

Laboratorio clinico

Os Arquivos Rio Grandenses de Medicina têm a maior satisfação em apresentar a sua nova secção "Laboratório Clínico", que virá preencher uma lacuna existente em sua orientação.

Cada vez se torna maior, mais íntima a ligação entre a Clínica e o Laboratório. A verdadeira, a científica orientação clínica não pode prescindir do auxílio do Laboratório, que lhe fornece o conhecimento perfeito do intercâmbio das diversas funções e permite a visão nítida dos agentes causadores das infecções.

Na secção que agora iniciamos procuraremos dar uma divulgação ampla de tôdas as conquistas que o Laboratório fôr realizando, procurando sempre aliar á técnica a interpretação e o valor dos diferentes fatos na etiologia, no diagnóstico e no prognóstico.

Contaremos para isto com a colaboração eficiente e valiosa de todos aqueles que se dedicam aos estudos laboratoriais.

Que não sejam estéreis os nossos esforços e a nossa dedicação, são os mais ardentes votos que formulamos.

Trabalhos da 1.^a Clinica Medica

Sôro diagnóstico da febre tifóide*

por

Homero Jobim

Prof. de Microbiologia da Escola de Veterinaria na Universidade de P. Alegre
Assistente do Laboratorio Geyer

Quando, em 1896, Widal applicou a sôro aglutinação no diagnóstico da febre tifóide, foram grandes as esperanças depositadas neste método, conhecido atualmente como reação de Widal.

Passado o entusiasmo dos primeiros instantes, muitos ficaram decepcionados com o processo.

As falsas reações que se observam, grandemente aumentadas com a vulgarização da vacinação antitífica, prejudicam muito a interpretação da análise.

E' sabido que as aglutininas do vacinado são em título muito inferior ás do infectado, e que desaparecem rapidamente. Entretanto, não menos conhecida é a maneira diversa com que reagem os indivíduos á infecção, uns dando inicialmente taxa alta de aglutininas, outros, muito mais raros, em que o título é baixo ou êstes anticorpos estão ausentes até o final da infecção.

* Conferência feita na 1.^a cadeira de Clínica Médica da Faculdade de Medicina. Prof. Thomaz Mariante.

E' também de conhecimento geral que certas entidades mórbidas podem fazer acordar aglutininas já completamente desaparecidas em vacinados ou em antigos infectados.

A falta de especificidade e a dificuldade de interpretação prejudicaram muito o valor diagnóstico da clássica reação de Widal.

Estudos imunológicos recentes vieram modificar muito a técnica e a interpretação do sôro diagnóstico da febre tifóide.

Êstes últimos quinze anos foram férteis em trabalhos, que culminaram com o conhecimento quasi perfeito da estrutura antigênica do bacilo de Eberth.

Por essa estrutura êste bacilo se aproxima muito das Salmonelas, tendo sido incluído neste último grupo pela comissão encarregada pela Sociedade Internacional de Microbiologia de fixar a nomenclatura destes germes.

Antígeno H e antígeno O

Desde os primórdios da bacteriologia que se atribuia aos cílios papel importante nos fenômenos de aglutinação.

Smith, Reagh e Beyer, em 1903, mostraram, estudando os paratíficos, que se deve distinguir um antígeno flagelar, termolábil, e um somático, termoe estável.

Foi com Weil e Felix, em 1917, que estas observações tiveram confirmação e ficou reconhecida a sua importância.

Estudando o proteus X19, êstes autores observaram que certas modificações surgidas nas culturas vinham acompanhadas de variações sôrológicas. Uma dessas alterações, a forma H (de Hauch) desenvolve estendendo-se como uma membrana na superfície da gelose, é constituída de germes móveis, ciliados. A outra, a forma O (de Ohne hauch) se apresenta nas culturas em colônias chatas, circulares, isoladas, é formada de bactérias imóveis, não ciliadas.

A forma H é destruída pelo álcool absoluto ou um ácido diluído, pelo aquecimento a 100°, e dá com o antissôro correspondente uma aglutinação em grandes flocos, mas pouco densos e que se desfazem com a menor agitação.

A forma O resiste ao álcool absoluto e aos ácidos, ao aquecimento a 100°, e dá com o antissôro correspondente uma aglutinação finamente granular que se deposita em grumos compactos e de difícil desintegração.

Os germes do tipo H, tratados pelo álcool absoluto ou pelos ácidos diluídos, aquecidos a 100° ou cultivados em gelose fenol, não aglutinam mais em grandes flocos, mas em finas granulações como os do tipo O.

Fácilmente se explica esta transformação sabendo-se que o tipo H encerra os dois antígenos H e O, ao passo que o tipo O contém exclusivamente antígeno O.

O antígeno H é contido nos cílios das bactérias, é o antígeno ciliar. O antígeno O está incorporado á própria bactéria, é o antígeno somático.

Ao antígeno H, termolábil, corresponde a aglutinina H, termoe estável, e ao antígeno O, termoe estável, a aglutinina O, termolábil.

Mais tarde Weil e Felix estenderam estas noções ao bacilo tífico e às Salmonelas.

As amostras do tipo O podem ser encontradas, mas excepcionalmente, nos produtos patológicos. São obtidas facilmente pela seleção de colônias imóveis em gelose fenol de Braun. O tipo O absolutamente puro é de difícil seleção, encontrando-se quasi sempre traços de antígeno H.

As do tipo H são facilmente encontradas nos produtos patológicos. Parece não existir um tipo H isento de antígeno O.

A constituição química do antígeno H é pouco conhecida.

O antígeno O é constituído dos polissacarídios microbianos. Segundo Boivin e Mesrobeaunu, é formado pela união desses polissacarídios a ácidos graxos, constituindo um complexo lípido-glucídico, e mais uma parte protéica, o antígeno somático protéico.

O antígeno H está sujeito a variações de fase que se observa com frequência nas culturas. É chamado monofásico quando é sempre sorologicamente igual. É difásico, quando os caracteres de aglutinação variam de uma colônia a outra, umas específicas, outras não específicas.

Colônias rough e smooth

A ignorância dos fenômenos de dissociação microbiana atrasou muito o estudo da imunidade.

Arkwright mostrou em 1920 a importância morfológica e biológica da variação de colônias em gelose. Uma se apresentam lisas, translúcidas, de contornos regulares, desenvolvem com turvação geral do caldo e dão em soluções salinas suspensões perfeitamente estáveis; chamadas por Arkwright "Smooth", ou mais simplesmente S. Outras se mostram rugosas, chatas, de contornos denteados, desenvolvem com grande depósito no caldo e dão em soluções salinas suspensões instáveis e autoaglutináveis; chamadas "Rough", ou mais simplesmente R.

Serologicamente as formas R e S são perfeitamente distintas. A forma R não é aglutinada pelo soro anti S e a recíproca é verdadeira.

Schütze descreveu um antígeno das fontes R, a que chamou cosmopolita. Este antígeno provoca nos animais a formação de uma aglutinina que reage com todas as Salmonelas em fase R.

A diferenciação estrutural das formas S e R se faz exclusivamente no antígeno somático O, que chega a desaparecer nas formas R, sendo substituído pelo antígeno cosmopolita.

As formas R puras são destituídas de especificidade pela ausência do antígeno O e grande predominância do antígeno cosmopolita. Estas formas são quasi destituídas de virulência, e, segundo Boivin e Mesrobeaunu, com toxidade diminuída ou nula pela fraca quantidade ou ausência de seu antígeno somático completo.

Entre as formas R e S puras existe toda a sorte de intermediários, daí a delicadeza em fazer a distinção em certas colônias.

Antígeno Vi

Grinnell, comparando o valor dos tipos R e S na vacinação antitífica

ca pelo estudo do poder bactericida do sôro sanguíneo, viu que o tipo R não aumenta ou aumenta pouco êste poder bacteriolítico, ao passo que o tipo S o aumenta consideravelmente.

Retomando posteriormente estas pesquisas e servindo desta vez como test o camondongo, confirma êstes fatos e mostra que a vacinação com uma amostra virulenta dá uma proteção mais eficaz que a produzida por uma não virulenta.

Perry, Findeley e Bensted confirmam as pesquisas e mostram que uma variedade R, desde que se torne, por passagens sucessivas, virulenta para o camondongo, confere a êste animal uma imunidade muito mais sólida que uma amostra S, não virulenta.

Felix e seus colaboradores, baseados nestes trabalhos, descreveram no corpo microbiano um antígeno novo, responsável pela virulência do germe, o antígeno Vi.

Êste antígeno é completamente diverso dos antígenos H e O, como facilmente se demonstra pela prova de saturação de aglutininas.

O antígeno Vi tem, segundo Felix, grande importância na imunidade passiva, ao passo que o antígeno O está em primeiro plano na imunidade ativa.

As condições de cultura têm grande influência sôbre o desenvolvimento dêste antígeno. A 20° e a 44° o antígeno desaparece, bastando entretanto uma passagem a 37° para que reapareça.

O antígeno Vi é termolábil e não desenvolve em gelose fenol de Braun.

A aplicação dessas noções na prática do sôrodiagnóstico da febre tifóide veio melhorar e consolidar a interpretação da reação.

Existindo na célula microbiana dois tipos distintos e importantes de antígenos, a aglutinação deve ser feita separadamente para cada um dêles.

Descreveremos alguns detalhes da técnica.

Preparo dos antígenos

A seleção das raças é de absoluta importância para fidelidade da reação. Como dissemos acima, é difícil conseguir forma O completamente pura.

As raças H e O que estamos usando são provenientes diretamente de Felix e nos foram cedidas pelo nosso mestre Prof. Arlindo de Assis. Trazem as seguintes referências:

Eberthella typhi — Eberth Gaffky — n.º 3111 da National Collection of type Cultures (Instituto Lister de Londres) e correspondente à amostra H — 901 do Prof. Felix.

Eberthella typhi — n.º 3112 da mesma coleção e correspondente à amostra O — 901 de Felix.

Salmonella paratyphi — Kaiser-Brion n.º 3175 da mesma coleção e correspondente à amostra HA1 de Felix.

Salmonella paratyphi — n.º 3174 da mesma coleção e correspondente á amostra OA6 de Felix.

Salmonella schöttmülleri Schottmulleri n.º 3176 da mesma coleção e correspondente á amostra HB de Felix.

Salmonella aertrycke de Nobele n.º 3173 da mesma coleção e correspondente á amostra OB de Felix.

Inicialmente é necessária a seleção em colônias S, pois como vimos acima as colônias R são fracas em especificidade.

Temos, como mostra o esquema de Grinnel, as seguintes formas de bacilo de Eberth e salmonelas:

S móvel HS — contendo antígeno H e O.

S imóvel OS — contendo exclusivamente antígeno O.

R móvel HR — contendo o antígeno H e o antígeno cosmopolita.

R imóvel OR — contendo só o antígeno cosmopolita.

Só as duas primeiras servem para a soroaglutinação.

Uma vez selecionadas as formas HS e OS faz-se a semeadura em gelose simples, deixando na estufa a 37º, 24 horas. Verificada a pureza, emulsiona-se a cultura em sôro fisiológico e conserva-se sob uma camada espessa de toluol.

As suspensões devem ser perfeitamente estáveis e sem tendência á autoaglutinação, característico essencial das formas "smooth".

Técnica da titulação das aglutininas

Não entraremos em detalhes da técnica, que é do conhecimento geral.

Usamos como título inicial 1/40 e terminamos em 1/320 que satisfaz perfeitamente á rotina.

A incubação pode ser feita a 37º, 24 horas, ou em banho-maria a 47º, uma hora. Preferimos o primeiro processo por ser mais cômodo, embora menos rápido.

Leitura

De grande importância é a distinção dos dois tipos de aglutinação já salientados quando tratámos dos antígenos H e O.

O antígeno H aglutina em grandes flocos, mas pouco densos e que se desfazem com facilidade.

O antígeno O dá uma aglutinação em pequenos flocos, mas bastante compactos e que se desfazem com dificuldade.

A observação cuidadosa distingue facilmente êstes dois tipos de aglutinação.

Interpretação dos resultados

A pesquisa das aglutininas praticada no sôro de milhares de casos de febre tifóide, por numerosos autores, permitiu que fôsse estabelecidas algumas preliminares que facilitam a interpretação precisa dos resultados da soroaglutinação.

Felix afirma que o sôro normal não contém aglutininas H, ao passo que ás vezes encerra aglutininas O até na diluição de 1/100.

A vacinação antitífica gera quasi exclusivamente anticorpos ciliares H, que desaparecem rapidamente, podendo entretanto reaparecer sob a ação de estímulos não específicos. Em certos casos de vacinação muito recente se encontram aglutininas O, mas sempre em título muito baixo, inferior ao que requer para o diagnóstico.

A infecção tífica determina a formação de aglutininas ciliares e somáticas, sendo estas últimas as mais precoces e que mais rapidamente desaparecem no final da doença.

Diante de uma sôroaglutinação positiva poderemos nos encontrar, pois, com os seguintes casos:

a) presença de aglutininas H e O em título superior a 1/100.

Permite firmar o diagnóstico de infecção.

b) aglutinação exclusiva com antígeno H faz pensar em indivíduo vacinado ou em antigo infectado.

c) aglutinina O exclusivamente presente faz pensar em febre tifóide no período inicial.

Em todos êstes casos o diagnóstico só é cientificamente seguro quando as titulagens são praticadas em série e permitem observar a subida do título de aglutinação. Entretanto, na prática, só diante dos dois últimos casos é que devemos recorrer á curva da aglutinação.

As observações que possuímos, em número superior a cincoenta, colhidas em infectados e vacinados, nos permitem até o presente confirmar as conclusões dos diferentes autores. Entretanto nos reservamos para julgar em definitivo, mais tarde, quando o número permitir conclusões precisas e rigorosas.