

PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA PARA A EVIDENCIAÇÃO DA TOXINA DO *C. DIPHTHERIAE* NA LESÃO DIFTÉRICA ⁽¹⁾

Dacio de Almeida CHRISTOVÃO
Luís G. COTILLO Z.
José Alberto Neves CANDEIAS

Foi demonstrada a presença da toxina do *C. diphtheriae*, através de prova de hemaglutinação passiva, usando-se hemácias sensibilizadas com antitoxina diftérica, na lesão da garganta de 47,7% dos casos suspeitos de difteria examinados no presente trabalho. De 53,0% dos mesmos pacientes pôde ser isolado bacilo diftérico toxígeno. A prova de hemaglutinação passiva foi a única positiva em 13,6% dos casos e a cultura, a única positiva em 13,9%. Em 42 crianças normais ou portadoras de faringite ou amígdalite sem nenhuma característica clínica de difteria, a prova de hemaglutinação passiva foi negativa. O processo descrito, de execução muito simples, pode acusar o resultado em menos de 2 horas e oferece grande possibilidade de aplicação vantajosa no diagnóstico da difteria.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico clínico da difteria muitas vezes é feito sob reserva, dadas as possibilidades conhecidas de outras infecções poderem apresentar lesões semelhantes. Outras vezes deixa de ser estabelecido pela ocorrência de casos atípicos. De qualquer forma, requer sempre a comprovação de laboratório, pelo menos do ponto de vista da Saúde Pública.

O diagnóstico bacteriológico desta infecção é realizado classicamente através do isolamento do *C. diphtheriae* a partir do material colhido da lesão. É processo demorado, podendo o seu resultado exigir até 6 dias, além de estar sujeito a falhas.

Através de reação de hemaglutinação passiva em que se utilizaram de hemácias às quais haviam adsorvido antitoxina diftérica, CHRISTOVÃO & COTILLO ³ (1966)

puderam evidenciar e dosar a toxina *C. diphtheriae* no sangue e na urina de doentes de difteria. Julgaram o processo simples, rápido, sensível e de utilidade no diagnóstico desta infecção.

A toxina diftérica também pode ser demonstrada na saliva de doentes de difteria (TASMAN et alii ⁵, 1954). Empregando-se o método da hemaglutinação passiva acima referido, dada a alta sensibilidade das reações desta natureza, deveria ser possível revelar-se a presença da toxina naquele substrato em frequência maior do que se utilizando de provas intradérmicas em coelho ou de reações de precipitação ou mesmo de difusão em gel. Pareceu, no entanto, aos autores da presente investigação que a pesquisa da toxina na própria lesão, através daquele processo,

Recebido para publicação em 8-11-1967.

- (1) Da Cadeira de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP. 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.

poderia ser alternativa de maior probabilidade de sucesso. Se positiva em elevada percentagem de casos, constituiria esta pesquisa outro processo de diagnóstico da difteria, ainda mais simples e mais rápido que a evidência da toxina no sangue dos doentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos suspeitos de difteria — Os resultados ora apresentados referem-se a doentes internados em 1965 e 1966 no Hospital Emílio Ribas, hospital de doenças infecciosas do Departamento de Saúde, na cidade de São Paulo. Tratava-se somente de pacientes com diagnóstico clínico inicial de difteria típica ou de suspeita de difteria. Para muitos, posteriormente, o diagnóstico clínico inicial foi modificado para o de amigdalite aguda não diftérica.

De todos, antes da aplicação de soro antidiftérico, foi colhido, pelas enfermeiras do hospital, material da lesão da garganta, pela técnica usual, através de chumaço de algodão enrolado na extremidade de fio de arame.

Grupos contrôles — Foram tomados como contrôles dois grupos de crianças. O primeiro era formado por 31 meninas, internadas em instituição infantil, todas com garganta normal ao exame clínico. O segundo era de 11 crianças de ambos os sexos que procuraram assistência médica no Centro de Saúde da Faculdade de Higiene e Saúde Pública devido a “dôr de garganta” e que foram diagnosticadas clinicamente como portadoras de amigdalite ou de amigdalite e faringite de etiologia não diftérica.

Destas 42 crianças também se colheu material de garganta pela mesma técnica usada para os doentes clinicamente suspeitos de difteria.

Preparo do material — Recebidas as zaragatoas, cada uma delas era colocada em tubo onde o chumaço de algodão ficava mergulhado em 2,5 ml de solução sa-

lina tamponada fosfatada, de pH 7,2. Os tubos eram submetidos a agitação violenta e deixados em repouso durante 3-5 minutos. Em seguida os chumaços eram novamente agitados, ainda dentro da salina tamponada, e retirados, tendo-se o cuidado de espremê-los, fortemente, de encontro às paredes de tubo. A suspensão assim obtida era centrifugada a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos e o sobrenadante, constituindo o extrato onde se pesquisaria a presença de toxina diftérica, era transferido, através de pipeta, a outro tubo.

O sedimento destinava-se ao exame bacteriológico de pesquisa do *C. diphtheriae*.

Exame bacteriológico — A pesquisa da presença do bacilo diftérico foi feita da maneira usual, através da inoculação inicial do sedimento em tubo de meio de Pai e em placa de agar-telurito. Após a incubação de cerca de 24 horas, as culturas eram examinadas. Das culturas em meio de Pai, verificada a presença de bacilos morfológicamente semelhantes ao bacilo diftérico, passava-se material a placa do meio de isolamento.

Quer das placas primárias ou das secundárias, após 24, 48 ou 72 horas de incubação, colônias com características das de *C. diphtheriae* eram pescadas e transferidas a novos tubos de meio de Pai, de onde, após a devida incubação, as culturas isoladas eram repicadas a tubos de fermentação de glicose, sacarose, dextrina e glicerina (CHRISTOVÃO^{1,2}, 1957).

Todas as cepas morfológicamente semelhantes a bacilo diftérico foram submetidas a pesquisa de toxigenicidade, através das provas “in vivo” e “in vitro”, da inoculação intradérmica em coelho e da difusão em gel. (FROBISHER et alii⁴ 1963).

Pesquisa da toxina diftérica — Nos extratos, obtidos a partir dos chumaços de algodão, foi pesquisada a presença da toxina diftérica através da prova de hemaglutinação passiva empregando-se exatamente a técnica descrita anteriormente

(CHRISTOVÃO & COTILLO³, 1966). Para cada extrato, a prova foi realizada na concentração original e nas diluições, de fator 2, até 1/512. Sòmente foram considerados positivos os extratos que apresentaram aglutinação pelo menos na diluição 1/2.

RESULTADOS

Grupos contròles — Os resultados da pesquisa de toxina diftérica, pela prova de hemaglutinação passiva, no material de garganta das 42 crianças dos grupos contròles foram todos negativos, quer para as 31 meninas com garganta normal, quer para as 11 crianças portadoras de amigdalite ou de amigdalite e faringite. Para 6 destas, a cultura bacteriológica revelou a presença de estreptococcus hemolíticos e de 5, isolou-se *Staphylococcus aureus*. No grupo das 31 meninas com garganta normal a cultura bacteriológica foi negativa para bactérias patogênicas, exceto de 1 caso do qual foi isolado *C. diphtheriae*.

Casos suspeitos de difteria — Na Tabela encontram-se os resultados referentes a 148 pacientes internados na Enfermaria de Difteria do Hospital Emílio Ribas por suspeita inicial de difteria, dos quais 132 com diagnóstico clínico final de difteria e 16, de amigdalite aguda não diftérica.

a) *Casos clínicos de difteria* — Dos 132 casos clínicos de difteria, 63 (47,7%) foram positivos pela prova de hemaglutinação passiva e de 70 (53,0%) isolou-se *C. diphtheriae* toxígeno.

Tomando-se os casos positivos revelados por ambas as técnicas ou apenas por uma delas, encontram-se 88 (67,7%). Dêstes, a prova de hemaglutinação passiva evidenciou 71,6% e a cultura, 79,5%.

Ambos os processos acusam resultado igual em 45 casos positivos (34,1%) e em 44 negativos (33,3%). Mostraram-se concordantes, portanto, em 89 casos (67,4%). Considerando-se apenas os 88 casos positivos por ambos ou sòmente por

um dos métodos, os resultados foram concordantes em 45 (59,8%).

É de se notar que embora o processo clássico de isolamento do *C. diphtheriae* tenha sido positivo em 25 casos (18,9%) negativos pela prova de hemaglutinação passiva, esta, por sua vez, revelou 18 casos positivos (13,6%) para os quais a cultura foi negativa. Levando-se em consideração apenas os 88 casos positivos por ambas ou sòmente por uma das técnicas, a hemaglutinação passiva, ainda que negativa em 28,4%, foi a única a evidenciar a considerável proporção de 20,5%.

Os 63 casos positivos pela hemaglutinação passiva revelaram títulos que variaram de 2 a 256 e cuja distribuição foi a seguinte: 23 casos (36,5%) com título 2, 16 (25,4%) com título 4, 8 (12,7%) com título 8, 8 (12,7%) com título 16, 2 (3,2%) com título 32, 2 (3,2%) com título 64, 1 (1,6%) com título 128 e 3 (4,8%) com título 256. Os 3 casos com êste título foram todos negativos pela cultura.

b) *Casos clínicos de amigdalite aguda não diftérica* — Dos 16 casos clínicos de amigdalite aguda, 4 (25,0%) foram positivos pela hemaglutinação passiva e 2 (12,5%), pela cultura.

Considerando-se os casos positivos evidenciados sòmente por uma ou pela outra técnica ou por ambas, encontram-se 5 (31,3%). Ambos os processos revelaram resultado positivo em 2 casos (12,5%) e resultado negativo em 11 (68,8%), sendo a taxa de concordância de 81,3%.

A cultura evidenciou 1 caso positivo não revelado pela hemaglutinação passiva e esta prova foi positiva em 2 casos negativos pela cultura.

Dos 4 casos positivos pela hemaglutinação passiva, um o foi com título 2, um com 4, um com 8 e um com 16.

Total de casos — Considerando-se todos os 148 casos estudados, encontraram-se 67 (45,3%) positivos pela hemaglutinação passiva e 72 (48,6%) positivos pela cultura.

TABELA

Casos positivos pela evidênciação da toxina diftérica, por reação de hemaglutinação passiva, no material colhido da lesão na garganta e pelo isolamento do *C. diphtheriae* toxígeno do mesmo material, de pacientes com diferentes diagnósticos clínicos internados na Enfermaria de Difteria do Hospital Emílio Ribas — São Paulo, 1965-1966.

Diagnóstico clínico	Número de casos examinados	Casos positivos											
		Pela hemaglutinação passiva		Pela cultura		Por ambas ou apenas por uma das técnicas		Por ambas as técnicas		Apenas pela hemaglutinação passiva		Apenas pela cultura	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Difteria	132	63	47,7	70	53,0	88	66,7	45	34,1	18	13,6	25	18,9
Amigdalite aguda	16	4	25,0	2	12,5	5	31,3	2	12,5	2	12,5	1	6,3
Total	148	67	45,3	72	48,6	93	62,8	47	31,8	20	13,5	26	17,6

Dos 93 (62,8%) casos positivos por ambas as técnicas ou somente por uma delas, os positivos pela hemaglutinação passiva representam 72,0% e os evidenciados pela cultura, 77,4%.

Ambos os processos concordaram em 47 casos positivos (31,8%) e em 55 negativos (37,2%), verificando-se uma taxa de concordância de 68,9%. Se forem tomados apenas os 92 casos positivos por ambas ou apenas por uma das técnicas, a taxa de concordância baixa para 50,5%.

No total, o método da cultura foi o único a acusar resultado positivo em 26 casos (17,6%) e a prova de hemaglutinação passiva foi a única positiva em 20 casos (13,5%). Tomando-se apenas os 93 casos positivos por ambos ou somente por um dos métodos, a hemaglutinação passiva, negativa embora em 28,0%, revelou 21,5% de casos não comprovados pelo isolamento do *C. diphtheriae* toxigêno.

Do total de 67 casos positivos pela prova de hemaglutinação passiva, 24 (35,8%) o foram unicamente no título 2 e 43 (64,2%) apresentaram títulos de 4 a 256.

Além destes 148 pacientes, foram estudados mais 5 casos com diagnóstico clínico de difteria para os quais a prova de hemaglutinação passiva foi negativa e a cultura revelou a presença de *C. diphtheriae* atoxigêno e mais 2 casos com diagnóstico clínico de monilíase dos quais um foi positivo por ambas as técnicas, sendo de 128 o seu título de hemaglutinação passiva.

DISCUSSÃO

Através da prova de hemaglutinação passiva descrita por CHRISTOVÃO & COTILLO³ (1966) e na qual se utilizam hemácias às quais foi adsorvida antitoxina diftérica, foi possível evidenciar-se a presença da toxina do *C. diphtheriae* na lesão da garganta de 47,7% dos casos suspeitos de difteria examinados nesta investigação. O processo clássico da cultura para isolamento do bacilo diftérico, toma-

do como base de julgamento da eficiência da nova técnica, foi capaz de comprovar porcentagem (53,0%) algo superior. Tanto um como o outro método, se pudessem ser considerados como de difteria todos os casos clinicamente diagnosticados como tal, teriam sido capazes de revelar apenas cerca da metade.

São conhecidas, entretanto, a dificuldade que se apresenta muitas vezes no estabelecimento do diagnóstico clínico desta infecção e a possibilidade de engano daí decorrente. Considerando-se como realmente de difteria apenas os casos evidenciados pelo menos por uma das técnicas utilizadas, poder-se-ia concluir que a prova de hemaglutinação passiva teria revelado 71,6% e a tentativa de isolamento, 79,5%. Ainda assim, a eficiência do processo clássico teria sido 11,0% maior.

No entanto, tendo ocorrido substancial discordância entre os resultados de ambos os métodos e havendo a prova de hemaglutinação passiva sido a única positiva em 13,6% dos casos clinicamente diagnosticados como de difteria ou em 20,5% dos casos positivos através de pelo menos uma das técnicas experimentadas, pareceria justificado o emprêgo de ambos os processos.

Em locais como São Paulo (CHRISTOVÃO¹, 1957) onde a incidência de cepas de *C. diphtheriae* fermentadoras de sacarose é extraordinariamente elevada, o isolamento e identificação do bacilo diftérico é processo longo que pode demorar até 6 e mesmo 7 dias, dada a indispensabilidade da realização de provas de toxigenicidade sempre que a cepa isolada, ao lado de características do *C. diphtheriae*, apresenta a propriedade de atacar aquele açúcar. Pelo menos nestas circunstâncias, se não sempre, a pesquisa da toxina diftérica, além daquela do *C. diphtheriae*, representaria sobrecarga de trabalho muito pequena. E uma vez que o resultado da pesquisa da toxina na lesão, pelo método experimentado, pode ser conhecido em menos de 2 horas após a colheita do material, a vantagem do processo pareceria indubitável.

A rapidez do método, além disso, sempre que o caso fôsse precoce e benigno, permitiria ao clínico aguardar o seu resultado. Sempre que positivo, forneceria justificação ampla para a aplicação de antitoxina.

Seria necessário, entretanto, poder ter-se a certeza de que a prova de hemaglutinação passiva ora investigada é específica. O próprio fato dêste processo ter acusado resultados positivos em porcentagem considerável de casos não revelados pelo método clássico da cultura, anteriormente apontado como vantajoso, poderia servir de base para suspeitar-se da sua especificidade porquanto, na realidade, não se disporia, no momento, de razões para justificar tal proporção de falhas do isolamento do bacilo diftérico.

A priori, esta prova não deveria ser inespecífica, a menos que na gamaglobulina antidiftérica utilizada na reação, altamente purificada e concentrada, obtida a partir dos soros de cavalos hiperimunizados com toxóide e toxina diftéricos, pudessem existir outros anticorpos em quantidade suficiente para reagir com antígenos eventualmente presentes no material examinado. Assim, por exemplo, poder-se-ia lembrar a possibilidade dos cavalos imunizados apresentarem anticorpos contra estafilococos ou contra estreptococos, bactérias tão freqüentemente encontradas na orofaringe humana.

Entretanto, os resultados todos negativos encontrados nas 42 crianças com amigdalite ou amigdalite e faringite ocasionadas pelos germes acima referidos, sugeririam a especificidade do método.

Somente estudos posteriores englobando número bem maior de casos poderiam fornecer elementos suficientes para o julgamento da verdadeira eficiência da técnica ora investigada. A propósito, em trabalho anterior (CHRISTOVÃO & COTILLO², 1966), já foi delineada investigação mais completa sôbre a questão. Tal in-

vestigação terá de se basear no estudo de casos clínicos mais rigorosamente selecionados e com antecedentes terapêuticos perfeitamente conhecidos, o que nem sempre foi conseguido nos casos ora estudados. Estes cuidados são necessários a fim de se poder afastar completamente a possibilidade da medicação por antibióticos ou pela própria antitoxina diftérica, anterior à colheita do material, interferir nos resultados do isolamento do bacilo diftérico ou da evidenciação da sua toxina.

CONCLUSÕES

1. É possível evidenciar-se a toxina do *C. diphtheriae* na lesão da garganta através de prova de hemaglutinação passiva, empregando-se hemácias sensibilizadas com antitoxina diftérica.
2. O processo, de execução muito simples, pode acusar o resultado em menos de 2 horas.
3. Tal método oferece grande possibilidade de aplicação vantajosa no diagnóstico da difteria.

SUMMARY

The presense of *C. diphtheriae* toxin was demonstrated in throat lesions of 47.7 per cent of case with probable diagnosis of diphtheria, by passive hemagglutination test using erythrocytes previously sensitized by diphtheria anti-toxin. From 53.0 per cent of the same patients toxigenous bacilli were isolated. Hemagglutination test was the only positive one in 13.6 per cent of cases and cultivation in 18.9 per cent. The passive hemagglutination tests performed on 42 children, normal or with pharyngitis or tonsillitis but without clinical characteristics of diphtheria were all negative. The procedure described in this paper, of very simple execution can show results in less than two hours and offers great possibility of advantageous application in the diagnosis of diphtheria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHRISTOVÃO, D. de A. — Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. I. Fermentação da sacarose por bacilos diftéricos virulentos isolados em São Paulo. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 11 (1):97-114, jun. 1957.
2. ———— Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. II. Observações sobre bacilos diftéricos e difteróides isolados em São Paulo: aspecto morfológico, propriedades fermentativas, virulências e frequência dos tipos de *Corynebacterium diphtheriae* encontrados. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 11(1): 115-134, jun. 1957.
3. CHRISTOVÃO, D. A. & COTILLO Z., L. G. Pesquisa de dosagem da toxina diftérica no sangue de pacientes de difteria por reação de hemaglutinação passiva. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20(2):223-232, dez. 1966.
4. FROBISHER, M. et alii — "Diphtheria" In: AMERICAN Public Health Association. *Diagnostic procedures and reagents*. 4th ed., New York, 1963. p 231-260.
5. TASMAN, A. et alii — The presence of diphtheria toxin in the saliva of diphtheria patients. The pathogenesis of diphtheria. *Ned. T. Geneesk.*, 98:3388-3398, Nov. 1954. Res. in *Excerpta med., Seci. IV*. Amsterdam, 8 (11):682, Nov. 1955.