

PESQUISA E DOSAGEM DA TOXINA DIFTÉRICA NO SANGUE DE PACIENTES DE DIFTERIA POR REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA

Dacio de Almeida CHRISTOVAO (1)
Luis G. COTILLO Z. (2)

RESUMO

Foi experimentado processo de pesquisa sorológica da toxina do *C. diphtheriae* no sangue de pacientes de difteria através de reação de hemaglutinação passiva, na qual se empregaram hemácias humanas do tipo O, Rh negativas, sensibilizadas com antitoxina diftérica. O método revelou-se simples, capaz de evidenciar até 0,00032 Lf da toxina por ml de soro e permite conhecer-se o resultado em cerca de 2 horas. A reação, destinada a demonstrar a presença de um antígeno identificador e não a de anticorpos específicos, oferece grande possibilidade de aplicação vantajosa no diagnóstico da difteria e no estudo de sua patogenia. Método semelhante poderia ser aplicável, para os mesmos fins, a outras infecções.

INTRODUÇÃO

Partículas inertes recobertas por antígeno convenientemente adsorvido têm sido muito utilizadas na demonstração e dosagem de anticorpos.

Dentre as partículas empregadas até hoje — naturais, como as de talco, kieselsuhr, bentonita, bactérias e hemácias, ou artificiais, como as partículas de colódio e latex — os glóbulos vermelhos, de diferentes espécies de animais, têm demonstrado apreciáveis vantagens de ordem prática.

À superfície natural das hemácias podem adsorver-se antígenos vários, sempre que de natureza polissacarídica. Antígenos proteicos podem ser adsorvidos ou após a modificação da superfície dos glóbulos vermelhos por ácido tânico, processo descoberto em 1951 por BOYDEN³, ou se conjugados quimicamente através do emprego de bis-diazo-benzi-

dina, como descrito originalmente em 1942 por PRESSMAN, CAMPBELL e PAULING⁹ e padronizado em 1955 por STAVITSKY & ARQUILLA¹⁴.

A aglutinação de hemácias ocasionada pela reação entre o antígeno ligado à sua superfície e o anticorpo respectivo tem sido denominada de hemaglutinação condicionada, hemaglutinação indireta ou hemaglutinação passiva. Este último nome, proposto por BIER², é o mais usado.

O método da aglutinação passiva é muitas vezes o único capaz de demonstrar a existência de anticorpos, graças à sua extraordinária sensibilidade. Realmente, é processo capaz de revelar valores mínimos até mesmo da ordem de 0,0003-0,0006 μg de anticorpo (N/ml) e foi estimado que ao nível de 0,0006 $\mu\text{g}/\text{ml}$ correspondem apenas cerca de 50 moléculas de anticorpo por hemácia⁷.

Recebido para publicação em 28-11-1966.

Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP.

(1) Professor Catedrático da Cadeira.

(2) Instrutor da Cadeira; Catedrático Auxiliar de Microbiologia — Facultad de Farmacia y Biomica, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Peru.

Dada esta elevada sensibilidade, a reação de hemaglutinação passiva tem sido também aproveitada na evidência de quantidades muito pequenas de antígeno, valendo-se para tal da técnica da inibição da hemaglutinação. Esta é baseada no fato do antígeno, se presente, reagir com o anticorpo específico, juntado previamente à reação, inibindo-o assim de aglutinar as hemácias sensibilizadas com o mesmo antígeno, adicionadas posteriormente. A técnica pode ser adaptada a determinações quantitativas.

É interessante que já a segunda aplicação da hemaglutinação passiva ao diagnóstico de doença infecciosa tenha sido feita pela técnica da inibição de hemaglutinação, pesquisando-se a presença de antígeno do agente infeccioso. Em 1949, WARBURTON, KEOGH & WILLIAMS¹⁵ apresentaram método desta natureza para a evidência de polissacarídeos do *Hemophilus influenzae* no líquido céfalo-raquidiano, em casos de meningite devida a esta bactéria.

Um ano antes, MIDDLEBROOK & DUBOS⁸, após ter adsorvido a hemácias de carneiro ou humanas um ou mais antígenos extraídos do *Mycobacterium tuberculosis*, puderam demonstrar a presença de anticorpos capazes de provocar a sua aglutinação nos soros de indivíduos doentes de tuberculose ou portadores de tuberculose infecção.

Desde então a demonstração, por processos análogos, de anticorpos contra diferentes bactérias ou vírus foi descrita por vários pesquisadores, para fins diagnósticos ou outros. E o método tão sensível da evidência e dosagem de antígenos pela técnica da inibição da hemaglutinação passiva, passou a ser aplicado, com resultados compensadores, no estudo de muitos hormônios.

Entretanto, SINITSYN^{11, 12}, em dois trabalhos publicados em 1960, havia investigado e modificado método apresentado em 1956 por RYTSAI¹⁰, para a evidência direta da toxina botulínica, através de reação de hemaglutinação passiva, na qual eram usadas hemácias tani-

nizadas sensibilizadas com antitoxina botulínica. YAFAYEV & CHEPELEV¹⁷, em 1961, haviam apresentado também os resultados de seus estudos sobre modificação do método de RYTSAI, relatando a possibilidade de se revelar em 3 horas a presença da toxina botulínica em extratos de salsichas artificialmente contaminadas com toxina ou com esporos de *Clostridium botulinum*.

Considerando a alta sensibilidade da reação de hemaglutinação passiva, pareceu ao primeiro autor deste trabalho que deveria ser possível evidenciar-se a presença de toxina diftérica no sangue ou na urina de doentes de difteria, empregando-se hemácias sensibilizadas com antitoxina diftérica. O processo, se específico e sensível, poderia, por um lado, permitir a realização de estudos novos sobre a patogenia e a imunologia desta doença e, por outro, servir ao diagnóstico rápido da infecção — qualidade de importância dadas as desvantagens do demorado processo clássico de diagnóstico de laboratório (isolamento do *Corynebacterium diphtheriae* a partir da lesão e sua identificação posterior), bem como a imperfeição a que está ainda sujeito o processo moderno de imunofluorescência⁴.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes — As primeiras experiências foram realizadas em maio de 1965, com espécimes de sangue e urina de casos típicos de difteria.

Os resultados ora relatados referem-se a dois grupos de doentes internados no presente ano no Hospital Emílio Ribas, hospital de doenças infecciosas do Departamento de Saúde, na cidade de São Paulo. O primeiro grupo compõe-se de 75 pacientes internados na enfermaria de difteria, com diagnóstico clínico inicial de difteria típica ou de suspeita de difteria. Alguns tiveram posteriormente o seu diagnóstico clínico modificado. Para estes doentes, além do resultado do exame clínico, dispunha-se

do diagnóstico bacteriológico realizado no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo. O exame bacteriológico consistia no exame microscópico das culturas de material de garganta, em meio de Loeffler. O segundo grupo, de apenas 10 pacientes portadores de várias outras doenças, foi incluído com a finalidade de controle.

Material de exame — Por ocasião do internamento no hospital e antes da aplicação de soro anti-diftérico, foram obtidos de todos os pacientes espécimes de sangue e de alguns deles também de urina. Uma vez separados os soros, estes foram conservados em congelador a -20°C , assim como as urinas.

Reação de hemaglutinação — A pesquisa e dosagem de toxina diftérica no sangue e na urina, através da reação de hemaglutinação passiva, foram realizadas nos soros dos 85 pacientes e em alguns espécimes de urina:

- a) *Hemácias humanas* — Na hemaglutinação passiva usaram-se hemácias humanas de doadores do tipo O, Rh negativas, conservadas em A.C.D., em geladeira a 4°C , cedidas pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de São Paulo. Estas hemácias contavam sempre com mais de uma semana e não mais de um mês após a sua coleta.
- b) *Soluções tamponadas* — Usaram-se soluções tamponadas fosfatadas (TF) com pH 7,2 e 6,4. Estas soluções a 0,15 M foram preparadas a partir de soluções estoques de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ambas a 0,3 M. Preparou-se também uma solução salina tamponada fosfatada (STF), de pH 7,2, misturando-se 4 partes de solução salina a 0,85% com 1 parte de solução tampão de fosfatos com pH 7,2. Estas soluções foram todas mantidas em geladeira a $4-6^{\circ}\text{C}$.

- c) *Solução de ácido tânico* — Preparou-se solução mãe de ácido tânico a 1/1.000 em água destilada que era mantida a $4-6^{\circ}\text{C}$ ao abrigo da luz e substituída cada 15 dias. A partir desta solução mãe, por diluição a 1/20 em salina tamponada fosfatada, de pH 7,2, prepararam-se, diariamente, as soluções de ácido tânico a 1/20.000.

- d) *Antitoxina diftérica* — Foi usada antitoxina diftérica altamente purificada, produzida pelo Instituto Butantan, com título de 1.000 unidades floculantes por ml.

- e) *Toxina diftérica padrão* — Empregou-se toxina diftérica, fornecida pelo Instituto Pinheiros, com título de 18,03 Lf e 1:500 DMM por ml.

- f) *Soro normal de coelho* — O soro normal de coelho (SNC) foi obtido pela sangria de vários coelhos normais, absorvido com hemácias humanas do tipo O, Rh negativas. A absorção foi realizada misturando-se partes iguais de soro normal de coelho e de hemácias humanas lavadas três vezes com A.C.D. Após um contato de 10 minutos em temperatura ambiente procedeu-se à centrifugação e o sobrenadante foi decantado. Em seguida, este soro absorvido, depois de inativado em banho-maria a 56°C por 30 minutos, foi diluído a 1% em STF de pH 7,2. Esta solução foi sempre mantida a $4-6^{\circ}\text{C}$ e substituída semanalmente.

- g) *Técnica de hemaglutinação passiva* — Foi seguida, com pequena modificação, a técnica empregada por SINITSYN¹² e YAFAYEV & CHAPELEV¹⁷, para a adsorção de antitoxina às hemácias taninizadas.

A taninização das hemácias foi feita misturando-se partes iguais da suspensão de hemácias a 3% e da solução de ácido tânico a 1/20.000, deixando-se em

contato por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Após este tempo de contato, as hemácias foram centrifugadas a 1.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante desprezado e substituído por STF de pH 7,2, para proceder-se à lavagem das hemácias. Após nova centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm, em tubo graduado, o sobrenadante foi desprezado e as hemácias ressuspensas a 2,5% em STF de pH 7,2. Esta suspensão foi conservada a 4-6°C por 24 horas no máximo.

A sensibilização foi realizada misturando-se 4 volumes de antitoxina diluída a 1:10 em TF de pH 6,4 com um volume da suspensão a 2,5% de hemácias tannizadas. A mistura foi mantida em banho-maria a 37°C por 50 minutos. Em seguida as hemácias foram lavadas duas vezes com SNC a 1%, ressuspensas a 2,5% ainda em SNC a 1% e a suspensão final foi conservada por 48 horas a 4-6°C.

Os soros humanos foram descongelados rapidamente e inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Em seguida, partindo-se de 0,5 ml de cada soro, prepararam-se diluições com fator 2, em tubos 12 x 75 mm, usando-se 0,5 ml de SNC a 1% como diluente. O volume final em cada tubo era de 0,5 ml e se juntou a seguir, a cada um, 0,05 ml da suspensão a 2,5% de hemácias humanas sensibilizadas. Após agitação de aproximadamente 30 segundos, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente. As leituras da hemaglutinação foram feitas segundo o padrão estabelecido por STAVITSKY¹³, após 2 e 18 horas, considerando-se a recíproca da maior diluição de soro que correspondesse à leitura de ++ como o título de hemaglutinação do soro.

Processo semelhante foi seguido para a pesquisa de toxina diftérica em urina, tendo-se apenas tido sempre o cuidado de neutralizar previamente os espécimes com grau mais elevado de acidez. Este cuidado passou a ser tomado após a verificação de que a hiperacidez da urina

provocava hemólise ou reações inespecíficas.

Na reação foram incluídas, como controles, misturas compostas de 0,5 ml de SNC a 1% mais 0,05 ml de suspensão de hemácias humanas a 2,5% sensibilizadas e de 0,5 ml de SNC a 1% mais 0,05 ml de suspensão de hemácias humanas a 2,5% tannizadas.

As dosagens dos soros humanos foram acompanhadas da dosagem da toxina padrão. A toxina padrão, com título de 18,03 Lf e 1:500 DMM por ml, foi inicialmente diluída de forma a se ter 10 Lf por ml. Desta diluição tomou-se 0,1 ml, contendo 1 Lf, e juntou-se a 0,9 ml de cada um de 3 soros de indivíduos Schick-positivos com menos de 0,004 UA/ml. Partindo-se de cada uma destas três misturas prepararam-se duas séries de diluições, com volume final de 0,5 ml, desde 10⁻¹ até 10⁻⁴, com intervalos logarítmicos de 0,1, procedimento de diluição recomendado por HORSFALL & TAMM⁶. Em seguida, todos os tubos receberam 0,05 ml da suspensão a 2,5% de hemácias sensibilizadas. A incubação e a leitura foram realizadas da mesma forma descrita para a titulação dos soros humanos. Cada uma destas seis determinações revelou título de 10^{3,8}, ou seja, 6.309,5, o que corresponde a 0,00032 Lf por ml. Este valor de 0,00032 foi o fator de multiplicação utilizado para converter os títulos de hemaglutinação em Lf/ml.

RESULTADOS

Os resultados relativos ao primeiro grupo de 75 pacientes, com diagnóstico clínico inicial de "difteria típica" ou de "suspeita de difteria", são apresentados em dois subgrupos, considerando-se, de um lado, os doentes cujo diagnóstico clínico de difteria foi mantido e, de outro, aqueles que o tiveram modificado posteriormente.

TABELA I

Resultados da pesquisa bacteriológica de *Corynebacterium diphtheriae* no material da garganta e da pesquisa de toxina diftérica no sangue, por reação de hemaglutinação passiva, em pacientes com diagnóstico clínico de difteria, internados no Hospital Emilio Ribas — São Paulo, 1966

Paciente	Presença de <i>C. diphtheriae</i> na garganta *	Pesquisa de toxina diftérica no sangue		Paciente	Presença de <i>C. diphtheriae</i> na garganta *	Pesquisa de toxina diftérica no sangue	
		Título de hemaglutinação	Toxina Lf/ml			Título de hemaglutinação	Toxina Lf/ml
1	—	2	0,00064	28	+	8	0,00256
2	+	2	0,00064	29	+	8	0,00256
3	—	16	0,00512	30	+	16	0,00512
4	+	0 **	0	31	+	0	0
5	+	1	0,00032	32	+	16	0,00512
6	+	0	0	33	+	0	0
7	—	0	0	34	+	8	0,00256
8	+	32	0,01024	35	+	0	0
9	+	16	0,00512	36	+	16	0,00512
10	+	64	0,02048	37	+	16	0,00512
11	+	0	0	38	+	16	0,00512
12	+	32	0,01024	39	+	0	0
13	—	32	0,01024	40	+	32	0,01024
14	+	16	0,00512	41	+	0	0
15	—	16	0,00512	42	—	0	0
16	+	0	0	43	+	128	0,04096
17	+	2	0,00064	44	+	0	0
18	—	0	0	45	—	0	0
19	—	32	0,01024	46	+	32	0,01024
20	—	1	0	47	—	16	0,00512
21	+	2	0,00064	48	+	0	0
22	+	2	0,00064	49	+	0	0
23	+	16	0,00512	50	—	4	0,00128
24	+	8	0,00256	51	+	32	0,01024
25	+	1	0,00032	52	+	0	0
26	+	0	0	53	—	0	0
27	—	0	0				

* Exame realizado no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo.

** 0 = hemaglutinação negativa no soro não diluído.

Na Tabela I encontram-se os resultados dos 53 pacientes na primeira condição. O exame microscópico da cultura do material de garganta, em Loeffler, indicaria 39 casos positivos (73,6%) e a prova de hemaglutinação passiva, realizada com o sangue dos doentes, 33 (62,3%). Tomando-se os casos positivos revelados por uma ou pela outra técnica ou por ambas, encontram-se 47

(88,7%). Dêstes, a cultura revelou 83,0% e a hemaglutinação passiva, 70,2%.

Ambos os processos acusaram igual resultado em 25 casos positivos e em 6 negativos. Mostraram-se concordantes, portanto, em 31 casos e discordantes em 22, o que corresponde a taxas de concordância de 58,5% ou de 66,0%,

TABELA II

Resultados da pesquisa bacteriológica de *Corynebacterium diphtheriae* no material da garganta e da pesquisa de toxina diftérica no sangue, por reação de hemaglutinação passiva, em pacientes internados no Hospital Emílio Ribas, com diagnóstico clínico inicial de suspeita de difteria, modificado posteriormente — São Paulo, 1966

Paciente	Diagnóstico clínico posterior	Presença de <i>C. diphtheriae</i> na garganta *	Pesquisa de toxina diftérica no sangue	
			Título de hemaglutinação	Toxina Lf/ml
1	Amigdalite	—	16	0,00512
2	Amigdalite	—	0 ***	0
3	Amigdalite	—	1	0,00032
4	Amigdalite	—	32	0,01024
5	Amigdalite	—	0	0
6	Rinofaringite	—	0	0
7	Amigdalite **	—	16	0,00512
8	Amigdalite	+	0	0
9	Amigdalite	—	0	0
10	Amigdalite	+	0	0
11	Amigdalite	—	32	0,01024
12	Amigdalite	—	64	0,02048
13	Amigdalite	—	128	0,04096
14	Estomatite herpética	+	2048	0,65536
15	Amigdalite	—	8	0,00256
16	Estomatite aftosa	—	0	0
17	Amigdalite	—	16	0,00512
18	Faringite	+	0	0
19	Amigdalite	—	32	0,01024
20	Estomatite e Amigdalite	—	8	0,00256
21	Amigdalite	—	16	0,00512
22	Faringite	—	0	0

* Exame realizado no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo.

** Caso de amigdalite em comunicante de difteria.

*** Hemaglutinação negativa no sêro não diluído.

conforme se consideram, respectivamente, todos os 53 casos com diagnóstico clínico de difteria ou apenas os 47 casos positivos em ambos ou em um dos métodos.

Nos casos em que foi encontrada, o teor de toxina no sangue circulante variou de 0,00032 a 0,00512 Lf/ml, tendo sido de 0,00538 Lf/ml a média geométrica dos valores obtidos.

Na Tabela II são encontrados os resultados dos 22 pacientes cujo diagnóstico clínico inicial de difteria ou de suspeita de difteria foi modificado posteriormente. O exame bacteriológico indicaria 4 casos positivos (18,2%) e a prova de hemaglutinação passiva, 13

(59,1%). Tomando-se os casos positivos evidenciados por uma ou pela outra técnica ou por ambas, encontram-se 16 (72,7%). Dêstes, a cultura revelou 25,0% e a hemaglutinação passiva, 81,3%.

Neste grupo, ambos os processos acusaram resultados iguais em 1 caso positivo e em 6 negativos. Foram concordantes, assim, em 7 casos e discordaram em 15. As taxas de concordância, conforme se consideram todos os 22 casos ou apenas os 16 com resultado positivo por ambos ou por apenas um dos métodos, baixaram para 31,8% e 43,8%, respectivamente.

TABELA III

Resultados da pesquisa bacteriológica de *Corynebacterium diphtheriae* no material da garganta e da pesquisa de toxina diftérica no sangue, por reação de hemaglutinação passiva, em portadores de várias doenças, internados no Hospital Emilio Ribas — São Paulo, 1966

Paciente	Diagnóstico clínico	Presença de <i>C. diphtheriae</i> na garganta *	Pesquisa de toxina diftérica no sangue	
			Título de hemaglutinação	Toxina Lf/ml
1	Sarampo	N **	0 ***	0
2	Sarampo	N	0	0
3	Moléstia indeterminada	—	0	0
4	Broncopneumonia	—	0	0
5	Doença indeterminada	—	0	0
6	Varicela	N	0	0
7	Febre a esclarecer	N	0	0
8	Meningite infecciosa	N	0	0
9	Doença indeterminada	N	0	0
10	Monilíase	—	0	0

* Exame realizado no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo.

** N = exame não realizado.

*** 0 = hemaglutinação negativa no soro não diluído.

O teor de toxina circulante, nos casos em que pôde ser dosada, variou de 0,00032 a 0,65536 Lf/ml e a média geométrica dos seus valores, igual a 0,00827 Lf/ml, foi superior àquela do primeiro grupo.

É de notar-se o caso, inicialmente suspeito de difteria e com diagnóstico posterior de "estomatite herpética", cujo título de hemaglutinação, tendo alcançado o valor 2.048, revelaria a elevada concentração de 0,65536 Lf de toxina diftérica por ml de sangue circulante.

Os resultados, apresentados na Tabela III, referentes aos 10 portadores de várias outras doenças foram todos negativos, inclusive para os casos em que foi feito o exame bacteriológico.

Os poucos espécimes de urina examinados, todos de doentes com diagnóstico clínico de difteria típica e com exame bacteriológico positivo, revelaram nítida hemaglutinação.

DISCUSSÃO

Esta investigação é a primeira de uma série de estudos sobre o emprêgo de hemácias sensibilizadas com antitoxina diftérica na adaptação da técnica da hemaglutinação passiva à pesquisa da toxina do *C. diphtheriae* em material patológico. Visa à obtenção final de um método que, pela rapidez de execução, especificidade e sensibilidade, permita o diagnóstico da difteria e que possa, pela sua aplicabilidade à determinação do teor de toxina presente, servir ao estudo da patogenia desta doença.

A técnica revelou-se altamente sensível e precisa, capaz de revelar repetidamente a presença de apenas 0,00032 Lf/ml da toxina diftérica padrão, diluída em soros de pessoas Shick-positivas com menos de 0,0004 UA/ml. A obtenção das hemácias taninizadas sensibilizadas não oferece dificuldades, pelo menos quando se emprega, como foi feito, antitoxina altamente purificada. Entretanto, para processo de rotina não

seria desejável ter-se de, a curtos intervalos, realizar novas preparações, como requer o uso de tal sistema. Os autores tencionam verificar, em trabalho posterior, a possibilidade de utilizar hemácias formalinizadas para obviar êste inconveniente. Pretendem, também, estudar o comportamento de hemácias de maior massa, de outras espécies animais, capazes de tornar ainda menor o tempo, já bastante curto, de leitura da reação.

Dada a inexistência de base de referência exata, os resultados dêste trabalho preliminar ainda não permitem julgamento seguro do valor, para o diagnóstico de difteria, da pesquisa da toxina específica no sangue de paciente. Com efeito, foi verificado que no grupo de doentes com diagnóstico clínico inicial e final de difteria, a toxina foi encontrada em apenas 62,3% dos casos e o exame microscópico da cultura do material de garganta, em Loeffler, foi positivo em 73,6%. Entretanto, é fato de todos sabido que, embora “quando cultivados, espalhados em lâmina e corados por técnica apropriada, os organismos em tais culturas” possam “usualmente ser reconhecidos por pessoa adequadamente treinada em tal trabalho”, “a evidência completa da identidade e tipo do microrganismo em questão somente pode ser obtida após o isolamento de uma cultura pura de *C. diphtheriae* a partir do paciente”¹. E por outro lado, é também sobejamente conhecida a dificuldade que pode oferecer o diagnóstico clínico desta doença, uma vez que “a difteria pode ocorrer sem o desenvolvimento de uma pseudomembrana” e “uma pseudomembrana indistinguível daquela causada por *C. diphtheriae* pode ser produzida por estreptococos ou pelos simbiontes fusospirilares da angina de Vincent”¹⁸.

Além dêstes fatos, deve-se acrescentar que nos casos ora estudados não foi possível, muitas vezes, saber-se com segurança se os doentes haviam ou não sido tratados, antes do internamento, com antitoxina diftérica ou com antibióticos.

Aquela, neutralizando a toxina circulante, tornaria impossível a sua evidenciação. Êstes prejudicariam o exame bacteriológico do material de garganta.

Em outra investigação sobre a aplicação ao diagnóstico da difteria da técnica ora estudada, CHRISTOVÃO, COTILLO & CANDEIAS⁵ compararam os resultados* do exame bacteriológico completo do material de garganta — através do isolamento, identificação e prova de toxigenicidade do *C. diphtheriae* — com aquêles obtidos pela pesquisa da presença de toxina diftérica no local da infecção.

Em trabalho em fase de planejamento, os autores tentarão obter resposta definitiva do problema, valendo-se de investigação clínica a mais rigorosa possível, de doentes com antecedentes terapêuticos realmente conhecidos, e comparando os resultados de exames bacteriológicos ainda mais completos com os da pesquisa e dosagem da toxina diftérica simultaneamente no local de infecção, no sangue circulante e na urina.

Um método diagnóstico de tal natureza, baseado no uso de partículas inertes recobertas por anticorpos para a pesquisa de antígenos específicos, se efetivo e prático, poderia ser adaptável ao caso de outras infecções e constituir técnica sorológica extraordinariamente vantajosa pela capacidade óbvia de poder oferecer resultados nas fases iniciais dos processos infecciosos, muito antes do aparecimento de anticorpos em quantidades reveláveis. Daria resultados ainda muito mais precocemente em todos aquêles casos onde, pela elevada frequência de anticorpos residuais, se é obrigado a pesquisar elevação de títulos para a comprovação de uma infecção.

Êste trabalho já se encontrava em redação quando uma revisão mais extensa

* Os resultados preliminares desta investigação foram apresentados, em nota prévia, na sessão ordinária de 4 de outubro de 1965 do Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina.

da literatura revelou a existência de importante investigação de WILDFÜHR¹⁶, no qual o autor pôde revelar e dosar a toxina diftérica no sangue e líquido céfalo-raquiano, através de provas intradérmicas em coelho, e estudar a relação dos seus resultados com o aparecimento de casos de paralisias tardias.

CONCLUSÕES

1. É possível aplicar-se a técnica da hemaglutinação passiva, empregando-se hemácias sensibilizadas com antitoxina diftérica, na evidênciação e dosagem da toxina do *C. diphtheriae* no sangue circulante.
2. O processo oferece simplicidade de execução, pode acusar o resultado em menos de 2 horas e revelou-se capaz de evidenciar até 0,00032 Lf de toxina diftérica por ml de soro.
3. Tal método é de utilidade no diagnóstico da difteria e poderá ter valor no estudo da patogenia desta doença.

SUMMARY

A procedure was tried for the serological detection of *C. diphtheriae* toxin in the blood of diphtheria patients through a passive hemagglutination test employing type O, Rh negative human erythrocytes sensitized with diphtheria antitoxin. The method proved simple, sensitive to the point of detecting as little as 0.00032 Lf of toxin per ml of serum and renders results in about 2 hours. The reaction, designed to reveal the presence of an identifying antigen and not of specific antibodies, offers a great possibility of advantageous application in the diagnosis and in the study of pathogenesis of diphtheria. Similar methods might be applied to other infections with identical aims.

AGRADECIMENTO

Ao Dr. José da Silva Guedes, médico do Hospital do Isolamento Emilio Ribas de São Paulo, que nos proporcionou tôdas as amostras de sangue examinadas neste trabalho, os autores manifestam o seu profundo reconhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Diphtheria. *In* — Diagnostic procedures and reagents. 4th ed. New York, 1963. p. 231-232.
2. BIER, O. — Observations préliminaires sur l'hémagglutination, l'hémolyse et la congélation "passives". *Ann. Inst. Pasteur*, 81(1):650-656, jul./dec. 1951.
3. BOYDEN, S. V. — The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93(2):107-120, Feb. 1951.
4. CHERRY, W. B. & MOODY, M. D. — Fluorescent-antibody techniques in diagnostic bacteriology. *Bacteriol. Rev.*, 29(2):222-250, Jun. 1965.
5. CHRISTOVÃO, D. de A.; COTILLO Z., L. G. & CANDEIAS, J. A. N. — Diagnóstico rápido da difteria através da prova de hemaglutinação passiva. (Em vias de publicação).
6. HORSFALL, F. L. & TAMM, I. — Fractional dilution procedure for precise titration of hemagglutinating viruses and hemagglutination-inhibiting antibodies. *Jour. Immunol.*, 70(3):253-259, Mar. 1953.
7. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. — Experimental immunochemistry. 2th ed. Chicago, Ill., Charles C. Thomas Publisher, 1964. p. 121.
8. MIDDLEBROOK, G. & DUBOS, R. J. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. Exp. Med.*, 88(55):521-528, Nov. 1948.
9. PRESSMAN, D.; CAMPBELL, D. H. & PAULING, L. — The agglutination of intact azo-erythrocytes by antisera homologous to the attached groups. *Jour. Immunol.*, 44(2):101-105, June 1942.
10. RYTSAL, T. — Citado por SINITSYN, V. A.¹¹.
11. SINITSYN, V. A. — Use of the indirect hemagglutination reaction in detection of botulinic toxins. I. Detection of botulinic toxins types A and B by means of the indirect hemagglutination reaction as modified by Ritsay. *J. Microb. Epid. Immunol.*, 31(3):408-414, 1960.

CHRISTOVAO, D. de A. & COTILLO Z., L. G. — Pesquisa e dosagem da toxina diftérica no sangue de pacientes de difteria por reação de hemaglutinação passiva. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20:223-232, 1966.

12. SINISTSYN, V. A. — The use of the indirect hemagglutination test for determining *C. botulinum* toxins. II. A modified method of the indirect hemagglutination test and a comparative evaluation of it with same tests used for detecting *C. botulinum* toxin. *J. Microb. Epid. Immunol.*, 31(4):703-708, 1960.
13. STAVITSKY, A. B. — Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 72(5):360-367, May 1954.
14. ————— & ARQUILLA, E. R. — Micromethods for the study of protein and antibodies. III. Procedure and applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition with bis-diazotized benzidine and protein-conjugated red blood cells. *J. Immunol.*, 94(4):306-312, Apr. 1955.
15. WARBURTON, M. F.; KEOGH, E. V. & WILLIAMS, S. W. — Hemagglutination test for the diagnosis of influenzal meningitis. *Med. J. Australia*, 1(5):135-137, Jan. 1949.
16. WILDFÜHR, G. — Über Diphtherietoxingehalt in Patientenblut und Liquor bei Diphtherie-Spätlähmungen. *Zblatt. Bak.*, 154(1):18-26, Mai 1949.
17. YAFAYEV, R. Kh & CHEPELEV, S. A. — The use of the indirect hemagglutination test for the detection of *C. botulinum* toxin in sausages. *J. Microb. Epid. Immunol.*, 32(11):1988-1993, Feb. 1951.
18. ZINSSER, H. — Microbiology. 13th ed. by David T. Smith et alii. New York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1964. p. 492.