyphosa* or *pomona*. Both F₁ preparations behaved very similarly. The passive hemagglutination test was genus specific, very sensitive and became positive in the early stage of the illness. The advantage of F₁ *patoc* antigen is point out because of its lack of pathogenicity.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunodiagnosis; antigens, polysaccharidic; passive hemagglutination test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER, B. & FAINE, S. — The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. *J. med. Microbiol.*, 11:387-400, 1978.
2. ADLER, B. & FAINE, S. — Serological cross-reactions of leptospiral lipopolysaccharide (F₁) antigen. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 244:291-301, 1979.
3. AURAN, N.E.; JOHNSON, R.C. & RITZI, D.M. — Isolation of outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. *Infect. Immun.*, 5:968-75, 1972.
4. BAKER, L.A. & COX, C.D. — Quantitative assay for genus-specific leptospiral antigen and antibody. *Appl. Microbiol.*, 25:697-8, 1973.
5. CHANG, R. SHIH-MAN & McCOMB, D.E. — Erythrocyte sensitizing substances from five strains of Leptospirae. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 3:481-9, 1954.
6. CHERNUKHA, Y. G.; SHISHKINA, Z.S.; BARYSHEV, P.M. & KOKOVIN, I.L. — The dynamics of IgM-antibodies in leptospiral infection in man. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 236:336-43, 1976.
7. COX, C.D. — Hemolysis of sheep erythrocytes sensitized with leptospiral extracts. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 90:610-5, 1955.
8. COX, C.D.; ALEXANDER, A.D. & MURPHY, L.C. — Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *J. infect. Dis.*, 101:210-8, 1957.
9. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 52:311-9, 1974.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polissacarídico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):127-133, 1981.

10. FAINE, S.; ADLER, B. & RUTA, G. — A mechanism of immunity to leptospirosis. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 52:301-10, 1974.
11. HINDLE, E. & WHITE, P.B. — A specific soluble substance in spirochaetes. *Proc. Roy. Soc., London*, sB, 114:523-29, 1934 apud *Q. cum. Index med.*, 15:1188, 1934.
12. IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. — Haemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia antigen. *Immunology*, 27:871-8, 1974.
13. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R. J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
14. MYERS, D.M. — Evaluacion de antigenos de la envoltura externa de *Leptospira* en las pruebas de fijacion de complemento y de hemaglutinacion para la leptospirosis. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 87:141-51, 1979.
15. PALIT, A. & GULASEKHARAM, J. — Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. clin. Path.*, 26:7-16, 1973.
16. PALIT, A. & HARRINSON, P.M. — Immunochemistry of extracts from *Leptospira interrogans* serotype hardjo. *J. gen. Microbiol.*, 100:249-56, 1977.
17. RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico de leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-43, 1981.
18. SCOTT, T.A. & MELVIN, E.H. — Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, 25:1656-61, 1953.
19. SHINAGAWA, M. & YANAGAWA, R. — Isolation and characterization of a leptospiral type-specific antigen. *Infect. Immun.*, 5:12-19, 1972.
20. SULZER, C.R.; GLOSSER, J.W.; ROGERS, F.; JONES, W.L. & FRIX, M. — Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J. clin. Microbiol.*, 2:218-21, 1975.
21. SULZER, C.R. & JONES, W.L. — Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Appl. Microbiol.*, 26:655-657, 1973.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1981.

IMUNODIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE HUMANA. 2. ESTUDO COMPARATIVO DAS REAÇÕES DE SOROAGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA, HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA *

Maricy Alves RIBEIRO **
Massami KAWARABAYASHI **
Lúcia Kaoru YAMADA ***
Augusta Kiyomi TAKEDA **
Marcelo Oswaldo Álvares CORRÊA **

RIALA6/537

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

RESUMO: Foram realizadas provas de hemaglutinação passiva e de imunofluorescência indireta em 98 soros obtidos de 38 pacientes com leptospirose causada presumivelmente pelos sorotipos *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippotyphosa* ou *pomona*. Hemácias de carneiro sensibilizadas com antígeno polissacarídico F₁, obtido de leptospira do sorotipo *patoc*, foram utilizadas na hemaglutinação passiva. Para a prova de imunofluorescência indireta foram empregados antígenos íntegros do mesmo sorotipo. Os resultados foram comparados com os obtidos através da prova de aglutinação microscópica, na qual foram empregados 10 sorotipos patogênicos. As reações de hemaglutinação passiva e de imunofluorescência indireta mostraram ser gênero específicas, sendo que a primeira caracterizou-se por ser a mais indicada para o diagnóstico precoce da leptospirose humana aguda.

DESCRITORES: leptospirose humana, imunodiagnóstico; provas de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva, imunofluorescência indireta.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial específico das leptospiroses ainda utiliza, como procedimento padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde¹², desde 1967, a prova de soroaglutinação microscópica^{17, 23}, na qual os antígenos são representados por culturas de diferentes sorotipos de leptospira. No entanto, a realização desta prova exige laboratórios dotados de condições de certa complexidade como, por exemplo, aquelas necessárias para a manutenção de variado estoque de culturas para o provimento de antígenos que abrangam o espectro dos sorotipos mais frequentes na área atendida pelo laboratório,

cerca de 14, segundo recomendação da OMS. Outras provas sorológicas de execução mais acessíveis têm sido relatadas, tais como a prova de hemaglutinação passiva^{10, 13, 18, 19}, o teste de fixação de complemento^{10, 14}, a prova de imunofluorescência indireta^{16, 17, 22}, a contra-imunoelectroforese²¹, o teste ELISA²⁰ etc.

No entanto, nestas reações são utilizados antígenos diferentes, de constituição não bem definida, o que dificulta a avaliação comparativa de tais reações, quando executadas por outros pesquisadores. No presente trabalho foi utilizado o antígeno polissacarídico extraído do sorotipo *patoc*, para a reação de hemaglutinação passiva, e antígeno íntegro do mesmo sorotipo, para a reação de imunofluorescência

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Hospital Heliópolis, São Paulo, SP.

indireta, tomando como referência, para estudo comparativo, a prova de soroaglutinação microscópica em duas ou três amostras séricas de cada um dos 38 pacientes com diagnóstico clínico de leptospirose.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros analisados

Foram colhidas 98 amostras de sangue por punção venosa de 38 pacientes internados no Hospital de Isolamento Emílio Ribas, de São Paulo, com quadro clínico sugestivo de doença leptospirótica, no período de dezembro de 1977 a junho de 1978. Foram selecionados aqueles que apresentaram resultados positivos na primeira soroaglutinação microscópica e aqueles que, apesar de apresentarem reações negativas, às vezes em até duas amostras sucessivas de soro, não tiveram outro diagnóstico etiológico firmado até a alta hospitalar, prevalecendo pois o diagnóstico de leptospirose, com base em dados clínicos e laboratoriais não específicos. Os dias, após o início dos sintomas em que foram colhidas as amostras de sangue, tiveram as seguintes variações:

- 1.^a amostra, de 2 a 10 dias, média aproximada de 6 dias (38 pacientes)
- 2.^a amostra, de 11 a 28 dias, média aproximada de 16 dias (38 pacientes)
- 3.^a amostra, de 29 a 49 dias, média aproximada de 38 dias (22 pacientes)

Três amostras de sangue foram obtidas em apenas 22 pacientes, devido a transferência para outros hospitais, altas e óbitos precoces.

O grupo controle constou de soros de 100 doadores do banco de sangue e os títulos considerados significativos para as reações de hemaglutinação passiva (HAP) e imunofluorescência indireta (IFI) foram baseados na mediana dos valores obtidos neste grupo.

Todas as amostras de soro foram conservadas a -20°C até o momento da realização dos testes. Quando da colheita da primeira amostra, foi praticada a hemocultura em todos os pacientes que integram este estudo.

Hemocultura

Foi feita a semeadura com uma gota de sangue total em dois tubos com meio de Fletcher. Os meios foram mantidos em estufa a 28°C, procedendo-se ao exame em campo escuro a cada quatro dias, considerando-se negativa a cultura caso não houvesse crescimento até o trigésimo dia. Esse crescimento em geral, traduz-se pela formação de um anel bem visível, a cerca de 0,5 a 1 cm abaixo da superfície do meio. A técnica da hemocultura baseou-se no emprego da diluição progressiva, inoculando-se uma gota de sangue no pri-

meiro tubo, misturando-se e passando-se uma gota para o segundo tubo e assim sucessivamente até o quarto tubo.

Soroaglutinação microscópica

Para a execução da reação de soroaglutinação microscópica. (SAM), foram utilizadas placas de porcelana escavadas. Em tubos à parte foram diluídos os soros em exame, a 1:50, através da adição de 0,1 ml de soro a 4,9 ml de solução salina, distribuindo-se 0,2 ml desta diluição em todas as escavações de uma placa.

Culturas de leptospirosas recentes (de quatro a cinco dias), semeadas em meio descrito por Ellinghausen & McCullough, modificado por Johnson & Harris (EMJH. Difco Laboratories), foram utilizadas para a preparação do antígeno que, a seguir, foi distribuído em cada escavação no volume de 0,2 ml, em concentração aproximada de 300 organismos por campo microscópico (aumento 400 X), de tal maneira que a diluição final do soro foi de 1:100. Após ligeira agitação, as placas foram incubadas a 37°C, durante duas horas, procedendo-se então à leitura em campo escuro. Foram retiradas com alça de platina de cada escavação amostras que foram colocadas em lâminas, uma para cada soro e, a seguir, lidas em microscópio de campo escuro. Havendo 50% ou mais de leptospirosas aglutinadas no campo, a reação foi considerada positiva.

A reação de soroaglutinação microscópica foi realizada com cepas dos seguintes sorotipos:

icterohaemorrhagiae, cepa RGA
copenhageni, cepa M20
panama, cepa CZ214 K
grippotyphosa, cepa Moskva V
canicola, cepa Hond Utrecht IV
pomona, cepa Pomona
bataviae, cepa Swart
australis, cepa Ballico
wolffi, cepa Divaldo
patoc, cepa Patoc I

Os soros reagentes na diluição de 1:100 foram titulados da seguinte maneira: 0,2 ml de solução salina foram colocados em cada escavação da placa de porcelana, e foram adicionados 0,2 ml de soro diluído a 1:50 na primeira escavação. Após a mistura, foram retirados 0,2 ml, colocados na segunda escavação e assim sucessivamente, até a diluição final desejada. Foram obtidos, então, títulos de 1:100, 1:200, 1:400 etc. A seguir, foram colocados 0,2 ml de antígeno em cada uma das diluições de soro que apresentaram títulos finais dobrados, respectivamente: 1:200, 1:400, 1:800 etc.

As placas foram incubadas a 37°C, durante duas horas, procedendo-se, a seguir, à leitura em microscópio de campo escuro.

De acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde¹², foi considerado

como parâmetro diagnóstico mínimo, nesta reação, o título de 1:200.

Em relação à soroaglutinação para a cepa Patoc I, rotineiramente utilizada como antígeno de triagem⁶, os resultados foram expressos como positivo ou negativo na diluição de 1:100, não se procedendo ao teste para diluições sucessivas, em caso de positividade.

Hemaglutinação passiva

A prova de hemaglutinação passiva (HAP) para a pesquisa de anticorpos anti-F₁, onde F₁ é o antígeno polissacarídico de FAINE et alii⁸, foi realizada conforme a técnica descrita por RIBEIRO et alii¹⁵. O sorotipo usado para a extração do antígeno polissacarídico F₁ foi o patoc Patoc I.

Reação de imunofluorescência indireta

Para a prova de imunofluorescência indireta (IFI), culturas da cepa Patoc I, em meio Korthoff, foram fixadas em formol a 1%, durante uma hora, a 37°C; a seguir, centrifugadas a 15.900 x g*, durante 15 minutos, e lavadas duas vezes com solução salina tamponada fosfatada (SSTF), pH 7,2. O sedimento ressuspenso numa concentração de aproximadamente 100 leptospiros por campo microscópico (aumento 400 x) foi distribuído em lâminas adequadas para imunofluorescência. As lâminas foram fixadas a 37°C e conservadas a -70°C.

Os soros dos pacientes, diluídos à razão dois, foram gotejados sobre o antígeno a partir da diluição de 1:2, em seguida, incubados a 37°C, durante 30 minutos, em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 2 vezes durante dez minutos com SSTF, pH 7,2, e incubadas, durante 30 minutos a 37°C, com o conjugado, constituído por soro de coelho anti-imunoglobulinas totais e anti-IgM humanas, marcado com isotiocianato de fluoresceína, diluído conforme o título em Azul de Evans a 1 mg%, em SSTF, pH 7,2; após a incubação, foram lavadas duas vezes durante dez minutos com SSTF, pH 7,2, e a seguir foram cobertas com lamínulas e glicerina tamponada, pH 8,5.

A leitura foi efetuada em microscópio de fluorescência**, sendo o título final considerado como aquele correspondente à última diluição do soro, que apresenta fluorescência positiva. Para controle da reação, foram utilizados soros positivos e negativos.

RESULTADOS

Hemocultura — Em todas as hemoculturas semeadas não houve crescimento de leptospira.

Reações sorológicas — Os resultados pormenorizados obtidos com estas reações estão distribuídos na tabela 1, onde na 1.ª coluna se encontram as iniciais dos nomes dos 38 pa-

cientes, seguindo-se o número de dias após o início dos sintomas nos quais foram colhidas a 1.ª, 2.ª e 3.ª amostras de sangue. A seguir, constam os títulos obtidos na prova de SAM para os quatro sorotipos em que houve positividade, a saber: *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippotyphosa* e *pomona*. Nas colunas seguintes, estão os resultados das reações de HAP e IFI para pesquisa de imunoglobulinas totais e da classe M.

Soroaglutinação microscópica — O presumível sorotipo causador da doença foi aquele para o qual foram encontrados os maiores títulos de aglutininas específicas nas amostras de soro examinadas. Predominou o sorotipo *icterohaemorrhagiae*, em 25 casos. O sorotipo *copenhageni* foi detectado em quatro casos, o sorotipo *grippotyphosa*, em três, e o sorotipo *pomona*, em um. As soroaglutinações efetuadas com a cepa *Patoc I* foram positivas em todos os pacientes que apresentaram reação positiva para algum dos sorotipos já citados. Em três pacientes (n.º 13, 31, 33), as reações de soroaglutinação foram sempre negativas. O paciente número 3 apresentou nas três amostras os seguintes resultados: negativo na 1.ª amostra, título positivo a 1:800 para os sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*, na 2.ª amostra, e título de 1:200 para os mesmos sorotipos na 3.ª amostra. A SAM do paciente n.º 21, negativa na 1.ª amostra, foi positiva, ao título de 1:400 na 2.ª amostra, para *icterohaemorrhagiae* assim como para *grippotyphosa*.

A frequência dos sorotipos presumivelmente causadores da moléstia, determinada através da prova de soroaglutinação microscópica, encontra-se na tabela 2.

Do total de 38 pacientes, 19 (50%) apresentaram título inicial menor ou igual a 1:200, na prova de soroaglutinação microscópica.

As variações dos títulos das reações mostraram a seguinte distribuição da 1.ª para a 2.ª amostra: 25 pacientes (65,79%) tiveram ascensão de títulos, 6 (15,79%), queda, 4 (10,53%) mantiveram o mesmo título e 3 (7,80%) apresentaram aglutinação sempre negativa (menor que 1:200).

Da 2.ª para a 3.ª amostra, em 8 pacientes (36,36%) houve ascensão de título, em 9 (40,90%), houve queda, 4 (18,18%) mantiveram o mesmo título e 1 (4,54%) continuou negativo.

Reação de hemaglutinação passiva — Nos 38 pacientes cujas amostras de soro foram examinadas pela técnica de HAP, a variação de título encontrada da 1.ª para a 2.ª amostra sérica mostra 28 pacientes (73,68%) com ascensão, 2 (5,26%), com queda, 6 (15,79%), com manutenção do título. Dois pacientes (n.º 13 e 31) apresentaram nas duas amostras títulos de 1:16.

* g = aceleração padrão da gravidade (9.807 mm/s²).

** Olympus — lâmpada Osram HBO-200 W/4.

TABELA 1

Resultados obtidos com as reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta para pesquisa de imunoglobulinas totais (Ig totais) e imunoglobulinas da classe M (IgM) nas amostras de soro dos pacientes com quadro clínico sugestivo de leptospirose

Amostra Nome	Dia da coleta após o início dos sintomas			Soroprecipitação microscópica (título 1:)												Hemaglutinação Passiva (título 1:)			Imunofluorescência indireta (título 1:)					
				Sorotipos															Cepa Patoc I					
				icterohaemorrhagiae			copenhageni			grippityphosa			pomona						Cepa Patoc I			Ig totais		
1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	
1) MTS	7	28	40	200	3.200	800	200	3.200	12.800	—	1.600	3.200	—	—	—	612	512	256	32	512	32	256	256	256
2) MFL	6	27	39	1.600	800	800	800	400	400	200	800	400	—	—	—	128	2.048	512	4	64	512	64	64	256
3) ESO	10	22	40	25.600	12.800	3.200	400	800	200	800	1.600	800	—	—	—	16.384	1.024	512	512	512	64	64	256	256
4) JV	7	22	35	—	1.600	3.200	—	200	400	—	800	800	—	—	—	32	2.048	1.024	8	512	256	8	256	256
5) JAS	5	16	...	200	400	...	400	3.200	...	—	—	—	—	—	—	256	2.048	...	64	256	...	64	256	...
6) YK	5	17	45	—	1.600	1.600	—	—	—	—	800	3.200	—	—	—	256	2.048	2.048	8	256	64	256	512	512
7) LBS	4	15	33	3.200	800	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32	1.024	1.024	8	64	256	256	512	512
8) JAC	7	18	34	—	800	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	1.024	512	256	512	256	512	256	512
9) ACD	8	16	48	—	—	—	—	800	1.600	—	—	—	—	—	—	2.048	2.048	1.024	64	256	16	512	512	256
10) MAS	4	12	...	—	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	1.024	...	64	64	...	256	512	...
11) ARS	4	13	44	—	1.600	800	—	1.600	1.600	—	1.600	6.400	—	—	—	2.048	65.536	32.768	64	256	256	512	1.024	512
12) SMA	4	13	43	—	800	1.600	—	—	400	—	—	800	—	—	—	64	512	256	16	256	256	8	512	256
13) JCC	8	15	...	—	—	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	16	...	512	64	...	256	256	...
14) MS	5	12	...	400	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16.384	32.768	...	64	64	...	512	1.024	...
15) TVP	10	23	...	—	400	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	256	2.048	...	64	64	...	512	512	...
16) EVC	2	11	34	—	400	400	—	—	—	—	400	6.400	—	—	—	64	256	256	64	512	64	512	256	256
17) PS	4	12	...	800	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.024	1.024	...	64	256	...	512	512	...
18) JCB	4	11	35	—	400	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	1.024	256	32	256	64	4	256	64
19) MIP	8	18	...	200	800	...	—	400	...	—	400	...	—	—	—	2.048	8.192	...	256	512	...	64	256	...
20) ASS	8	18	...	6.400	6.400	...	200	1.600	...	200	1.600	...	—	—	—	1.024	2.048	...	512	1.024	...	64	512	...
21) RJS	6	13	...	—	400	...	—	—	—	—	400	...	—	—	—	64	512	...	16	512	...	8	512	...
22) FJA	7	14	...	200	200	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.048	8.192	...	256	512	...	512	1.024	...
23) JLR	7	14	31	3.200	6.400	800	—	400	800	—	200	800	—	—	—	256	256	256	512	1.024	64	64	64	256
24) KI	10	20	...	800	1.600	...	200	—	—	—	—	—	400	800	—	8.192	8.192	...	64	512	...	2.048	512	...
25) JM	3	12	...	3.200	3.200	...	—	400	...	—	400	...	—	—	—	8.192	16.384	...	1.024	256	...	256	2.048	...
26) CRS	4	14	29	—	400	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32	512	128	4	64	64	—	256	256
27) MCAS	4	13	...	6.400	1.600	...	800	1.600	...	1.600	3.200	...	800	1.600	...	16.384	1.024	...	64	512	...	512	512	...
28) MHK	7	16	35	1.600	3.200	400	—	200	200	—	—	—	400	200	—	1.024	2.048	512	256	2.048	512	1.024	512	256
29) JRO	6	15	...	400	200	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	1.024	...	256	64	...	64	64	...
30) AN	3	11	...	200	800	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	512	2.048	...	512	256	...	256	256	...
31) JOS	10	22	...	—	—	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	16	...	64	64	...	4	—	...
32) IMG	7	23	49	1.600	1.600	3.200	1.600	25.800	51.600	400	1.600	3.200	—	—	—	2.048	8.192	32.768	1.024	1.024	512	2.048	256	256
33) TAC	10	23	31	—	—	...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	128	512	128	256	512	16	64	256	64
34) JAF	8	17	33	—	800	200	—	800	200	—	200	200	—	—	—	2.048	2.048	2.048	256	256	64	64	64	64
35) FPS	7	14	32	400	800	400	—	800	200	—	400	200	—	—	—	512	1.024	256	64	64	64	32	64	16
36) JDM	3	11	30	—	200	...	—	—	—	—	—	—	400	400	—	256	1.024	128	—	256	64	—	256	64
37) JCS	7	13	31	—	200	200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	64	256	128	512	256	64	64	256	64
38) CAS	5	11	33	1.600	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	256	16.384	8.192	64	1.024	512	64	256	256

Observação: as casas com o sinal de menos (—) indicam reações negativas, e com o sinal de pontuação (...) indicam amostras não colhidas.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, I.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. —
Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroprecipitação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. —
 Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutina-
 ção microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*,
 41(2):135-143, 1981.

TABELA 2

Freqüência dos sorotipos de leptospira causadores da moléstia nos 38 pacientes, determinada através da soroaglutinação microscópica

Sorotipo	N.º de casos *	Freqüência (%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	25	65,79
<i>copenhageni</i>	4	10,53
<i>grippotyphosa</i>	3	7,89
<i>pomona</i>	1	2,63
<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>copenhageni</i>	1	2,63
<i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>grippotyphosa</i>	1	2,63

* Nos 38 casos analisados, 3 foram sempre negativos para a soroaglutinação microscópica.

Da 2.^a para a 3.^a amostra, 1 paciente (4,54%) mostrou ascensão de título, 16 (72,73%) tiveram queda, enquanto que em 5 (22,73%) os títulos não se alteraram.

A mediana dos títulos de HAP e IFI, no grupo de controle, foi de 1:16 (tabela 3).

Reação de imunofluorescência indireta — Os títulos obtidos nas amostras séricas dos 38 pacientes, através da prova da IFI para a pesquisa de imunoglobulinas totais, apresentaram as seguintes variações da 1.^a para a 2.^a amostra: 28 pacientes (65,79%) revelaram ascensão de título, 5 pacientes (13,16%) revelaram queda e 8 (21,05%) mantiveram o título.

Da 2.^a para a 3.^a amostra, 2 pacientes (9,09%) apresentaram ascensão, 16 (72,73%) mostraram queda e 4 pacientes (18,81%) não alteraram seus títulos.

Na IFI para pesquisa de IgM específicos, houve a seguinte alteração de títulos da 1.^a para a 2.^a amostra: 17 pacientes (44,74%), com ascensão, 8 (21,05%), com queda, e 12 pacientes (31,58%) com manutenção de título inicial. Um paciente, (2,63%), o de n.º 31, manteve-se sempre negativo, com título menor ou igual a 1:4. Da 2.^a para a 3.^a amostra, 3 pacientes (13,64%) apresentaram aumento de títulos, 9 pacientes (40,90%) mostraram queda de títulos, enquanto que 10 pacientes (45,45%) se mantiveram no mesmo título.

TABELA 3

Varição de título apresentado pelo grupo controle (100 soros humanos normais) nas reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta para pesquisa de imunoglobulinas totais (Ig totais) e anticorpos IgM

Título (1:)	N.º de casos	Hemaglutinação passiva	Imunofluorescência indireta	
			Ig totais	IgM
negativo		2	4	5
2		1	3	2
4		13	16	12
8		16	12	19
16		23	40	27
32		27	22	24
64		14	2	11
128		2	1	0
256		2	0	0
Mediana dos títulos		16	16	16

TABELA 4

Distribuição das reações sorológicas segundo os resultados positivos ou negativos nos 38 pacientes estudados

Reações	N.º de casos	Títulos	
		Negativos	Positivos
SAM		3	35
HAP		2	36
IFI (Ig totais)		0	38
IFI (IgM)		1	37

Comparando-se a sensibilidade das reações experimentadas em todas as amostras de soro, verificou-se a distribuição das reações sorológicas, segundo os títulos positivos ou negativos, nos 38 pacientes estudados, conforme a tabela 4.

Aplicando-se o teste estatístico do X^2 , não foi verificada diferença significativa quanto à sensibilidade dessas reações, a nível de 5%.

A porcentagem comparativa de resultados com títulos significativos na 1.ª amostra de soro dos 38 pacientes examinados pelas reações sorológicas está representada na figura 1.

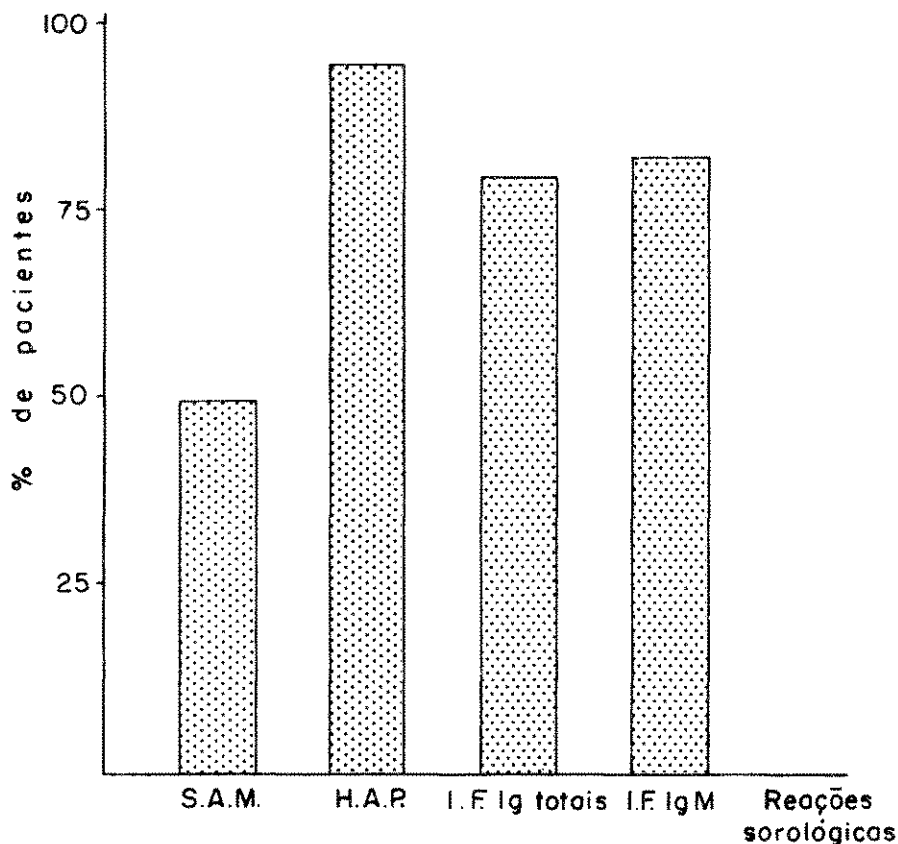


FIGURA 1 — Frequência percentual dos 38 pacientes com reações sorológicas com títulos significativos na 1.ª amostra de soro.

Aplicando-se o teste estatístico de igualdade de proporções para comparar a porcentagem de positividade na 1.^a amostra, foi verificada diferença significativa da reação de soroaglutinação microscópica comparativamente às demais. Tal diferença não foi verificada entre a hemaglutinação passiva e a imunofluorescência indireta.

Entre a 1.^a e a 2.^a amostra de sangue, considerando-se a ascensão de título nas quatro reações testadas, não foi verificada diferença estatisticamente significativa; porém, entre a 2.^a e a 3.^a amostra houve diferença como pode ser evidenciado na figura 2.

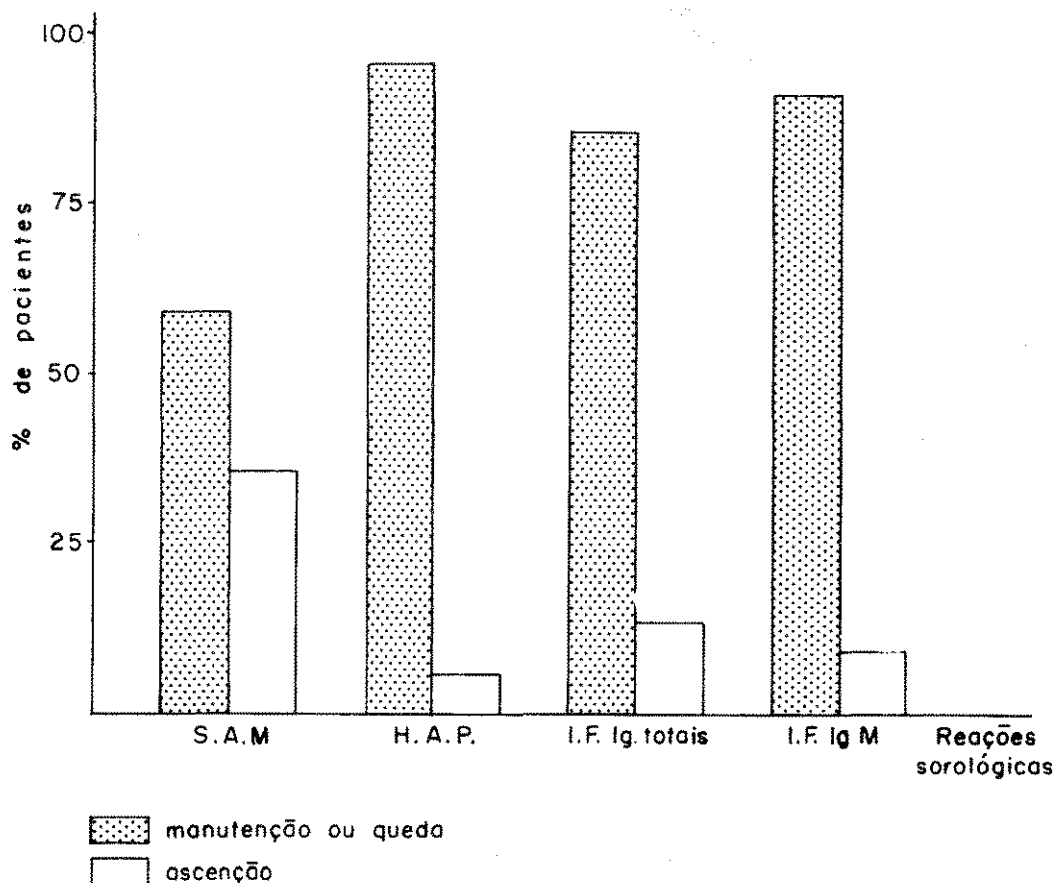


FIGURA 2 — Frequência percentual de 22 pacientes com manutenção ou queda e ascensão de títulos entre a 2.^a e 3.^a amostras de sangue.

Comparando-se a porcentagem de pacientes com manutenção ou queda de títulos, e depois a porcentagem dos pacientes com ascensão de títulos de anticorpos pelo teste de igualdade de proporções, foi verificada diferença estatisticamente significativa; assim é que a reação de soroaglutinação microscópica foi a que apresentou menor tendência à queda dos títulos de anticorpos comparativamente às demais. Diferença significativa não foi verificada entre as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta (Ig totais e IgM).

DISCUSSÃO

O isolamento da leptospira através da hemocultura tem sido pouco freqüente^{3,7}. A maioria dos pacientes com leptospirose procura assistência médico-hospitalar ao fim da 1.^a semana do início dos sintomas, coincidindo com o aparecimento de anticorpos circulantes e, conseqüentemente, diminuição ou mesmo ausência de microrganismos no sangue, o que resulta em negatização da maioria das hemoculturas, como aconteceu em nosso estudo.

O sorotipo predominante, na prova de soroprecipitação, foi o *icterohaemorrhagiae*. Este resultado concorda com os relatos de diferentes autores 1, 2, 4, 5, 9, 11.

Em decorrência da análise estatística, o título considerado significativo para as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência foi maior do que 16, pois a mediana do grupo controle situou-se em 16.

Em nossa casuística, as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta apresentaram resultados positivos na maioria dos pacientes, já na 1.^a amostra de soro — 94,74%, na hemaglutinação, 78,95%, na imunofluorescência para pesquisa de imunoglobulinas totais e 81,58%, na imunofluorescência para anticorpos IgM — ao contrário da reação de soroprecipitação microscópica cuja falha foi de 50%, sendo tal diferença estatisticamente significativa. É ponto pacífico que, na fase aguda da leptospirose, o anticorpo predominante é da classe M.

Na comparação dos padrões de queda ou manutenção e ascensão de títulos de anticorpos, na evolução dos pacientes, entre a 2.^a e a 3.^a amostras de soro (figura 2) evidenciou-se que as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta apresentaram queda precoce, ao passo que a reação de soroprecipitação microscópica, em oito dentre 38 pacientes, com uma média aproximada de 38 dias após o início dos sintomas, continuou com ascensão de títulos. Por conseguinte, as reações de hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta apresentaram-se como melhores testes para o diagnóstico de doença aguda.

A sensibilidade das reações, conforme ficou demonstrado pela análise da tabela 4, utilizando-se o teste do X^2 , não apresentou diferença estatisticamente significativa; porém, analisando-se individualmente os dados de três pacientes (n.º 13, 31 e 33), negativos à soroprecipitação microscópica, nas diferentes amostras de sangue, verifica-se que apresentaram anticorpos detectáveis à reação de imunofluorescência indireta para IgM ou

para imunoglobulinas totais. A paciente n.º 33 apresentou resultados positivos também na prova de hemaglutinação passiva.

A utilização de uma única cepa saprofítica, nas provas de HAP e IFI, foi suficiente para detectar anticorpos na maioria dos pacientes, fato de importância em clínica, pois o diagnóstico específico da doença é suficiente, desde que não existe tratamento medicamentoso diferente para as leptospiroses causadas pelos diferentes sorotipos. Ademais, a precocidade do diagnóstico laboratorial é de primordial importância para a orientação terapêutica adequada. Caso haja a necessidade de se identificar o sorotipo causador, por motivos epidemiológicos ou por outras razões, as amostras de soro poderão ser testadas convenientemente, em laboratórios dotados de possibilidades diagnósticas mais amplas.

CONCLUSÕES

A hemocultura, como método de diagnóstico laboratorial na leptospirose, não apresentou valor prático no material estudado.

A utilização de uma única cepa saprofítica, sorotipo *patoc* Patoc I, nas reações de hemaglutinação e de imunofluorescência indireta foi suficiente para a detecção de anticorpos nos pacientes com leptospirose, comportando-se as referidas reações como gênero-específicas.

As reações de hemaglutinação passiva e de imunofluorescência indireta utilizam antígenos estáveis que podem ser estocados pelo prazo de seis meses a um ano. Comparativamente à reação de soroprecipitação microscópica, positivaram-se precocemente, demonstrando mais rapidamente a queda de títulos de anticorpos, durante a evolução clínica do paciente, proporcionando, por conseguinte, uma informação mais precisa da doença leptospirótica aguda. A hemaglutinação passiva é mais adequada porque, além de possuir as características acima, é mais rápida e de custo operacional mais barato.

RIALA6/537

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Immunodiagnosis of human leptospirosis. 2. Comparative study of microscopic agglutination, passive hemagglutination and indirect immunofluorescence tests. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

ABSTRACT: Tests of passive hemagglutination employing sheep red blood cells sensitized with F₁ polysaccharide antigen of serovar *patoc* and indirect immunofluorescence using the same serovar antigen were carried out in 98 specimens from 38 patients suffering from leptospirosis presumably caused by serovars *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *grippothyphosa* or *pomona*. The results were compared with those obtained with microscopic agglutination test using 10 pathogenic serovars. Passive hemagglutination and indirect immunofluorescence tests were genus-specific. Passive hemagglutination is considered to be more appropriate for the early diagnosis of acute human leptospirosis.

DESCRIPTORS: leptospirosis, human, immunodiagnosis; microscopic agglutination; passive hemagglutination; indirect immunofluorescence.

RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M.; YAMADA, L.K.; TAKEDA, A.K. & CORRÊA, M.O.A. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41(2):135-143, 1981.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, A.D. — La distribution de la leptospirosis en America Latina. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 49:149-64, 1960.
2. AZEVEDO, R. & CORRÊA, M.O.A. — Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade de Recife em 1966. Aspectos epidemiológicos, laboratoriais e clínicos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:85-111, 1968.
3. BORG-PETERSEN, C. — Experience of leptospirosis in Denmark. *Proc. R. Soc. Med.*, 42:714-8, 1949.
4. CALDAS, E.M.; COSTA, E. & SAMPAIO, M.B. — Leptospire na cidade de Salvador (Brasil). Alguns aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20:164-76, 1978.
5. CORRÊA, M.O.A. — Human leptospirosis in Brazil. *Int. J. Zoonosis*, 2:1-9, 1975.
6. CORRÊA, M.O.A.; NATALE, V.; SADATSUNE, T. & FLEURY, G.C. — Valor prático do uso da *Leptospira semaranga* Patoc I no diagnóstico das leptospiroses humanas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 12:284-7, 1970.
7. CORRÊA, M.O.A.; VERONESI, R.; BRITO, T.; HYAKUTAKE, S.; SANTA ROSA, C.A. & EDELWEISS, E.L. — Leptospiroses. In: VERONESI, R. — *Doenças infecciosas e parasitárias*. 6.^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p. 787-803.
8. FAINE, S.; ADLER, B. & PALIT, A. — Chemical, serological and biological properties of a serotype-specific polysaccharide antigen in *Leptospira*. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 52:311-9, 1974.
9. MAGALDI, C. — Incidência, prevalência e distribuição das leptospiroses no Brasil. *Arq. Hig. Saúde públ.*, 28:187-97, 1963.
10. MYERS, D.M. — Evaluacion de antigenos de la envoltura externa de *Leptospira* en las pruebas de fijacion de complemento y de hemaglutinacion para la leptospirosis. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 87:141-50, 1979.
11. OLIVEIRA, V.J.C.; ROCHA, J.M.B.; SILVA, G.B. & CABRAL, C.L.N. — Considerações sobre o novo surto epidêmico de leptospirose humana na Grande Recife, Brasil, em 1975. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:33-36, 1977.
12. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE — Group d'experts de l'OMS. *Problèmes actuels des recherches sur la leptospirose*. Moscou, 1966. *Rapport*. Genève, 1967. [Sér. rapp. techn. n.º 380]
13. PALIT, A. & GULASEKHARAM, J. — Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J. clin. Path.*, 26:7-16, 1973.
14. PINTO, A.A.; SANTA ROSA, C.A.; SADATSUNE, T. & FLEURY, G.C. — Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination tests for leptospiral diagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 16:28-31, 1974.
15. RIBEIRO, M.A.; KAWARABAYASHI, M. & TAKEDA, A.K. — Imunodiagnóstico da leptospirose humana. 1. Antígeno polisacáridico para a prova de hemaglutinação passiva. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:127-133, 1981.
16. ROCH, P.; SRAMKOVÁ, L. & SALÁK, J. — The agglutinating and immunofluorescent activities of antileptospiral antibodies of human sera and of immunoglobulins M and G. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, Prague, 20:341-52, 1976.
17. SANTA ROSA, C.A. — Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, 1:97-109, 1970.
18. SULZER, C.R.; GLOSSER, J.W.; ROGERS, F.; JONES, W.L. & FRIX, M. — Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J. clin. Microbiol.*, 2:218-21, 1975.
19. SULZER, C.R. & JONES, W.L. — Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Appl. Microbiol.*, 26:655-7, 1973.
20. TERPSTRA, W.J.; LIGTHART, G.S. & SCHOONE, G.J. — Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 247:400-5, 1980.
21. TERPSTRA, W.J.; SCHOONE, G.J. & LIGTHART, G.S. — Counterimmunoelectrophoresis in the diagnosis of human leptospirosis. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, 244:285-90, 1979.
22. TORTEN, M.; SHENBERG, E. & VAN DER HOEDEN, J. — The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. *J. infect. Dis.*, 116:537-43, 1966.
23. TURNER, L.H. — Leptospirosis II: serology. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 62:880-99, 1968.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1981.

INDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

AGUIAR, P.R., 47
ALMEIDA, M.E.W., 63
ALVES, H.I., 31
AMATO, C., 75
BADOLATO, E.S.G., 63
BARBOSA, S.F.C., 121
BARION, M.I.E., 79
BARRETO, H.H.C., 9
BRITO, E., 93
BURKART, I.H.V., 47
CALDAS, E.M., 93
CALZADA, C.T., 37, 43 53
CAMPOS, E.P., 115
CHACHA, J., 121
CHIEFFI, P.P., 23, 89, 101
CORRÊA, L.L., 57
CORRÊA, M.J.S., 83
CORRÊA, M.O.A., 135
COSTA, E., 93
COSTACURTA, L. 115
CUCE, L.C., 121
CURTI, S.P., 107
CURY, C.G.C., 115
DEL GUERCIO, V.M.F., 89
DIAS, R.M.D.S., 101
DURANTE, F., 63
FAVA NETTO, C., 121
FELICE, R.B.G., 115
GONÇALVES, L.M., 37, 43
HIGASHI, H.G., 1
HIZUKA, H., 1
IRINO, K., 53, 71
KANO, E., 37, 43, 71
KAWARABAYASHI, M., 127, 135
LARA, W.H., 9
LIMA, I.A.R., 47
MANGINI, A.C.S., 101
MARQUES, R.M., 23
MARTINS, M.T., 53
MELLO, L.B., 89
MIRANDA FILHO, G., 93
NASCIMENTO, J.A., 47
NOGUEIRA, S., 43, 71
OLIVEIRA, E.P.T., 1
PAES, R.A.P., 115
PEIXOTO, E.S., 37
PESSOA, G.V.A., 37, 43, 53, 71
REQUEJO, H.I.Z., 43

RIBEIRO, M.A., 127, 135
ROLIM-ROSA, R., 1
SABINO, M., 83
SAKUMA, M.E., 107
SALLES-GOMES, L.F., 107
SAMPAIO, M.B., 93
SANCHEZ, P.S., 53
SANTOS, M.C., 31
SILVA, I.C., 93
SILVA, M.A., 1
SILVA, M.I.P.G., 57
SILVA, V.V., 93
SILVA, R.M., 57
SILVEIRA, N.V.V., 63, 75
SIMONSEN, V., 71
SIQUEIRA, J.G.V., 23
SPITERI, N., 79
TAKEDA, A.K., 121 127, 135
TORRES, D.M.A.G.V., 101
UEDA, M., 89
WALDMAN, E.A., 15
VARELLA-GARCIA, M., 9
VENTURA, V.R., 47
WESTPHALEN, S.R., 47
YAMADA, L.K., 135
YAMANAKA, M.T., 57
ZAMBONI, C.Q., 31, 79

ÍNDICE DE ASSUNTO

- Aflatoxina B,
em feijão, determinação, 83
- Antígeno polissacarídico de *Leptospira*
na prova de hemaglutinação passiva
para imunodiagnóstico, 127
- Antígenos bacterianos, 1
- Biodeto de mercúrio (HgI₂)
como preservativo de material biológico, 47
- Bilharziose
veja Esquistossomose
- Carbonato de cálcio
interferência na dosagem de iodo em sal
refinado, 75
- Cavalos, imunização, 1
- Clostridium perfringens*
antitoxina tipo A, 1
- Dicloreto de paraquat (Gramoxone)
envenenamento por manuseio, 115
- Dieldrin
níveis em sangue de aplicadores de aldrin, 9
- Doces de fruta em pasta, contaminação por
fungos
figo (*Ficus carica*), 31
goiaba (*Psidium guajava*), 31
marmelo (*Pyrus cydonia*), 31
pêssego (*Prunus persica*), 31
- Doença ocupacional
contaminação por exposição ao aldrin, 9
envenenamento pelo manuseio de Dicloreto
de paraquat, 115
- Eimeria*
em *Rattus norvegicus*
São Paulo, SP, Brasil, 101
- Eimeria nieschulzi*, 101
- Eimeria separata*, 101
- Enterobactérias patogênicas, 71
- Envenenamento por herbicida, 115
- Escherichia coli*, 37, 71
- Esquistossomose
esquistossomose mansônica
diagnóstico parasitológico, 23
- Feijão (*phaseolus*)
aflatoxina B, determinação, 83
- Fezes
exame parasitológico
sedimentação em copo
inovação na tela metálica, 57
preservativo de material biológico, 47
- Fungos
em doce de fruta em pasta
contagem de micélios pelo método de
Howard, 31
em suco de fruto
contagem de micélios pelo método de
Howard, 79
- Gangrena gasosa, 1
- Hepatite tóxica, 115
- Herbicida, envenenamento
dicloreto de paraquat (Gramoxone), 115
- Herpesvirus hominis*
frequência de anticorpos em habitantes
da cidade de São Paulo, Brasil, 107
- Infecções por *Escherichia coli* invasora
São Paulo, Brasil, 37
- Inseticidas organoclorados
aldrin, 9
dieldrin, 9
- Kato-Katz, método
veja método de Kato-Katz
- Laboratórios de Saúde Pública, Brasil
estrutura, 15
organização, 15
redes, 15
- Leptospirose humana
estudo imunológico de pacientes, 93
imunodiagnóstico, provas
hemaglutinação passiva, 127, 135
imunofluorescência indireta, 127, 135
soroaglutinação passiva, 127, 135
- Método de Kato-Katz
eficácia, variabilidade
diagnóstico parasitológico
esquistossomose mansônica, 23
- Nefrose, 115
- Óleo de oliva
controle de qualidade
cromatografia em fase gasosa, 63
índice de iodo, 63
índice de refração, 63
fraude, detecção, 63

Paracoccidioidomicose
técnicas de diagnóstico, 121
Pesticidas, resíduos, 9
Planejamento em saúde, 15
Preservativo de material biológico
biiodeto de mercúrio (HgI₂), 47
Programas de saúde, 15
Ratos (murídeos)
parasitismo por coccídeos, 101
Rattus norvegicus
hospedeiro paratênico, 89
parasitismo por *Eimeria*, 101
Roedores,
ratos, 89, 101
Sal refinado, análise
iodo, determinação, 75
legislação brasileira, 75

Salmonella, 71
Salmonella sp., sorotipos, 53
Shigella, 71
Shigella boydii 9
rápida fermentadora da lactose, 43
Soro antigangrenoso perfríngico, 1
Suco de fruto, contaminação por fungos
caju (*Anacardium occidentale*), 79
maracujá (*Passiflora*), 79
tomate (*Lycopersicon*), 79
uva (*Vitis*), 79
Toxocara canis, 89

SUBJECT INDEX

- Aflatoxin B,
in bean (*Phaseolus*), determination, 83
- Antigens
Leptospira polisaccharidic antigen
in the passive hemagglutination test
for the immunodiagnosis, 127
- Antigens, bacterial, 1
- Antitoxins
gas gangrene *Clostridium perfringens*, 1
- Bean (*Phaseolus*)
Aflatoxin B, determination, 83
- Bilharziasis
see Schistosomiasis
- Calcium carbonate
interference in iodine determination
in refined cooking salt, 75
- Clostridium perfringens*
type A antitoxin, 1
- Dieldrin
levels, in the blood of farm-workers, 9
- Eimeria*
in *Rattus norvegicus*
São Paulo, SP, Brazil, 101
- Eimeria nielschulzi*, 101
- Eimeria separata*, 101
- Enterobacteriaceae*
pathogenic enterobacteria, 71
- Escherichia coli*, 37, 71
- Escherichia coli* infections
invasive strain
São Paulo, Brazil, 37
- Feces
parasitological examination
cup sedimentation of feces
improved sieving, 57
biological sample preservative, 47
- Fruit jam, fungal contamination
fig (*Ficus carica*), 31
guava (*Psidium guajava*), 31
peach (*Prunus persica*), 31
quince (*Pyrus cydonia*), 31
- Fruit juice, fungal contamination
cashew (*Anacardium occidentale*), 79
grape (*Vitis*), 79
passion-fruit (*Passiflora*), 79
tomato (*Lycopersicon*), 79
- Fungus
see mold
- Gas gangrene, 1
- Health planning, 15
- Hepatitis, toxic, 115
- Herbicide poisoning
paraquat dichloride (Gramoxone), 115
- Herpesvirus hominis*
antibodies frequency in inhabitants
of São Paulo City, state of São Paulo,
Brazil, 107
- Horses, immunization, 1
- Insecticides (organochlorine)
aldrin, 9
dieldrin, 9
- Kato-Katz thick-smear method
accuracy, variability
Manson schistosomiasis parasitological
diagnosis, 23
- Leptospirosis, human
immunodiagnosis, 127, 135
immunodiagnostic teste comparison,
indirect immunofluorescence, 135
microscopic agglutination, 135
passive hemagglutination, 135
immunological study of patients, 93
- Manson schistosomiasis
parasitological diagnosis, 23
- Mercury bi-iodide (HgI₂)
as biological sample preservative, 47
- Mold (fungus)
in fruit jam
Howard mycelia count method, 31
- Mold (fungus)
in fruit juice
Howard mycelia count method, 79
- Nephrosis, 115
- Occupational disease
hazards by exposure to aldrin, 9
poisoning by handling paraquat
dichloride, 115

Oil

- olive-oil
 - fraud detection, 63
 - quality control
 - gas liquid chromatography, 63
 - iodine number, 63
 - refraction index, 63
- Paracoccidioidomycosis
 - diagnose technics, 121
- Paraquat dichloride (Gramoxone)
 - poisoning by handling, 115
- Pesticides, residues, 9
- Poisoning
 - herbicide poisoning, 115
- Preservative
 - biological sample
 - mercury bi-iodide (HgI₂), 47
- Public health laboratory, 15
- Public health laboratory network, Brazil, 15
- Rats
 - coccidial parasitism, 101

Rattus norvegicus

- parasitism by *Eimeria*, 101
 - parathenic host, 89
- Rodents
- rats, 89, 101
- Salmonella*, 71
- Salmonella* sp., serotypes, 53
- Salt, analysis
 - refined cooking salt
 - iodine determination, 75
 - Brazilian legislation, 75
- Schistosomiasis
 - Manson schistosomiasis, 23
- Shigella*, 71
- Shigella boydii* 9
 - fast lactose fermenting, 43
- State health planning, Brazil, 15
- Toxocara canis*, 89