

## ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA RUBÉOLA NUM GRUPO DE GESTANTES DE SÃO PAULO <sup>(1)</sup>

Luis G. COTILLO Z.

---

Determinou-se os níveis de anticorpos neutralizantes contra rubéola em 778 soros de igual número de pacientes que freqüentam o ambulatório da Casa Maternal Leonor Mendes de Barros. Destas 778 mulheres, 600 (77,12%) apresentavam níveis de anticorpos iguais ou superiores a 4 (diluição 1:4). Em relação à idade, o grupo examinado, com uma idade média de 25,6 anos, permite verificar que no grupo etário de 15 a 19 anos a freqüência de pacientes com anticorpos na diluição 1:4 ou maior é de 79,43%; no grupo de 20 a 24 anos, 75,69%; no de 25 a 29, 77,38%; de 30 a 34, 82,50%; de 35 a 39, 75,68% e de 40 a 44, 50,00%. A comparação dos resultados obtidos em cada grupo etário da amostra examinada, mostra que os percentuais de positividade das idades compreendidas entre 15 e 39 anos são muito próximas, sendo que o grupo de 40 a 44 anos apresenta um percentual notadamente menor de pacientes com anticorpos. Esta discordância demonstrou-se estatisticamente significativa ao nível de 0,01. No que se refere à cor, das 350 gestantes de cor branca, 79,14% apresentaram anticorpos nos níveis mencionados anteriormente; das 90 pacientes de cor preta, 75,56%; das 317 mulheres grávidas de cor parda, 75,71% e das 21 gestantes de cor amarela, 71,43% possuíam níveis de anticorpos. Para inquéritos soro-epidemiológicos de larga escala, a prova de neutralização apresenta inconvenientes de ordem prática pelo que se faz necessário estudar mais amplamente a correlação dos resultados desta técnica com aqueles fornecidos por outros, entre os quais se destaca, sem dúvida, a reação de inibição da hemaglutinação.

---

### INTRODUÇÃO

Depois de mais de um século de relativa escuridão sobre esta doença transmissível da infância e adolescência, ela adquiriu uma nova preeminência nos primórdios da Segunda Grande Guerra, após as observações de Gregg em 1941 (WELLER & NEVA<sup>28</sup>, 1965), apresentando correlação entre a catarata observada em 78 crianças e a infecção pelo vírus da rubéola das mães no primeiro trimestre de gravidez. Este novo aspecto da rubéola trouxe uma mudança permanente de atitude por parte dos médicos e do povo em geral. A maioria dos ca-

sos, especialmente entre crianças, provavelmente nunca recorreu à assistência médica, falseando em consequência, os estudos sobre tendência de morbidade e distribuição.

Além de serem as epidemias de rubéola fator de alteração nas populações escolares e militares, esta doença é uma das poucas entre as ocasionadas por vírus, que apresentam efeito teratogênico sobre o feto, o que ocorre quando a rubéola atinge a paciente no primeiro trimestre da gestação. A rubéola materna no primeiro trimestre da gravidez traz

---

(1) Da Cadeira de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP. — Resumo da Tese de Doutorameto, apresentada à Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP, em 20-12-1967.

consigo 18% a 19% de probabilidade de provocar malformações congênitas.

A importância cada vez maior que a rubéola está alcançando entre as doenças de etiologia viral, nos leva, neste primeiro trabalho, a determinar o nível médio de anticorpos neutralizantes contra rubéola, a fim de conhecer a incidência da doença, assim como a sua distribuição, escolhendo para tanto o grupo no qual a doença manifesta a sua total periculosidade, as gestantes.

O emprêgo da técnica de soro-neutralização, para a determinação do nível de anticorpos, embora seja uma técnica muito demorada (requer 7 dias para se fazer a leitura final) e demande enorme gasto de material, pessoal e tempo, pareceu-nos o mais apropriado uma vez que as reações recentemente descritas, entre as quais sem dúvida se destaca a de inibição da hemaglutinação, carecem de estudos comparativos.

Neste trabalho, portanto, descreveremos os resultados conseguidos através da prova de neutralização, embora continuemos as nossas experiências com as outras técnicas.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Coleta de soros* — Os soros foram obtidos de mulheres grávidas que freqüentam o ambulatório da Casa Maternal Leonor Mendes de Barros. A amostragem, feita com a ajuda do Departamento de Estatística Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, assinalou por meio de sorteio, empregando a tabela de números casuais, 15 dias do mês de maio, dias nos quais se obteve mais ou menos 10 ml de sangue de tôdas as grávidas que compareceram ao hospital. Cada uma destas pacientes foi submetida a uma única sangria, conseguindo-se um total de 784 amostras.

Os soros obtidos destas sangrias foram todos guardados, sem serem inativados, no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da prova.

*Cultura de células* — As células RK-13, linhagem de células de rim de coelho, foram inicialmente obtidas do Instituto Adolfo Lutz e submetidas a 30 repiques no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Aplicadas da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, antes de se iniciar a realização das provas de soro-neutralização.

Para a cultura destas células usou-se como meio de crescimento o meio de Eagle com 15% de soro de vitelo, soro previamente inativado a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, e as tripsinizações para subculturas foram realizadas com a mistura de tripsina a 0,2% mais versene a 0,02%.

Com a finalidade de preparar as culturas de células em tubos, necessárias para a realização das provas de soro-neutralização, foram preparadas culturas em garrafas de Roux, semanalmente. As garrafas eram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 7 dias, ao fim dos quais eram submetidas à tripsinização da maneira descrita acima. Cada garrafa de Roux proporcionava aproximadamente de 120 a 150 tubos contendo 200.000 células por ml. Os tubos assim preparados eram incubados em posição estacionária até atingir confluência total (em geral do terceiro ao quinto dia), após o que se procedia à troca do meio de crescimento para o meio de manutenção, que consistia de meio de Eagle (LEERHOY<sup>11</sup>, 1966) com 2% de soro de galinha (PARKMAN et alii<sup>15</sup>, 1964), previamente inativado a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Esta troca de meio foi sempre efetuada no dia anterior ao da inoculação, nos tubos com as culturas de células, com a finalidade de se verificar a ausência de contaminação nos mesmos.

*Vírus da rubéola* — O vírus da rubéola usado no presente estudo foi a amostra gentilmente enviada pelo Dr. J. A. Dudgeon, correspondente à cepa denominada "West Point", com número de referência RVRB-21, tendo sido submetida a 16 passagens em RK-13, antes de chegar ao nosso Laboratório e com um

título de  $10^{3,5}$  DICT<sub>50</sub> por ml. Esta amostra foi sub-cultivada quatro vezes na linhagem de células utilizadas neste trabalho, atingindo após este período títulos que oscilaram entre  $10^{4,0}$  e  $10^{4,3}$  DICT<sub>50</sub> por ml.

*Soros hiperimunes contra rubéola* — Foram igualmente remetidos pelo Dr. J. A. Dudgeon uma amostra de soro hiperimune de coelho, com número de referência R3/66 e com um título neutralizante maior que 1/16 e um "pool" de soros de convalescentes de rubéola com um título neutralizante de 1/128.

*Prova de neutralização* — A prova de neutralização foi realizada empregando-se diluições seriadas dos soros e dose constante de vírus. Embora PARKMAN et alii<sup>15</sup> (1964) tenham descrito alterações nos níveis de anticorpos segundo as diferentes doses de vírus a serem empregadas, foi fixada a alíquota de vírus contendo 100 DICT<sub>50</sub>, determinada por titulação prévia, segundo as recomendações de McCARTHY, TAYLOR-ROBINSON & PILLINGER<sup>12</sup> (1963); DUDGEON, BUTLER & PLOTKIN<sup>4</sup> (1964) e HUTCHINSON & THOMPSON<sup>8</sup> (1965). As diluições dos soros realizaram-se em meio basal de Eagle sem soro e a diluição de vírus para atingir a concentração desejada efetuou-se em meio basal de Eagle com 1% de albumina bovina (CHANG & GEYER<sup>3</sup>, 1957 e PARKMAN et alii<sup>15</sup>, 1964).

Volumes iguais das diluições dos soros não inativados (McCARTHY, TAYLOR-ROBINSON & PILLINGER<sup>12</sup>, 1963) e do vírus foram misturados e incubados a 37°C por uma hora, após o que conservaram as misturas na geladeira 2 horas antes da inoculação. Para cada uma das diluições dos soros, inocularam-se 2 tubos de RK<sub>13</sub>, que apresentavam confluência total e nos quais tinha sido colocado o meio de manutenção da maneira descrita acima. Cada tubo recebeu 0,2 ml da mistura soro-vírus. A incubação dos tubos inoculados realizou-se a 37°C, em posição estacionária, realizan-

do-se as leituras no terceiro, quinto e sétimo dia, ao microscópio com um aumento de 84 vezes, à luz do dia, a fim de determinar o efeito citopático que apresentassem as células.

O efeito citopático da cêpa do vírus da rubéola usada no presente trabalho é aquele descrito por DUDGEON, BUTLER & PLOTKIN<sup>4</sup> (1964), para o vírus adaptado a RK<sub>13</sub>. Segundo a descrição deste autor, no terceiro dia as células dos extremos da camada celular sofrem um arredondamento, apresentando ao mesmo tempo focos que podem ser apreciados em toda a extensão da camada. Por volta do quinto dia, aproximadamente, as culturas inoculadas apresentam muitos focos com grandes acúmulos de granulações eosinófilas no citoplasma. No sétimo ou oitavo dia as áreas destes focos já se estenderam e a necrose celular apresenta-se avançada, aparecendo espaços livres de células na camada celular. Para a amostra empregada neste estudo o efeito citopático mostrando desintegração de mais de 50% das células foi conseguido entre o oitavo e nono dias, apresentando-se a completa desintegração da camada celular entre os 10.<sup>o</sup> e 12.<sup>o</sup> dias, como se pode observar nas fotografias apresentadas. (Figs. 1 e 2).

O ponto final da titulação é dado pela mais alta diluição do soro, que mostra uma proteção parcial das células inoculadas com a mistura soro-vírus, ao fim de sete dias, sendo expresso o título de anticorpos presentes nesse soro como a recíproca dessa diluição.

Aquêles soros que não mostravam inibição da replicação viral na diluição de 1/4 foram considerados como desprovidos de anticorpos (DUDGEON, BUTLER & PLOTKIN<sup>4</sup>, 1964).

As células normais, não inoculadas, apresentam uma disposição fechada de células poligonais, mostrando cada célula numerosos vacúolos e ocasionalmente encontrando-se células multinucleadas ou com grandes vacúolos.

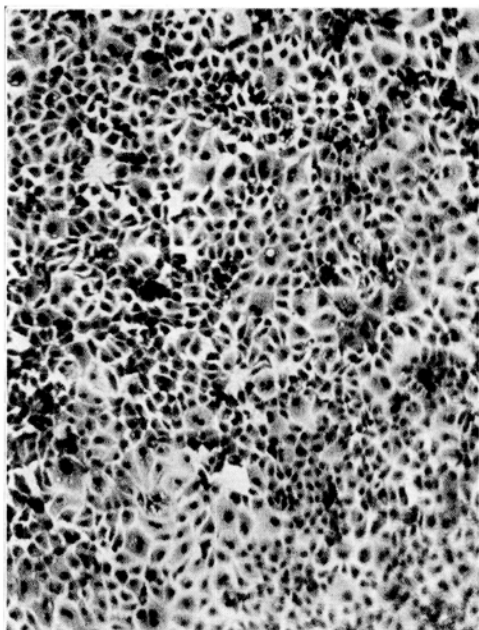


Fig. 1 — Células RK 13 não inoculadas (Contrôle). Nove dias de incubação a 37°C. Coloração hematoxilina e eosina. 250 ×.

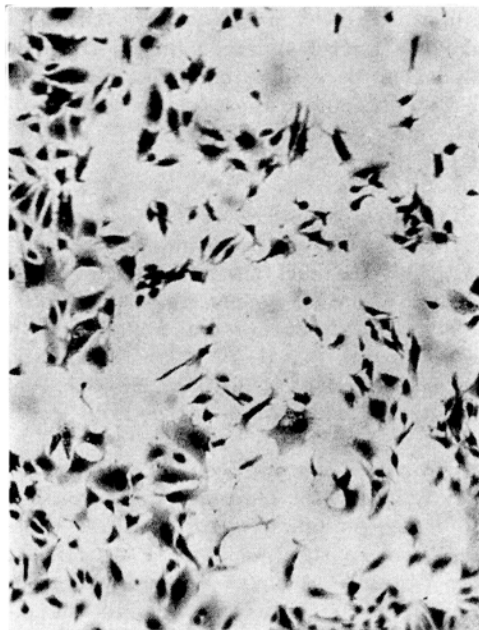


Fig. 2 — Efeito citopático do 9.º dia nas células de RK 13 inoculadas com a cepa «West Point» de vírus da rubéola. Coloração hematoxilina e eosina. 250 ×.

Os contrôles realizados com cada uma das séries de soros foram os seguintes:

- Contrôle do vírus, inoculando 100, 10, 1 e 0,1  $DI_{50}$  em 0,1 ml;
- Contrôle de neutralização positiva, sôro de convalescente de rubéola e sôro hiperimune de coelho;
- Contrôle da toxicidade dos soros, inoculando os soros diluídos a 1/4.

#### RESULTADOS

Durante os dias em que foi realizada colheita de sangue das mulheres grávidas, que freqüentaram o Ambulatório da Casa Maternal Leonor Mendes de Barros, obtivemos 784 amostras, das quais foram eliminadas 6, apresentando-se assim unicamente em tôdas as tabelas e gráficos os resultados de 778 soros.

Em se tratando de profissão, 700 (89,3%) das gestantes manifestaram es-

tarem entregues unicamente às obrigações de dona de casa, 70 (8,9%) declararam serem empregadas domésticas, o que perfaz um total de 770 (98,2%) e equivale à quase totalidade da amostra.

Esta predominância de mulheres dedicadas a uma única ocupação impede-nos de tentar correlacionar as atividades das pacientes integrantes dêste estudo com o nível de anticorpos neutralizantes contra rubéola. Todavia, segundo observaram SEVER, NELSON & GILKESON<sup>20</sup> (1965) ao estudarem os efeitos da epidemia de rubéola em 1964 nos Estados Unidos, as donas de casa apresentaram a mesma incidência de rubéola clínica que as mulheres dedicadas a outras atividades. Não vemos razões para que o mesmo fato não se apresente em nosso meio.

A dificuldade de determinar a veracidade das informações relativas ao estado civil, nos levou a não incluir êste item na avaliação da imunidade contra a ru-

béola. Únicamente com fins ilustrativos, consignamos que, das 778 gestantes integrantes de nosso estudo, 274 (35,22%) declararam serem solteiras, 495 (63,63%), casadas e 9 (1,16%) declararam outros estados civis.

Ao ser inquirida cada uma das mulheres grávidas sôbre se tinha tido ou não rubéola, a maioria não soube informar com certeza, existindo muitas que nunca tinham ouvido falar sôbre esta doença. Isto nos levou a deixar de lado as informações coletadas sôbre a história da rubéola nas gestantes que integraram a nossa amostra. Um fato que reafirma a procedência da nossa atitude é o referido por SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup> (1964) que, ao estudarem a correlação entre o relato de rubéola anterior e a presença ou ausência de anticorpos neutralizantes, referem que de 176 mulheres que afirmaram ter tido rubéola, 150 (85,2%) apresentavam anticorpos e 26 (14,8%) não mostravam anticorpos. Das 288 grávidas que declara-

ram não ter tido rubéola, 234 (81,25%) apresentavam anticorpos e 54 (18,75%) não apresentavam anticorpos.

Desde que GREEN et alii<sup>7</sup> (1965) demonstraram que voluntários eram resistentes a infecções artificialmente induzidas com vírus da rubéola quando o nível de anticorpos neutralizantes contra rubéola no sôro era de pelo menos 4 (diluição 1:4), tomamos êste nível como determinativo da presença ou ausência de anticorpos.

Segundo êste critério, das 778 mulheres do nosso estudo, 600 (77,12%) apresentavam anticorpos e 178 (22,88%) denotavam ausência dos mesmos.

Das 600 que apresentavam anticorpos, 81,51% possuíam níveis que estavam entre as diluições 1:4, 1:8 e 1:16.

Das 600 que apresentavam anticorpos, 81,51% possuíam níveis que estavam entre as diluições 1:4, 1:8 e 1:16.

Na Tabela 1, onde apresentamos a distribuição das gestantes segundo a presença ou ausência de anticorpos em cada

TABELA 1

Distribuição percentual das gestantes com e sem anticorpos neutralizantes, segundo os grupos etários

Idade (Anos completos)	Total	Título de anticorpos neutralizantes			
		< 4 (1)		4 ou mais (2)	
		N.º	%	N.º	%
15 — 19	141	29	20,57	112	79,43
20 — 24	255	62	24,31	193	75,69
25 — 29	168	38	22,62	130	77,38
30 — 34	120	21	17,50	99	82,50
35 — 39	74	18	24,32	56	75,68
40 — 44	20	10	50,00	10	50,00
Total	778	178	22,88	600	77,12

(1) Título < 4 = Sem anticorpos neutralizantes.

(2) Título de 4 ou mais = Com anticorpos neutralizantes.

TABELA 2  
Distribuição dos grupos etários segundo o título de anticorpos neutralizantes contra Rubéola na amostra examinada

Idade (Anos completos)	Título neutralizante																	
	Total		< 4		4		8		16		32		64		128		256	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
15 — 19	141	20,57	29	20,57	35	24,82	30	21,28	26	18,44	10	7,09	1	0,71	6	4,26	4	2,83
20 — 24	255	24,31	62	24,31	57	22,35	47	18,43	53	20,78	21	8,24	2	0,78	8	3,14	5	1,97
25 — 29	168	22,62	38	22,62	33	19,64	33	19,64	38	22,62	14	8,33	3	1,79	4	2,38	5	2,98
30 — 34	120	17,50	21	17,50	35	29,17	27	22,50	20	16,67	7	5,83	5	4,17	3	2,50	2	1,66
35 — 39	74	24,32	18	24,32	17	22,97	18	24,32	11	14,87	7	9,47	0	0	1	1,35	2	2,70
40 — 44	20	50,00	4	50,00	4	20,00	5	25,00	0	0	1	5,00	0	0	0	0	0	0
Total	778	22,88	178	22,88	181	23,26	160	20,57	148	19,02	60	7,71	11	1,41	22	2,83	18	2,32

grupo etário, pode-se verificar que a frequência relativa apresenta pouca variação entre os 15 e 39 anos, mostrando um declínio acentuado no grupo etário de 40 a 44 anos.

Na Tabela 2 apresentamos a distribuição dos diversos níveis de anticorpos em cada um dos grupos etários da amostra examinada, assim como a distribuição daquelas que não apresentavam nível de anticorpos (título menor que 1:4).

Segundo se pode observar nesta tabela, em cada um dos grupos etários o percentual de indivíduos em cada nível de anticorpos vai decrescendo gradualmente, com pouquíssimas exceções, à medida que os títulos aumentam.

A Tabela 3 permite verificar, respectivamente, a distribuição das gestantes com e sem anticorpos em relação à cor e a distribuição das mulheres grávidas com anticorpos em relação à cor, podendo-se observar que 79,14% das brancas apresentam anticorpos neutralizantes contra a rubéola. As gestantes pretas e pardas apresentam quase o mesmo percentual

(75,56% e 75,71%, respectivamente) com anticorpos e nas de cor amarela se verifica que o percentual com título de anticorpos é unicamente 71,43%.

A distribuição dos diversos títulos neutralizantes de anticorpos segundo a cor da gestante é apresentada na Tabela 4, onde se pode observar, para cada uma das cores consideradas, o mesmo declínio gradual da frequência relativa a medida que os títulos de anticorpos vão aumentando, com exceção das pacientes de cor amarela, que apresentam resultados que não acompanham esta tendência.

#### DISCUSSÃO

A possibilidade de se determinar o nível de anticorpos contra a rubéola mediante um teste de reconhecida segurança, nos proporcionou a oportunidade de verificar a prevalência dos anticorpos neutralizantes contra rubéola num grupo populacional das mulheres grávidas que frequentam a Casa Maternal Leonor Mendes de Barros.

TABELA 3

Distribuição das gestantes com e sem anticorpos em relação à cor

C ô r	Total	Título de anticorpos neutralizantes			
		< 4 (1)		4 (2)	
		N.º	%	N.º	%
Branca	350	73	20,86	277	79,14
Preta	90	22	24,44	68	75,56
Parda	317	77	24,29	240	75,71
Amarela	21	6	28,57	15	71,43
Total	778	178	22,88	600	77,12

(1) Título < 4 = Sem anticorpos neutralizantes.

(2) Título de 4 ou mais = Com anticorpos neutralizantes.

TABELA 4  
Relação entre c6r e t6tulo de anticorpos neutralizantes contra Rub6ola na amostra estudada

C6r	Total		T6tulo neutralizante															
	N.º	%	< 4		4		8		16		32		64		128		256	
			N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Branca	350		73	20,86	74	21,14	76	21,71	69	19,71	35	10,00	2	0,57	13	3,72	8	2,29
Preta	90		22	24,44	21	23,33	18	20,00	16	17,78	5	5,56	1	1,11	4	4,45	3	3,33
Parda	317		77	24,29	84	26,50	61	19,24	58	18,30	18	5,68	8	2,52	4	1,26	7	2,21
Amarela	21		6	28,57	2	9,52	5	23,81	5	23,81	2	9,52	0	0	1	4,77	0	0
Total	778		178	22,88	181	23,26	160	20,57	148	19,02	60	7,71	11	1,41	22	2,83	18	2,32



A prova da sôro-neutralização, como método de determinação de nível de anticorpos circulantes, é técnica das mais adequadas para esta finalidade, dada a sua reprodutibilidade quando realizada em condições rigorosamente padronizadas e, freqüentemente, em sistemas celulares que permitam a sua leitura através de efeito citopático.

Por outro lado, para inquéritos sorológicos de larga escala esta prova apresenta inconvenientes de ordem prática como o grande número de tubos de culturas de células a serem inoculadas (o que envolve preparo de meios de cultura e outras manobras próprias do processo de cultivo de células "in vitro") e a necessidade de se esperar pelo menos 7 dias para se obter os resultados. Faz-se necessário estudar com mais detalhes a correlação dos resultados obtidos com esta técnica com os apresentados por outros, entre os quais se destaca a reação de inibição da hemaglutinação recentemente descrita por STEWART et alii<sup>25</sup> (1967).

A determinação destes anticorpos tem como principal objetivo estabelecer o grau de imunidade desta população e ao mesmo tempo avaliar os riscos a que se encontram expostas as gestantes que freqüentam este hospital, quando no primeiro trimestre da gravidez, de contrair rubéola ao serem expostas a casos endêmicos, surtos esporádicos na comunidade ou mesmo a uma epidemia.

É sábio que a infecção natural é seguida pela rápida aparição de anticorpos nos indivíduos doentes, como foi demonstrado por PARKMAN, BUESCHER & ARTENSTEIN<sup>14</sup> (1962); SEVER, SCHIFF & TRAUB<sup>22</sup> (1962); SIGURDARDOTTIR et alii<sup>24</sup> (1963); VERONELLI; MAASSAB & HENNESSY<sup>26</sup> (1962); WELLER & NEVA<sup>27</sup> (1962); GREEN et alii<sup>7</sup> (1965); SCHIFF et alii<sup>18</sup> (1965) e SEVER et alii<sup>23</sup> (1966).

É conhecido também que estes anticorpos persistem por muitos anos (KRUGMAN & WARD<sup>9</sup>, 1958; SCHIFF, SEVER & HUEBNER<sup>17</sup>, 1963; SCHIFF et alii<sup>18</sup>, 1965 e SEVER et alii<sup>23</sup>, 1966).

É finalmente aceito que a infecção por rubéola é seguida por uma imunidade para a vida toda (ANDERSON<sup>1</sup>, 1949; KRUGMAN et alii<sup>10</sup>, 1953; SEVER et alii<sup>23</sup>, 1966; PLOTKIN, CORNFELD & INGALLS<sup>16</sup>, 1965 e GREEN et alii<sup>7</sup>, 1965), muito embora alguns indiquem a possibilidade de reinfeção por rubéola, o que só seria possível de acontecer se a imunidade não fôsse duradoura (BRODY<sup>2</sup>, 1966).

Esta correlação entre ausência de anticorpos evidenciáveis pelas técnicas usuais e suscetibilidade à infecção pelo vírus da rubéola foi referida por vários investigadores, ao observarem que indivíduos que não apresentavam anticorpos eram suscetíveis à doença, enquanto que aqueles outros que possuíam anticorpos eram resistentes (SEVER, SCHIFF & TRAUB<sup>22</sup>, 1962). GREEN et alii<sup>7</sup> (1965) demonstraram conclusivamente este fato, assinando ainda que o título para separar indivíduos suscetíveis daqueles outros considerados imunes era o de 4. Estes autores observaram em 37 indivíduos, por eles considerados imunes (título de anticorpos de 4 ou mais), que nenhum deles adquiriu a doença, enquanto que 46 dos 54 indivíduos por eles catalogados como suscetíveis contraíram rubéola.

Em face das observações comentadas anteriormente é que resolvemos iniciar as nossas determinações de níveis de anticorpos neutralizantes contra rubéola na diluição 1:4 e a partir desta continuar as diluições usando como fator 2. Estas determinações nos forneceram os resultados consignados nas Tabelas 1 e 2, nas quais pode ser verificado que das 778 mulheres grávidas participantes do nosso estudo, 22,88% não mostraram anticorpos nos seus soros e 77,12% apresentaram títulos de anticorpos distribuindo-se da seguinte forma: diluição 1:4, 23,26%; 1:8, 20,57%; 1:16, 19,02%; 1:32, 7,71%; 1:64, 1,41%; 1:128, 2,83% e 1:256, 2,32%; constatando-se que nas três primeiras diluições estão compreendidas 62,85% das gestantes. Os títulos por nós encontrados estão em concordân-

cia com os determinados por todos os autores de nosso conhecimento que abordaram o problema da determinação de níveis de anticorpos contra a rubéola.

Ao comparar os resultados obtidos no grupo de mulheres grávidas de São Paulo, com os apresentados por outros pesquisadores, verifica-se que no grupo de São Paulo, 77,12% mostraram níveis de anticorpos e 22,88% não os apresentaram, enquanto que das 600 gestantes de um grupo de hospitais dos Estados Unidos (SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup>, 1964), em 82,5% foram verificados níveis de anticorpos considerados protetores e 17,5% não os apresentaram. Na Inglaterra, OXFORD<sup>13</sup> (1966) assinala igualmente para o grupo por êle estudado que aproximadamente 24% das mulheres grávidas não apresentaram anticorpos e GIVAN, ROZEE & RHODES<sup>5</sup> (1965), no Canadá, observaram a presença de 20% sem níveis de anticorpos neutralizantes.

Por outro lado, ao se contrastar os resultados obtidos neste trabalho com outros estudos, verifica-se que em mulheres índias e esquimós do Alaska em 1964 a percentagem de indivíduos sem anticorpos neutralizantes era de 18%, muito próximo dos resultados apresentados no parágrafo anterior, enquanto que num grupo de 50 mulheres de Hawaii, estudado no mesmo ano, 44,4% não apresentavam níveis de anticorpos (SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup>, 1964). Outros grupos populacionais do mesmo Hawaii, referidos por SEVER et alii<sup>23</sup> (1965), dão para o Hospital Kaiser, de Honolulu, 58% e para Hilo, 71% de gestantes sem anticorpos neutralizantes.

No sul do Japão a incidência observada de mulheres sem anticorpos foi de 34% e segundo os relatos preliminares referidos por SEVER<sup>19</sup> (1967), a percentagem de mulheres sem título de anticorpos neutralizantes contra a rubéola nas Filipinas foi de 3%; na Nigéria Oriental, 21%; em Togo, 11%; na Tailândia, 13% e na Tchecoslováquia, 3%.

Estas marcadas diferenças entre a incidência de mulheres sem anticorpos neutralizantes nas diversas comunidades, mostram a necessidade de se determinar os níveis de anticorpos em cada local, ainda que a comparação destas freqüências relativas seja muito grosseira, desde que se carece de dados referentes aos grupos etários integrantes de algumas das amostras, assim como da côm das mulheres participantes destes estudos, o que parece ter influência sobre os níveis de anticorpos.

Consideramos que há um outro fator que pode estar influenciando esta grande variação dos resultados dos diversos pesquisadores que determinaram o nível de anticorpos contra rubéola e que é o referente ao estado sócio-econômico. Acreditamos que a nossa amostra seja muito homogênea neste aspecto, uma vez que tôdas as gestantes participantes deste estudo são pessoas que freqüentam hospitais beneficentes. Não existem maiores informações sobre êste particular nas observações dos diversos autores consignados neste trabalho.

A relação entre grupos etários e níveis de anticorpos contra a rubéola foi observada nos Estados Unidos por SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup> (1964), referindo que no grupo etário de 14 a 19 anos a freqüência de pacientes com anticorpos era de 74,8%; no de 20 a 25 anos, 79,4%; no de 26 a 30, 86,2% e no de 31 a 44 anos, 89,1%, assinalando que a freqüência de pacientes com níveis de anticorpos aumentava à medida que aumentavam as idades.

Posteriormente, outros pesquisadores estabeleceram os níveis de anticorpos para diversas populações e assim no Canadá, GIVAN, ROZEE & RHODES<sup>5</sup> (1965) observaram que na diluição 1:6, aos 14 anos, 60% apresentavam anticorpos, aos 19 anos, 70% e aos 24 anos, 80% e que nos grupos de acima de 24 anos esta proporção permanecia constante. Mas, ao fazer as mesmas determinações na diluição 1:24, observaram que os ní-

veis paralelos até os 19 anos, no grupo de 20 a 24 anos ia diminuindo até apresentar unicamente 20% de indivíduos com anticorpos neste nível no grupo de 35 a 40 anos.

SEVER et alii<sup>23</sup> (1965) em um estudo sorológico de 268 pessoas do Condado de Montgomery, Maryland, determinaram que a freqüência de anticorpos contra a rubéola aumentava de aproximadamente 35% no grupo de 1 a 10 anos até 85% em indivíduos de 16 a 25 anos, encontrando-se esta mesma percentagem também em grupos de mais idade.

OXFORD<sup>13</sup> (1966) ao determinar os níveis de anticorpos neutralizantes contra rubéola em indivíduos de Sheffield, na Inglaterra, encontrou no grupo de 1 a 4 anos, 21,4% de soros com anticorpos nas diluições de 1:8 e maiores; no grupo etário de 5 a 10 anos, 66,1% nas mesmas diluições; no grupo de 12 a 16 anos, 68,1%; de 16 a 25 anos, 76,5%; de 26 a 40 anos, 76,6% e de 60 a 86 anos, 49,2% de indivíduos com anticorpos neutralizantes. É de se fazer notar que a amostra estava integrada por mulheres grávidas nos grupos de 16 a 25 anos e de 26 a 40 anos.

Quando o mesmo autor considerou unicamente os indivíduos cujos soros apresentavam anticorpos nas diluições de 1:40 ou mais a variação percentual foi, para o grupo de 1 a 4 anos, 2,4%; de 5 a 10 anos, 42,8%; de 12 a 16, 21,6%; de 16 a 25, 35,3%; de 26 a 40, 17% e de 60 a 86 anos, 13,8% de indivíduos com anticorpos nessas diluições.

No presente trabalho, os resultados encontrados nas determinações de anticorpos nos soros das 778 gestantes, com uma idade média de 25,6 anos, permitem verificar que no grupo etário de 15 a 19 anos a freqüência de pacientes com anticorpos nas diluições de 1:4 ou mais era de 79,43%; no grupo de 20 a 24 anos, 75,69%; no de 25 a 29, 77,38%; de 30 a 34, 82,50%; de 35 a 39, 75,68% e de 40 a 44, 44,50%.

A comparação dos resultados obtidos em cada grupo etário da amostra examinada, nos permite verificar que os percentuais das idades compreendidas entre 15 a 39 anos são muito próximas, sendo que o grupo de 40 a 44 anos apresenta um percentual notadamente menor de pacientes com anticorpos. Esta discordância demonstrou-se estatisticamente significativa ao nível de 0,01 (GOLD<sup>6</sup>, 1962).

Entretanto, o pequeno número de indivíduos integrantes deste grupo etário de 40 a 44 anos, faz-nos sentir a necessidade de se ampliar os estudos sobre nível de anticorpos nestes grupos de mais idade, a fim de se confirmar ou não esta discordância e tentar determinar as causas que originam esta diminuição dos níveis de anticorpos neutralizantes.

Ao examinar cada um dos grupos etários em relação aos níveis de anticorpos, podemos observar que a maioria das gestantes de cada um destes grupos apresenta títulos de 1:4 e 1:8, o que concorda com os resultados encontrados por outros pesquisadores, oferecendo a possibilidade de ser a resposta imunitária não muito intensa à infecção provocada pelo vírus da rubéola ou da pouca sensibilidade dos métodos empregados na sua determinação.

Ao considerarmos a relação dos grupos etários com os níveis de anticorpos neutralizantes, pode ser verificado que no grupo de gestantes de São Paulo, com idades de 15 a 19 anos, a percentagem de indivíduos com anticorpos foi de 79,43%, enquanto que para um grupo de mulheres grávidas do território continental dos Estados Unidos, com idades de 14 a 19 anos, a mesma percentagem foi de 74,8% (SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup>, 1964).

Para o grupo de 20 a 24 anos, o nosso estudo obteve como resultados, 75,69% de indivíduos com nível de anticorpos e o dos Estados Unidos, para o grupo de 20 a 25 anos, encontrou 79,4%. A diferença é mais marcante ao se confron-

tarem os resultados obtidos em São Paulo para o grupo de 25 a 29 anos, que apresentou 77,3% de gestantes com anticorpos, uma vez que para um grupo semelhante de 26 a 30 anos, nos Estados Unidos foi observado um percentual de 86,2% de mulheres com anticorpos.

A diferença se acentua muito mais ao se compararem os resultados destes dois estudos para os grupos etários de 30 a 44 anos que, em São Paulo mostra 77,1% de indivíduos com anticorpos, enquanto que nos Estados Unidos o grupo de 31 a 44 anos apresentou 89,1% de gestantes com anticorpos.

Ao relacionar os resultados obtidos neste trabalho com os apresentados nas mulheres grávidas de Sheffield referidos por OXFORD<sup>13</sup> (1966), verificamos que no grupo de 15 a 24 anos, 77% apresentam anticorpos na nossa amostra, enquanto que no grupo de 16 a 25 anos do estudo realizado na Inglaterra, 76,5% mostraram níveis de anticorpos. No grupo de 25 a 39 anos, as gestantes de São Paulo apresentaram 78,7% de indivíduos com anticorpos neutralizantes e as da Inglaterra, do grupo de 26 a 40 anos, 76,6%.

É de se fazer notar que os grupos etários, embora muito próximos, não foram exatamente iguais.

SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup> (1964) analisaram a frequência de anticorpos em mulheres grávidas com relação a cor nos Estados Unidos. Das 600 mulheres grávidas por eles examinadas, "241 eram de cor branca, 292 de cor preta e 67 porto-riquenhas". A idade média de cada um destes três grupos foi de 25,9 anos, 25,3 anos e 25,6 anos, respectivamente. Assinalaram que das gestantes brancas, 86,3% apresentavam anticorpos; das mulheres grávidas de cor preta, 79,4% mostravam nos seus soros títulos de anticorpos e nas porto-riquenhas, 82% possuíam nível de anticorpos. Esta diferença foi estatisticamente significativa ao nível de  $\leq 0,05$  para os anticorpos neutralizantes contra rubéola apresenta-

dos nas populações de gestantes de cor branca e gestantes de cor preta. Eles assinalaram igualmente que os fatores responsáveis por essa mais alta frequência de indivíduos sem anticorpos neutralizantes ao serem comparados com as gestantes de cor branca, não puderam ser esclarecidos.

Na amostra por nós estudada, das 350 gestantes de cor branca, com uma idade média de 25 anos, 79,14% apresentaram anticorpos; das 90 pacientes de cor preta, com idade média de 26,1 anos, 75,56% possuíam anticorpos; das 317 mulheres grávidas de cor parda, com idade média de 26,1 anos, 75,71% mostravam níveis de anticorpos e das 21 gestantes de cor amarela, com idade média de 29,1 anos, 71,43% possuíam níveis de anticorpos.

Estas frequências relativas ao serem submetidas ao tratamento estatístico mostraram-se não significativas ao nível de 0,01. Isto discorda dos resultados de SEVER, SCHIFF & HUEBNER<sup>21</sup> (1964), que encontraram diferenças significativas entre as gestantes de cor branca e as de cor preta. Em todo caso, não se pode deixar de observar que as pacientes de cor amarela foram as que apresentaram a menor frequência relativa, embora a amostra fôsse de número muito pequeno, e as mulheres grávidas de cor preta e parda apresentaram percentuais quase totalmente idênticos, diferindo da frequência relativa observada nas gestantes brancas.

Esta diferença por nós encontrada pode ser atribuída ao fato de não serem estes quatro grupos homogêneos em relação à idade, uma vez que constatamos que as gestantes de cor amarela apresentaram idade média mais alta que os outros grupos, conforme pode ser verificado na Tabela 4. Ao mesmo tempo, as gestantes de cor branca foram as que mostraram a menor idade média.

Por outro lado, parece ser necessária a determinação das respostas imunitárias em cada comunidade para se verifi-

car se este fato, de diferente suscetibilidade à ação do vírus da rubéola, guarda relação com a cor; ou se depende de algum fator ainda não estabelecido, uma vez que todos os estudos anteriormente relatados ao abordar este problema mostraram resultados discordantes.

Um fato que desperta a atenção é o encontrado na Tabela 4 ao examinar o grupo integrado pelas gestantes de cor amarela. Verifica-se que no nível de 1:4, estão 9,52% das gestantes deste grupo; no nível de 1:8, 23,81%; no de 1:16, 23,81%; no de 1:32, 9,52% e no de 1:128, 4,77%. Embora este grupo fosse muito pequeno, não permitindo, portanto, chegar a afirmações conclusivas, parece que a presença de poucos indivíduos com níveis altos de anticorpos neutralizantes, indicaria diferença de suscetibilidade em relação ao vírus ou eliminação mais acelerada dos anticorpos protetores, nas gestantes desta cor.

#### CONCLUSÕES

As observações apresentadas anteriormente permitem indicar algumas conclusões no que se refere ao estado imunitário contra a rubéola na população estudada, assim como sobre os métodos utilizados na sua determinação.

1. Em inquéritos epidemiológicos de larga escala, a prova de soro-neutralização apresenta inconvenientes de ordem prática pelo que se faz necessário estudar mais amplamente a correlação dos resultados desta técnica com aqueles fornecidos por outras, entre as quais se destaca, sem dúvida, a reação de inibição da hemaglutinação.

2. A amostra estudada no presente trabalho, representativa da população que frequenta a Casa Maternal Leonor Mendes de Barros, apresenta características de homogeneidade no que se refere ao aspecto sócio-econômico.

3. No grupo estudado, a presença de 22,88% de gestantes desprovidas de anticorpos neutralizantes em nível considerado protetor, permitiria indicar que em toda a população de nível sócio-econômico semelhante, residente no município de São Paulo, deverá existir número de indivíduos suscetíveis à doença suficiente para que exista a probabilidade de se apresentar elevado número de casos nos próximos anos.

4. Nos cinco grupos etários compreendidos entre 15 a 39 anos foram reveladas freqüências aproximadamente iguais de mulheres grávidas sem anticorpos, elevando-se notadamente no grupo etário de 40 a 44 anos. Isto faz com que recomendemos um estudo mais aprofundado dos níveis de anticorpos nos grupos etários acima de 40 anos.

5. As gestantes de cor branca pareceriam ser mais suscetíveis à infecção pelo vírus da rubéola, verificando-se que a menor prevalência estaria no grupo de mulheres grávidas de cor amarela. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas, ainda que estudos apresentados por outros autores tenham revelado valores significativos no que se refere a suscetibilidade à rubéola em relação à cor.

6. É preciso realizar determinações dos níveis de anticorpos contra a rubéola em amostras representativas de todas as idades dos habitantes do município de São Paulo, para se conhecer a realidade sobre a incidência da infecção nesta localidade, assim como determinar a necessidade ou não de vacinação nos grupos expostos ao maior risco pelas infecções à rubéola, isto é, as gestantes quando no primeiro trimestre da gravidez.

#### SUMMARY

Levels of neutralizing antibodies against rubella were determined on 778 pregnant

women attending the Outpatient Department of the "Casa Maternal Leonor Mendes de Barros". Of the 778 women, 600 had titers of 4 and over (dilution 1:4). The total group presented an average age of 25.6 years. For the 15 to 19 years group, 79.43% of the patients had titers of 4 and over; in the remaining groups the corresponding percentages were: 20 to 24 years, 75.69%; 25 to 29 years, 77.38%; 30 to 34 years, 82,50%; 35 to 39 years, 74.58% and 40 to 44 years, 50.00%. Comparison of these results shows that percentages of positivity at ages between 15 and 39 years are very similar but those of group 40 to 44 years are markedly lower. The difference is statistically significant at the level of 0.01. Regarding the color, 79.14% of the 350 white females, 75.56% of the 90 negro females, 75.71% of the 317 halfbreeds and 71.43% of the 21 yellow females (japanese) showed antibodies at the above mentioned level. For epidemiologic surveys, on large scale, the neutralization test presents certain practical disadvantages, which renders ample study of correlation of the results of this test with those of other tests (among which haemagglutination inhibition test stands out) necessary.

#### AGRADECIMENTOS

Queremos vir a público agradecer ao Prof. Dacio de Almeida Christovão, Professor da Cátedra de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP; ao Professor Domingos Delascio, da Casa Maternal Leonor Mendes de Barros; ao Professor J. A. Dudgeon, do "The Hospital for the Sick Children" de Londres e ao Departamento de Estatística Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, através da Dra. Maria Lucila Milanese, Dra. Eunice Pinho de Castro Silva e Dr. José Maria Pacheco de Souza.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, S. G. — Experimental rubella in human volunteers. *J. Immunol.*, 62(1):29-40, May, 1949.
2. BRODY, J. A. — The infectiousness of rubella and the possibility of reinfection. *Amer. J. publ. Hlth*, 56(7):1082-1087, July, 1966.
3. CHANG, R. S. & GEYER, R. P. — A serum albumin medium for the cultivation of human epithelial like cells. *J. Immunol.*, 79(6):455-461, Dec. 1957.
4. DUDGEON, J. A.; BUTLER, N. R. & PLOTKIN, S. A. — Further serological studies on the rubella syndrome. *Brit. med. J.*, 2(5402):155-160, July, 1964.
5. GIVAN, K. F.; ROZEE, R. K. & RHODES, A. J. — Incidence of rubella antibodies in females subjects. *Canad. med. Ass. J.*, 92(3):126-128, Jan. 1965.
6. GOLD, R. Z. — On comparing multinomial probabilities. Brooks (Tex.) School of Aerospace Medicine, 1962.
7. GREEN, R. H. et alii — Studies of the natural history and prevention of rubella. *Amer. J. Dis. Child.*, 110(4):348-365, Oct. 1965.
8. HUTCHINSON, D. N. & THOMPSON, K. M. — Continuous rabbit kidney cell cultures in the diagnosis of rubella infections. *Mth. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv.*, 24:385-391, Dec. 1965.
9. KRUGMAN, S. & WARD, R. — Rubella: demonstration of neutralizing antibody in gamma globulin and re-evaluation of the rubella problem. *New Engl. J. Med.*, 259:16-19, July, 1958.
10. KRUGMAN, S. et alii — Studies on rubella immunization. I. Demonstration of rubella without rash. *J. Amer. med. Assoc.*, 151(4):285-288, Jan. 1953.
11. LEERHOY, J. — The influence of different media on cell morphology and rubella virus titer in a rabbit cornea cell line (SIRC). *Archiv. ges. Virusforschung*, 19:210-214, 1966.
12. McCARTHY, K.; TAYLOR-ROBINSON, C. H. & PILLINGER, S. E. — Isolation of rubella virus from cases in Britain. *Lancet*, 2(7308):593-601, Sept. 1963.

COTILLO Z., L. G. — Anticorpos neutralizantes contra rubéola num grupo de gestantes de São Paulo. *Rev. Saúde públ.*, 2(1):29-43, jun. 1968.

13. OXFORD, J. — Rubella virus-1966. *Publ. Hlth*, 80(6):271-276, Sept. 1966.
14. PARKMAN, P. D.; BUESCHER, E. L. & ARTENSTEIN, M. S. — Recovery of rubella virus from army recruit. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y., 111(1):225-230, Oct. 1962.
15. ——— et alii — Studies of rubella. II. Neutralization of the virus. *J. Immunol.*, 93(4):608-617, Oct. 1964.
16. PLOTKIN, S. A.; CORNFELD, D. & INGALLS, T. H. — Studies on immunization with living rubella virus. *Amer. J. Dis. Child.*, 110(4):381-389, Oct. 1965.
17. SCHIFF, G. M.; SEVER, J. L & HUEBNER, R. J. — Rubella virus: neutralizing antibody in comercial gamma globulin. *Science*, 142(3588):58-60, Oct. 1963.
18. ——— et alii — Rubella: studies on the natural disease: the significance of antibody status and communicability among young women. *Amer. J. Dis. Child.*, 110(4):366-369, Oct. 1965.
19. SEVER, J. L. — Epidemiology of rubella. In: International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man, 1st, Washington, D.C., 1966. Washington, D.C., P.A.H.O., 1967. p 366-370 (Scientific publication, 147).
20. ———; NELSON, K. B. & GILKENS, M. R. — Rubella epidemic, 1964: effect on 6,000 pregnancies. I. Preliminary clinical and laboratory findings through the neo-natal period: a report from the collaborative study on cerebral palsy. *Amer. J. Dis. Child.*, 110(4):395-407, Oct. 1965.
21. ———; SCHIFF, G. M. & HUEBNER, R. J. — Frequency of rubella antibody among pregnant women and other human and animal populations. *Obstet. and Gynec.*, 23(2):153-159, Feb. 1964.
22. ———; SCHIFF, G. M. & TRAUB, R. G. — Rubella virus. *J. Amer. med. Assoc.*, 182(6):663-671, Nov. 1962.
23. ——— et alii — Antibody responses in acute and chronic rubella. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y., 122(2):513-516, June, 1966.
24. SIGURDARDOTTIR, B. et alii — Association of virus with cases of rubella studied in Toronto: propagation of the agent and transmission to monkeys. *Canad. Med. Ass. J.*, 88(3):128-132, Jan. 1963.
25. STEWART, G. L. et alii — Rubella virus hemagglutination inhibition test. *New Engl. J. Med.*, 276(10):554-557, Mar. 1967.
26. VERONELLI, J. A.; MAASSAB, H. F. & HENNESSY, A. V. — Isolation in tissue culture of an interfering agent from patients with rubella. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y., 111(2):472-476, Nov. 1962
27. WELLER, T. H. & NEVA, F. A. — Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella like illness. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N.Y., 111(1):215-225, Oct. 1962.
28. ——— & NEVA, F. A. — Rubella virus. In HORSFALL, F. L. & TAMM, I. — Viral and rickettsial infections of man. 4th ed. Philadelphia, Lippincott, 1965. p. 802-809.