

ESTUDO COMPARATIVO DAS REAÇÕES DE SABIN-FELDMAN E DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA, PARA A TOXOPLASMOSE, EM 1 000 SOROS HUMANOS. COMPORTAMENTO ANÔMALO DE ALGUNS SOROS (1)

COMPARATIVE EVALUATION OF TOXOPLASMOSIS INDIRECT
FLUORESCENT AND SABIN-FELDMAN DYE TESTS IN A THOUSAND
HUMAN SERA. A FEW UNEXPECTED RESULTS

MÁRIO E. CAMARGO (2)

SUMMARY

Dye-test and indirect antiglobulin fluorescent test for toxoplasma antibodies were compared in 1,000 human sera. Both techniques were described in detail, with special emphasis on preparation of antigens and conjugates for the fluorescent test. The tests were studied as to reproductibility of results, and a close agreement was found for successive titrations of same sera. Dye-test and fluorescent test compared well, with an almost total coincidence of results as to reactivity of sera. Titers were the same or differed by only one dilution in 97.7% of reactive sera and by only two dilutions in the remaining 2.3%. A small number of cases was seen with unexpected temporary divergences, as they reacted only in the dye-test when first examined. However, when tested again after being frozen for a few hours or days, they furnished entirely negative results. A cytoplasm-modifying factor different from that responsible for immune-reactions was suggested to occur in such sera.

I — INTRODUÇÃO

A reação sorológica descrita em 1948 por SABIN & FELDMAN³², o "dye test" ou reação do corante, tem sido considerada método padrão para a pesquisa e titulação de anticorpos para o *Toxoplasma gondii*. Embora predomine na literatura atual o conceito de que se trata de reação específica (CATHIE⁴, 1957; KABELITZ^{30, 31} 1960; MEIRA *et alii*⁴³, 1959), certo número de pesquisadores ainda manifesta dúvidas quanto ao significado dos resultados, especialmente diante de reações positivas de baixos títulos (VAN THIEL⁵⁸, 1958; KELEN *et alii*³², 1962). Na verdade, o emprego da reação do corante tem sido muito limitado, mas esse fato se deve às dificulda-

des relacionadas com a execução da prova. Apenas alguns centros especializados reúnem as condições necessárias para tanto e, assim mesmo, com capacidade de trabalho até certo ponto restrita. Assim, a necessária amplitude de aplicação dos métodos sorológicos para a toxoplasmose justifica a pesquisa de novas técnicas que possam substituir com vantagens a reação do corante.

Dentre os demais métodos sorológicos descritos para a pesquisa de anticorpos para o toxoplasma, são mais comumente referidos os da reação de fixação do complemento e de hemaglutinação.

A reação de fixação do complemento tem se mostrado menos sensível do que a reação

(1) Tese apresentada à Cátedra de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para doutoramento em Medicina.

(2) Do laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

de Sabin-Feldman. Para a maioria dos autores, são diversos os anticorpos revelados por ambas. Para outros (DESMONTS²¹, 1960; HULDT²⁵, 1958; THALHAMER⁵⁴, 1960; BOZDECH & JIRA¹, 1961), entretanto, as divergências observadas refletem apenas diferentes sensibilidades dos métodos e tendem a desaparecer à medida que aumenta a sensibilidade das técnicas de fixação de complemento. A grande variedade de antígenos e a pluralidade de técnicas utilizadas nas reações de fixação do complemento não permitem comparação segura dos resultados obtidos por diferentes laboratórios.

A reação de hemaglutinação, descrita por JACOBS & LUNDE²⁷, 1957, tem mostrado sensibilidade comparável à da reação de Sabin-Feldman (MALONEY & KAUFMAN⁴⁰, 1960; KNIERIM *et alii*³³, 1960; LUNDE *et alii*³⁸, 1962; THIERMANN *et alii*³⁵, 1964). A simplicidade de execução poderá fazer dela substituto ideal para a reação do corante. Entretanto, não são pequenas as dificuldades com que se defronta quem se propõe a realizá-la de rotina. Os resultados por vezes bastante discrepantes, referidos por vários pesquisadores (LEWIS & KÉSSSEL³⁷, 1961; REUSS⁴⁸, 1961; MITCHELL & GREEN⁴⁵, 1960; WITMER *et alii*⁶¹, 1961, bem como as numerosas modificações técnicas introduzidas nos seus protocolos, traduzem tais problemas com eloquência. É de se notar, além do mais, que as reações de fixação do complemento e de hemaglutinação exigem a obtenção freqüente de quantidades relativamente grandes de toxoplasmas, o que é sempre limitado pela impossibilidade, até o presente, do cultivo "in vitro" desses organismos.

A intuição de COONS⁷ (1941) de marcar proteínas imunologicamente ativas por substâncias fluorescentes, e de assim obter "corantes" com especificidade imunológica, veio criar novas possibilidades em biologia, inclusive no campo da sorologia. O posterior desenvolvimento e utilização de fluorocromos facilmente ligáveis às proteínas e quimicamente estáveis, como o isotiacianato de fluoresceína (RIGGS *et alii*⁴⁰ 1958), a lissamina rhodamina B (CHADWICK *et alii*⁵, 1958) e outros, possibilitou a divulgação do emprego dos novos métodos de imunocoloração, ou melhor, de imunofluorescência.

De execução bastante simples, não exigindo senão aparelhagem de custo acessível e reativos de fácil preparo ou já hoje de obtenção no comércio, as técnicas de imuno-

fluorescência vêm encontrando aplicação cada vez mais ampla na prática médica. Além disso, elas têm mostrado alta sensibilidade e grande especificidade de resultados. Todas essas características justificam o interesse despertado para a adaptação das técnicas de imunofluorescência à sorologia da toxoplasmose.

As primeiras tentativas na pesquisa de anticorpos para *Toxoplasma gondii* com técnicas de imunofluorescência foram feitas por GOLDMAN¹⁷, em 1957. Esse pesquisador, inicialmente, conseguiu evidenciar toxoplasmas por imunofluorescência em esfregaços de exsudatos peritoneais de camundongos infectados. Para isso, utilizou soros imunes contendo anticorpos específicos, marcados pelo isocianato de fluoresceína. Submetidos diretamente à ação destes, os toxoplasmas mostravam-se fluorescentes quando observados à luz ultravioleta. Goldman demonstrou a especificidade das colorações obtidas, inibindo-as pelo tratamento prévio dos organismos por um anti-soro específico não marcado. As áreas antigênicas dos parasitas eram então bloqueadas pelos anticorpos não marcados e passavam a não mais fixar os anticorpos conjugados ao fluorocromo. Em seguida, GOLDMAN¹⁸ (1957) aplicou o mesmo processo de inibição à pesquisa de anticorpos séricos. Tratava os esfregaços, contendo toxoplasmas, pelos soros suspeitos e pelas globulinas marcadas. A presença de anticorpos nos soros era traduzida pela inibição, parcial ou total, da fluorescência dos toxoplasmas. Resultados mais consistentes eram obtidos fazendo a reação em apenas um tempo, isto é, tratando os esfregaços por mistura do soro a testar e conjugado específico. Os anticorpos presentes no soro como que competiam com os anticorpos marcados e se fixavam, preferencialmente, e com exclusão destes, às áreas antigênicas dos toxoplasmas. Goldman trabalhava somente com soros não diluídos e apenas avaliava a intensidade da inibição, de 1⁺ a 4⁺. Não mais do que 50% dos soros reagentes na reação de Sabin-Feldman mostravam atividade inibidora. A maioria das discrepâncias entre as duas reações ocorria com soros de baixos títulos, inferiores a 1/256 na reação de Sabin-Feldman.

Somente cerca de cinco anos depois destes primeiros trabalhos, registra a literatura novos resultados com a técnica de inibição da fluorescência para a toxoplasmose; foram publicados por GOLDMAN *et alii*²⁰ (1962).

Para aumentar a sensibilidade da reação, usaram conjugados diluídos ao limite da atividade fluorescente. Titularam os soros empregando diluições crescentes, de razão 4, como é habitual na reação de Sabin-Feldman. A reação de inibição mostrou boa reprodutibilidade de títulos e estes aproximaram-se nitidamente daqueles obtidos com a reação de Sabin-Feldman. Os resultados de ambas concordaram, dentro da variação de um tubo de diluição, em 83% de 183 soros paralelamente titulados. Entretanto, em conjunto, a reação de fluorescência mostrou-se menos sensível do que a reação de Sabin-Feldman, em geral revelando títulos mais baixos.

DALLENBACH & PIEKARSKI¹⁹, em 1960, procurando demonstrar toxoplasmas em tecidos por meio de anticorpos fluorescentes, verificaram relação quantitativa evidente entre os títulos dos soros e a intensidade das fluorescências resultantes. Esses pesquisadores, além da técnica direta descrita por GOLDMAN¹⁷, utilizaram também a técnica indireta. Esta, descrita inicialmente por WELLSER & COONS²⁰, (1954), consiste em evidenciar os anticorpos fixados às estruturas antigênicas por meio de soro antiglobulina, marcado por fluorocromo. O material, contendo os parasitas, em lâminas, é tratado inicialmente pelo soro com anticorpos específicos. Depois é lavado em solução salina para a retirada das proteínas não imunologicamente ligadas às estruturas antigênicas. Em seguida, é pôsto em contato com o conjugado antiglobulina. Os anticorpos do soro, de natureza globulínica, ligados imunologicamente aos toxoplasmas, funcionam então como antígenos, fixando estas proteínas marcadas. Sob iluminação adequada, tornam-se fluorescentes e emprestam esta fluorescência aos organismos a que estão ligados.

KELEN *et alii*²², (1962) foram os primeiros a relatar a utilização da técnica indireta de imunofluorescência na sorologia da toxoplasmose. Titularam cerca de 600 soros humanos paralelamente pelas reações de Sabin-Feldman, de imunofluorescência indireta, de fixação do complemento e de hemaglutinação. Enquanto 30,8% dos soros reagiram positivamente à reação de Sabin-Feldman, nas demais reações tais percentagens foram sensivelmente menores, de 5,0% para a imunofluorescência, 2,9% para a fixação do complemento e 3,9% para a hemaglutinação. Comparando títulos obtidos na reação de Sa-

bin-Feldman com a reatividade à imunofluorescência, esses pesquisadores verificaram que todos os soros de títulos iguais ou maiores do que 1/1 024 reagiam positivamente na imunofluorescência. Entretanto, dos soros com títulos entre 1/128 e 1/64, somente 37% reagiam na fluorescência e, daqueles com títulos ainda menores, apenas raros o faziam. Kelen *et alii* interpretaram tais resultados como uma evidência a mais da inespecificidade dos resultados da reação de Sabin-Feldman, especialmente quando revelava baixos títulos.

MANDRAS *et alii*²¹, (1962), referiram os resultados das titulações de 20 soros de pessoas consideradas clinicamente doentes de toxoplasmose. Empregaram as reações de Sabin-Feldman, de fixação do complemento, de hemaglutinação e de imunofluorescência. Em 16 soros reagentes na reação de Sabin-Feldman encontraram 15 reagentes na imunofluorescência e os títulos obtidos em ambas, de 1/10 e 1/1 280, eram comparáveis. Em 13 desses 15 soros reagentes, os títulos nas duas reações não divergiam de mais do que duas diluições, de razão 2. Já, em 51 soros de pessoas consideradas normais, as reações feitas, de fixação do complemento, de hemaglutinação e de imunofluorescência, foram negativas, com exceção de um único soro que reagiu apenas na fluorescência e em baixo título (1/10).

Durante o ano de 1963, no Laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, começamos a nos adestrar em técnicas de imunofluorescência, especialmente dirigidas para a pesquisa e titulação de anticorpos séricos. Para a toxoplasmose, procuramos trabalhar inicialmente com a técnica de inibição, de GOLDMAN¹⁸, (1957). Entretanto, nossos resultados mostraram-se constantemente pouco sensíveis com relação aos títulos revelados pela reação de Sabin-Feldman, embora tivéssemos utilizado conjugados específicos de diferentes atividades e em diferentes diluições.

Tentamos, então, a técnica indireta e os resultados iniciais mantinha-se bastante inferiores aos da reação de Sabin-Feldman. Entretanto, pela introdução de ligeiras modificações técnicas, empregando conjugados de melhores características, obtivemos nítida elevação dos títulos que atingiram e mesmo ultrapassaram aqueles revelados pela reação de Sabin-Feldman. Publicamos então, em nota

prévia (CAMARGO³, 1964), o estudo comparativo de 140 soros humanos, titulados pelas técnicas de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta. Houve concordância total das percentagens de reatividade. Assim, todos os 109 soros reagentes na reação de Sabin-Feldman mostraram-se também reagentes na imunofluorescência, e vice-versa: todos os soros reagentes na fluorescência também o foram na prova do corante. Além disso, houve concordância dos títulos obtidos em ambas as reações, da ordem de 90,8% dentro de uma variação de uma diluição de razão 4. Não houve discrepâncias de títulos maiores do que duas diluições. Quanto a níveis de títulos, eles variavam de 1/16 a 1/32 000 e 1/64 000. Na maioria, os títulos revelados pela reação de imunofluorescência foram iguais ou superiores aos da reação de Sabin-Feldman.

Depois de publicada esta nota, tivemos conhecimento de publicações dos últimos meses de 1963 e 1964, referindo resultados mais sucintos obtidos por alguns pesquisadores. GARIN *et alii*¹⁵, (1963) submetem às reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta 189 soros humanos, dos quais 127 foram não reagentes em ambas. Os soros reagentes foram então testados em apenas três diluições diferentes, de 1/10, 1/100 ou 1/200 e 1/1 000. Houve boa correlação de títulos, freqüentemente mais elevados na reação de fluorescência. O mesmo verificaram STADTSBAEDER *et alii*¹⁶, (1964), em cerca de 70 soros humanos. ZARDI¹², (1963), trabalhando com pouco mais de uma centena de soros humanos, fez titulagens ao mesmo tempo pelas técnicas de Sabin-Feldman e de imunofluorescência em apenas 38 soros. Eram todos fracamente reagentes, não ultrapassando 1/256 os títulos máximos observados. Os resultados das titulagens, feitas com diluições sucessivas de razão 2, foram praticamente concordantes, em geral não havendo divergências maiores do que uma diluição.

KRAMARZH¹⁴, (1963) comparou a intensidade de reações de imunofluorescência indireta e de inibição de fluorescência de soros humanos diluídos a 1/10, com os resultados de titulagens por reações de fixação do complemento. Em geral, quando os títulos de fixação do complemento eram iguais ou maiores do que 1/40, as reações de fluorescência mostravam-se intensamente positivas. Para títulos de 1/10 e 1/20, eram positivas ou le-

vemente positivas, para fixações do complemento negativas, as reações de fluorescência eram igualmente negativas ou, por vêzes, levemente positivas.

Ainda em 1963, RUCKERBAUER *et alii*¹⁹ referem o emprêgo de técnicas direta e indireta de imunofluorescência para a demonstração de toxoplasmas em esfregaços de órgãos e de exsudato peritoneal e em cortes histológicos de material de animais infetados. Verificaram também a possibilidade de se pesquisar anticorpos nos soros de animais pelas técnicas de imunofluorescência, indireta e de inibição que, entretanto, resultaram menos sensíveis do que a da fixação do complemento.

* * *

Diante do exposto, propuzemo-nos a verificar, em número relativamente grande de soros, se os resultados da reação de imunofluorescência indireta são realmente concordantes aos da reação de Sabin-Feldman, como parecem evidenciar nossos resultados preliminares. Tal verificação apresenta grande interesse prático, qual seja o de possibilitar a divulgação do uso, hoje seriamente limitado pelas dificuldades inerentes à reação de Sabin-Feldman, de reações sorológicas para a toxoplasmose. Além disso, apresenta importância relevante em afastar dúvidas sobre a especificidade dos resultados da reação do corante. Essas dúvidas surgem, ao menos em parte, da impossibilidade de se confirmarem por outras técnicas sorológicas, muitos dos resultados da reação de Sabin-Feldman, especialmente quando de baixos títulos.

Propuzemo-nos ainda a apresentar os detalhes técnicos do método de fluorescência, tendo em vista o grande interesse de sua aplicação na pesquisa e na prática médica.

II — MATERIAL E MÉTODOS

a) SOROS — Os soros humanos, em número de 1 000, estudados no presente trabalho, não foram selecionados, mas constituem o material por nós recebido durante alguns meses do ano de 1964 para a pesquisa e titulação de anticorpos para toxoplasma. Os sangues foram colhidos evitando-se apenas os períodos pós-prandiais correspondentes a refeições mais copiosas, colocados em todos secos para coagular e em seguida mantidos em

estufa a 37°C para a retração do coágulo. Os soros, separados por centrifugação, eram utilizados em seguida, ou mais frequentemente, congelados a 20°C até o momento das reações. Para as reações, alíquotas dos soros eram inativadas a 56°C por 30 minutos e em seguida diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,85%. As diluições se faziam na razão 4, de 1/16 a 1/4 096 e quando necessário, de 1/4 000 em diante, na razão 2. Preparavam-se da seguinte maneira: a um tubo com 1,5 ml do diluente, adicionava-se 0,1 ml de soro, misturava-se e passava-se 0,1 ml para um segundo tubo contendo 0,3 ml de diluente e assim por diante, para se obter ao todo 5 diluições, respectivamente de 1/16, 1/64, 1/256, 1/1 024 e 1/4 096. Para diluições maiores, a um tubo com 9,9 ml de diluente adicionava-se 0,1 ml de soro (diluição a 1/100), misturava-se e passava-se 0,1 ml para tubo com 0,9 ml de diluente (diluição a 1/1 000). Dêste, passavam-se 0,2 ml para tubo com 0,6 ml de diluente (diluição a 1/4 000). Passando-se 0,5 ml desta última diluição sucessivamente para tubos contendo 0,5 ml de diluente, obtinham-se diluições crescentes de razão 2 (1/8 000, 1/16 000, 1/32 000 e 1/64 000).

As mesmas diluições foram utilizadas para as reações de imunofluorescência e de Sabin-Feldman, realizadas concomitantemente e lidas independentemente por pessoas diferentes que ignoravam os resultados.

b) REAÇÃO DE SABIN-FELDMAN — Esta reação foi realizada pela modificação técnica do método original de SABIN-FELDMAN³² (1948), utilizada há vários anos no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os toxoplasmas, da cepa M isolada nesse mesmo Departamento, foram mantidos em camundongos brancos e repicados cada dois ou três dias.

Para a reação, utilizamos o exsudato peritoneal de camundongo inoculado dois dias antes. Com animais de peso constante (em torno de 20 g), originários da mesma colônia e inoculando-se número grosseiramente constante parasitas, tornou-se possível a obtenção relativamente constante de exsudatos peritoneais muito ricos em toxoplasmas e praticamente livres de células e de leucócitos. Para isso, inoculamos cerca de 0,5 a 1,0 ml de lavado peritoneal em cada camundongo, material êsse obtido injetando-se e aspiran-

do-se 5 ml de solução salina estéril na cavidade peritoneal de animais com dois dias de inoculação. Obtivemos, em geral, de 20 a 50 parasitas por campo microscópico de 230 aumentos, ao se observar pequena gôta (de agulha calibre 8, mantida horizontalmente) entre lâmina e lamínula de 18 x 18 mm. Os leucócitos, em geral, ocorreram em proporção diminuta, até um ou dois por campo microscópico. Enquanto para os repiques colhemos o exsudato peritoneal com solução estéril de cloreto de sódio a 0,85%, para a reação de Sabin-Feldman usamos solução de citrato de sódio a 3,8%.

Para reação, o lavado peritoneal, uma vez colhido, era diluído sem demora a 1/5 com "fator acessório" e o antígeno resultante, imediatamente pipetado nos tubos de reação. Como "fator acessório" foram usados soros humanos de doadores previamente selecionados entre pessoas jovens com reações de Sabin-Feldman negativas. Além disso, tais soros não deviam ter atividade lítica inespecífica sobre os parasitas, traduzida pela presença de mais de 10% de toxoplasmas não corados nos tubos testemunhas.

Êsses testemunhas eram feitos: 0,02 ml de lavado peritoneal mais 0,08 ml de "fator acessório", mais 0,1 ml de solução salina. Seguiu-se a reação, como a de Sabin-Feldman.

Tal atividade inespecífica, entretanto, foi raramente observada, ao menos em soros de doadores jovens (18 anos, em média). O sangue para "fator acessório" era colhido diretamente em tubos de centrifugação secos e deixado coagular à temperatura ambiente. Os tubos eram em seguida mantidos em estufa a 37°C para retração do coágulo e passados para geladeira onde permaneciam até o dia seguinte, para se obter o máximo volume de soro. Separado por centrifugação, êste era imediatamente distribuído em tubos, em volumes de cerca de 10 ml e congelado a -20°C.

Para uso, degelava-se um ou mais tubos e o remanescente era novamente congelado, sem perda de atividade. Tais soros conservaram-se ativos por períodos de, pelo menos, dois meses no congelador.

Para a reação de Sabin-Feldman, a volumes de 0,1 ml das diluições dos soros, em tubos de 12 x 75 mm, juntava-se 0,1 ml da mistura antigênica exsudato-fator acessório, misturando-se por agitação. Incubavam-se os tubos por uma hora, em banho-maria a

37°C, com agitação ocasional. Ao fim desse período, pipetava-se em cada tubo uma gôta (de 0,030 a 0,035 ml) de azul de metileno alcalino, preparado segundo Sabin & Feldman (A 1,0 ml de tampão carbonato-borato de pH 10,8, adiciona-se 0,3 ml de solução alcoólica saturada de azul de metileno; tampão alcalino: 9,72 ml de carbonato de sódio anidro a 0,53% e 0,28 ml de borato de sódio a 1,91%). Deixavam-se os tubos à temperatura ambiente por 15 minutos aproximadamente e após esse período uma alíquota de cada era examinada entre lâmina e lamínula ao microscópio (320 aumentos). Contavam-se então os toxoplasmas corados e não corados, em número suficiente para se estabelecerem as percentagens respectivas, para cada diluição de soro. O número total de organismos contados variava de 50 a 100 para os preparados em que não era evidente o predomínio de corados ou não corados.

Como título dos soros foi tomada a maior diluição ainda capaz de modificar 50% ou mais dos toxoplasmas presentes, tornando-os não coráveis pelo azul de metileno. Em tôdas as reações eram incluídos como testemunhas positivas soros de títulos conhecidos. A sensibilidade da prova era freqüentemente verificada incluindo-se nas reações soro positivo padrão, de título 1/1 000 (gentilmente enviado pelos Drs. Brooke e Kagan, do Communicable Disease Center, Atlanta, U.S.A.).

c) REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA — Em síntese, a reação de imunofluorescência indireta consistiu em se fazer agir diluições crescentes dos soros a testar sobre esfregaços de toxoplasmas fixados em lâminas microscópicas. Em seguida, estas eram lavadas e tratadas por antiglobulina humana marcada. Após nova lavagem para a retirada da antiglobulina marcada não fixada imunologicamente, as lâminas eram montadas e examinadas em microscopia de fluorescência.

Descreveremos inicialmente os elementos da reação, antígeno e antiglobulina marcada, seu preparo, sua características; daremos, em seguida, a técnica detalhada da execução e da leitura da reação.

1) Antígeno

Como antígeno para a reação de imunofluorescência foram usados toxoplasmas fixados sobre lâminas de microscopia. Os parasitas eram obtidos de exsudatos peritoneais de camundongos, da mesma maneira como já descrito para a reação de Sabin-Feldman. Em seguida, eram fixados em formalina a 1%, como preconizado por GOLDMAN¹⁷ (1957). Ao material obtido por lavagem peritoneal com solução de cloreto de sódio a 0,85% ou de citrato de sódio a 3,8%, juntava-se igual volume de solução salina tamponada com fosfatos* contendo 2% de formalina. Misturava-se rapidamente por agitação e deixava-se à temperatura ambiente ou a 37°C durante 1/2 hora, com agitação ocasional. Centrifugava-se em seguida todo o material por 10 minutos a 2 000 r.p.m. (Centrífuga Internacional n.º 1) para sedimentar os parasitas. Dispensava-se a centrifugação prévia, a baixa velocidade, recomendada por Goldman, para a retirada dos leucócitos, já que estes ocorriam em pequeno número em nosso material. Os toxoplasmas eram então suspensos em volume adequado de solução de cloreto de sódio a 0,85% a fim de se conseguir, nos preparados, um número adequado de parasitas por campo microscópico. Esse volume era encontrado por tentativas.

A manipulação de grande número de lâminas, quando se titulam vários soros em uma reação, constitui dificuldade técnica da prova de imunofluorescência, especialmente na fase de leitura microscópica. Por esse motivo procuramos realizar maior número de reações por lâmina. Com esmalte de unhas, delimitamos, sobre cada lâmina, 10 pequenas áreas quadradas, com cerca de 5mm de lado, dispostas em dois grupos, ocupando cada um superfície correspondente à de uma lamínula de 18 x 18 mm, como demonstra a figura 1. Em publicação recente descrevemos o preparo das lâminas para utilização em reações sorológicas de imunofluorescência (CAMARGO³).

(*) A solução salina tamponada com fosfatos utilizada no presente trabalho consiste de solução aquosa de cloreto de sódio a 0,85% contendo fosfatos primário e secundário de sódio a 0,01 M, com pH 7,2. Era preparada em solução para uso com água destilada (50 ml para 1 000 ml) segundo as necessidades. A composição da solução estoque era a seguinte: NaCl 170,0g; Na₂HPO₄ 24,0g; NaH₂PO₄·2H₂O 5,0g; água destilada para 1 000 ml.

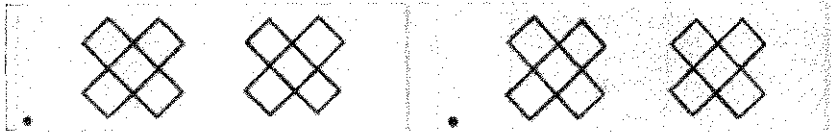


Fig. 1 — Lâminas de microscopia para reações sorológicas em técnicas de imunofluorescência.

A suspensão de toxoplasmas é depositada em cada uma das pequenas áreas por meio de pipeta de Pasteur ou de pipeta adaptada a agulha hipodérmica sem bisel. Aspira-se todo o excesso de líquido, restando apenas pequena quantidade recobrimdo por igual todo o pequeno quadrado. As lâminas secam rapidamente à temperatura ambiente ou na estufa a 37°C. A secagem de gotículas maiores apresenta, em nossa experiência, o inconveniente da formação de cristais de cloreto de sódio, responsáveis pela má fixação de organismos sobre as lâminas. Uma vez secas, estas são conservadas a -20°C até o momento do uso, mantendo-se inalteradas por muitos meses.

As suspensões de toxoplasmas podem ser conservadas em geladeira e utilizadas para o preparo de lâminas somente dentro de um prazo de 24 horas, desde que há perda progressiva da atividade antigênica depois desse período. O mesmo foi observado por GARIN *et alii*¹⁵ (1963) que tentaram preservar os toxoplasmas por vários métodos, inclusive o de liofilização, sem resultados.

Temos observado conservação das suspensões por períodos mais longos, até cerca de dois meses, incorporando-se às mesmas um agente quelante — etileno-dinitrilo-tetracetato sódico (EDTA) — como utilizado por PORTNOY & GARSON⁴⁷ (1960), para a preservação de antígenos de cardiolíplina (O “seqüestro” pelo EDTA de íons metálicos especialmente cúpricos suprimiria a ação catalítica destes e as reações de oxidação resultantes). Para manter pH neutro, misturamos soluções de 0,1 M de EDTA tetrasódico e dissódico na proporção de 3 para 2 e juntamos a mistura à suspensão de parasitas, para a concentração final de 0,01 M.

Métodos mais eficazes de preservação seriam, entretanto, de importância para a diluição da reação de imunofluorescência.

B) *Conjugado antiglobulina-fluoresceína*

A) SÔRO IMUNE — O sôro antiglobulina humana para o preparo do conjugado utilizado neste trabalho foi obtido por imunização de coelhos, pela técnica de Dalla Volta & Di Caprio (descrita e utilizada por LACAZ³⁵, 1953), no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apresentava título aglutinante de 1/8 000 diante de hemácias Rh-positivas sensibilizadas por anticorpos incompletos. Além desse, outros soros imunes utilizados para o preparo de conjugados foram obtidos pela imunização de coelhos com gamaglobulina humana do comércio, incorporada em adjuvante completo de Freund. Teremos a oportunidade de referir observações com vários conjugados, além daquele utilizado neste trabalho, quando tratamos dos resultados da reação de fluorescência.

B) FLUOROCROMO — Para a marcação das globulinas usamos o isotiocianato de fluoresceína produzido pela “The Sylvana Company”, lote n.º 1 036, doado ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela Fundação Kellog. Como foi demonstrado por FROMMHAGEN & SPENDLOVE¹², (1962), a presença em lotes de isotiocianato de fluoresceína de produtos de degradação do fluorocromo é um dos fatores responsáveis pelas colorações inespecíficas dos conjugados. Por isso, recomenda-se o emprêgo de isotiocianato da mais alta pureza, sabendo-se que, mesmo produtos de boa procedência contém por vezes 30% ou mais do seu peso em componentes degradados. Esses pesquisadores chamam a atenção para o matiz laranja de tais componentes contrastando com a cor pálida, amarelo esverdeada, do isotiocianato puro. O fluorocromo por nós utilizado foi submetido à electroforese em papel como indicado por Frommhagen & Spendlove, obtendo-se três componentes, um com velocidade de migração intermediária, de cor ama-

relo-limão e dois outros, de migração respectivamente mais rápida e mais lenta, de coloração laranja. O componente intermediário constituía quase a totalidade do material, dando mancha de intensa fluorescência à luz ultravioleta. Os dois outros formavam manchas discretas, apenas visíveis, indicando sua baixa concentração no presente lote de isotiocianato.

C) MARCAÇÃO DA ANTIGLOBULINA — Para a marcação com o fluorocromo foram tomadas as frações globulínicas do sêro imune de coelho, antiglobulina humana. Essas frações foram separadas das demais proteínas do sêro por precipitação a 4° C com sulfato de amônio de meia saturação, juntando-se a um volume de sêro, igual volume de sulfato de amônio saturado, lentamente, gota-a-gota e com agitação constante. A mistura era mantida até o dia seguinte em geladeira, para total precipitação das globulinas. Estas eram separadas por centrifugação a frio e resuspensas em sulfato de amônio de meia saturação, em volume igual ao do sêro. Centrifugava-se novamente e repetia-se esta lavagem das globulinas em sulfato de amônio por mais uma vez. Finalmente, dissolvia-se o sedimento em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,85%, em volume igual ao do sêro. Procedia-se em seguida à retirada do sulfato de amônio residual, por diálise contra solução salina freqüentemente trocada até que não mais se evidenciassem traços de sulfato de amônio no banho, revelados pela adição de gotas de reativo de Nessler ou de solução de cloreto de bário a 10%. Em geral bastavam períodos de 24 horas. Dosavam-se, então, as proteínas na solução, pelo método referido adiante (pág. 11) e, acertando-se a concentração final a 1 g por 100 ml, pela adição de volumes adequados de solução salina.

Com o objetivo de reduzir a atividade inespecífica dos conjugados, traduzida pela fluorescência de elementos não antigênicos, várias modificações têm sido introduzidas nas técnicas de marcação das proteínas por fluorocromos. CURTAIN⁹ (1958) verificou que, nos conjugados de isocianato de fluoresceína, os componentes mais responsáveis pelas colorações inespecíficas eram aqueles com maior mobilidade electroforética, isto é, com maior carga elétrica negativa. Tais

componentes eram os que possuíam maiores quantidades de fluorocromo por miligrama de proteínas.

MAYERSBACH & SCHUBERT¹⁰ (1960) estudaram as causas predominantes dos fenômenos de fluorescência inespecífica e concluíram como tendo influência decisiva a relativa acidez dos conjugados com relação às estruturas orgânicas a eles submetidas. GOLDSTEIN *et alii*²¹ (1961) confirmaram as observações de Mayersbach & Schubert. As moléculas de proteínas, em consequência da combinação com moléculas de fluorocromo, perdem cargas elétricas positivas. Essa perda é tanto maior quanto mais intensa a marcação, isto é, quanto maior o número de moléculas de fluorocromo ligadas a cada molécula protéica. Em consequência, há uma baixa do ponto isoeletrico das proteínas e aumento de sua mobilidade electroforética, além de outras modificações. Os mesmos pesquisadores trataram globulinas imunes com quantidades variáveis de isotiocianato de fluoresceína, verificando que a marcação resultante era mais intensa a medida que eram maiores as quantidades de fluorocromo oferecidas para a conjugação. Exprime-se de maneira simples o grau de marcação das proteínas em um conjugado, pela relação F/P, na qual êstes símbolos representam as quantidades respectivas de fluorocromo e de proteínas, em miligramas por mililitro. Nas técnicas de marcação inicialmente descritas, as quantidades de fluorocromo adicionadas às soluções de proteínas eram relativamente elevadas. Assim, na técnica de MARSHALL *et alii*¹² (1958) que substitui pelo isotiocianato de fluoresceína o isocianato utilizado por COONS & KAPLAN⁸ (1950), adicionam-se 50 mg de fluorocromo para cada grama de proteínas, isto é, na relação ponderal de 1/20. Com tal proporção, resultam conjugados com índices F/P da ordem de 20×10^{-3} ou mais. Goldstein *et alii*, no trabalho já referido, obtiveram colorações específicas intensas, não prejudicadas por colorações inespecíficas, com proteínas marcadas tendo índices F/P de 2 a $3,5 \times 10^{-3}$. Para a marcação adicionavam apenas 6 a 8 mg de isotiocianato de fluoresceína por grama de proteínas, mantendo assim relação ponderal de 1/166 a 1/125. Frommhagen & Spendlove não obtiveram colorações inespecíficas com proteínas marcadas com isotiocianato de fluoresceína de alto grau de pureza química, até que o índice

F/P não ultrapassasse o valor de $5,0 \times 10^{-3}$. Acima deste, a inespecificidade das colorações aumentava progressivamente.

Entretanto, o índice F/P exprime apenas um valor médio de marcação para cada conjugado, podendo haver grande variação na intensidade de conjugação de suas diferentes moléculas protéicas. Curtain já havia demonstrado tal heterogeneidade em conjugado de isocianato de fluoresceína. Conseguiu separar as frações homogêneas por meio de electroforese de convenção. GOLDBSTEIN *et alii* (1961) empregaram para o mesmo fim cromatografia em coluna permutadora de íons, trabalhando com anticorpos marcados por isotiocianato de fluoresceína.

CLARK & SHEPARD⁶ (1963) abordaram o problema da homogeneidade de marcação dos conjugados, por ângulo diverso. Em vez de fracionar conjugados heterogêneos em componentes homogêneos, procuraram marcar as moléculas protéicas de maneira uniforme, para níveis adequados de F/P. Para tanto, adicionavam o fluorocromo à solução protéica de maneira gradual, por diálise, evitando assim, na solução, concentrações locais elevadas do corante, que pudessem condicionar conjugações heterogêneas. As proteínas eram colocadas em tubo de celofane e este, mergulhado em banho contendo o fluorocromo em concentração tal que, uma vez estabelecido o equilíbrio, permitisse relação ponderal da ordem de 1/100, com as proteínas. Resultavam conjugados homogêneos, com índices F/P de 4,7 a $8,1 \times 10^{-3}$, dando colorações específicas intensas e colorações inespecíficas nulas ou muito fracas.

Preparamos nossos conjugados por técnica semelhante, ligeiramente modificada, que a seguir descrevemos.

Em tubo de diálise, a solução de globulinas era mergulhada em banho de cinco vezes o seu volume de solução de cloreto de sódio a 0,85% tamponada a pH 8,6 — 8,8 e contendo, em solução, isotiocianato de fluoresceína na concentração de 0,1 mg por mililitro. O tampão, de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio a 0,5 M, era rigorosamente acertado em potenciômetro. Preparava-se juntando de 4 a 5 ml de solução 0,5 M de carbonato a 100 ml de solução 0,5 M de bicarbonato. Para o tamponamento do banho, adicionava-se 1 parte de tampão a 9 partes de solução de cloreto

de sódio a 0,85%. O fluorocromo era dissolvido diretamente nessa solução tamponada. A diálise era mantida por 16 a 18 horas, com agitação contínua, em geladeira. Ao fim desse tempo, o saco de diálise era retirado do banho de fluoresceína e colocado em solução salina tamponada com fosfatos (0,01 M), de pH 7,2, para a retirada do fluorocromo não ligado às globulinas. Esta segunda diálise era feita por vários dias, em geral por uma semana, com trocas frequentes da solução tamponada, de início substituída cada três horas, depois uma ou duas vezes por dia.

Para se estabelecer as características do conjugado quanto à intensidade de marcação das proteínas pela fluoresceína, dosavam-se ambos estes elementos e calculava-se o índice F/P, já referido.

D) DOSAGEM DA FLUORESCÊNCIA NOS CONJUGADOS — A concentração de isotiocianato de fluorescência ligado às globulinas foi determinada espectrofotometricamente por leitura direta da intensidade da cor de diluições adequadas dos conjugados em solução salina tamponada, de pH 8,6 ou aproximado. A correspondência entre transmitâncias e concentrações foi obtida por meio de curva de calibração, construída a partir de soluções aquosas em meio alcalino de concentrações conhecidas de isotiocianato de fluoresceína.

Várias características físico-químicas dos fluorocromos, como por exemplo a intensidade de fluorescência, são modificadas pela ligação química com moléculas de proteínas. Por isso procurou-se verificar a validade do emprêgo de curvas de calibração construídas com soluções de fluorocromos livres, não ligados a proteínas, para a dosagem dos mesmos nos conjugados protéicos, onde se encontram unidos quimicamente às proteínas. GOLDMAN & CARVER¹⁰ (1961) prepararam conjugados adicionando isotiocianato de fluoresceína às soluções protéicas. Em seguida retiravam por diálise o fluorocromo não fixado. Dosavam então o isotiocianato fixado às proteínas, estabelecendo a diferença entre o isotiocianato adicionado inicialmente e o isotiocianato livre recolhido com o líquido de diálise. Por outro lado, dosavam o isotiocianato fixado às proteínas nesses mesmos conjugados, por espectrofotometria, utilizando curvas de calibração feitas a partir de isotiocianato livre. Comparando

ambos os resultados, concluíram pela ausência de diferenças significativas. Entretanto, mais recentemente McKINNEY *et alii*³⁰ (1964) repetindo essa comparação com técnicas mais delicadas, em que o isotiocianato não conjugado era recuperado em coluna de Sephadex, verificaram apreciável diferença entre os coeficientes de extinção de isotiocianato livre e de isotiocianato conjugado. Mas, para manter uniformidade com os resultados de outros pesquisadores, continuam empregando coeficientes de extinção de fluorocromo livre para a dosagem de isotiocianato conjugado. Lembrem, ainda, a possibilidade de variações em diferentes conjugados do coeficiente de extinção do fluorocromo combinado, pela interferência de uma série de fatores ainda mal definidos, sendo portanto aconselhável empregar ao menos provisoriamente curvas de calibração com compostos quimicamente puros de fluoresceína. Tal orientação é seguida em trabalho recente por LEWIS *et alii*³⁷ (1964).

Para o traçado das curvas escolhemos o comprimento de onda de 490 $m\mu$ correspon-

dente à máxima absorção de luz visível pelo isotiocianato. A figura 2 mostra a curva de absorção obtida em um espectrofotômetro Coleman Jr. do isotiocianato de um conjugado, em meio alcalino. As leituras foram feitas em densidades ópticas, em comprimentos de onda intervalados, de 400 a 540 $m\mu$.

Já era conhecido o fato de que a intensidade de absorção de luz, pela molécula de fluoresceína, na região de 480 a 495 $m\mu$, sofre acentuada redução com a acidificação do meio. EMMART¹² (1958) confirmou-o para os conjugados de fluoresceína, mostrando que a absorção é máxima em meio alcalino, diminuindo apenas ligeiramente até pH 7, mas caindo rapidamente com o aumento da acidez.

Para o traçado da curva de padronização, preparou-se solução-mãe, a 10 mg em 100 ml, de isotiocianato de fluoresceína, pesando-se rigorosamente 10 mg do sal e dissolvendo-se em pequena quantidade de acetona. Juntou-se, então, à solução, 1,0 ml de tampão carbonato-bicarbonato de sódio

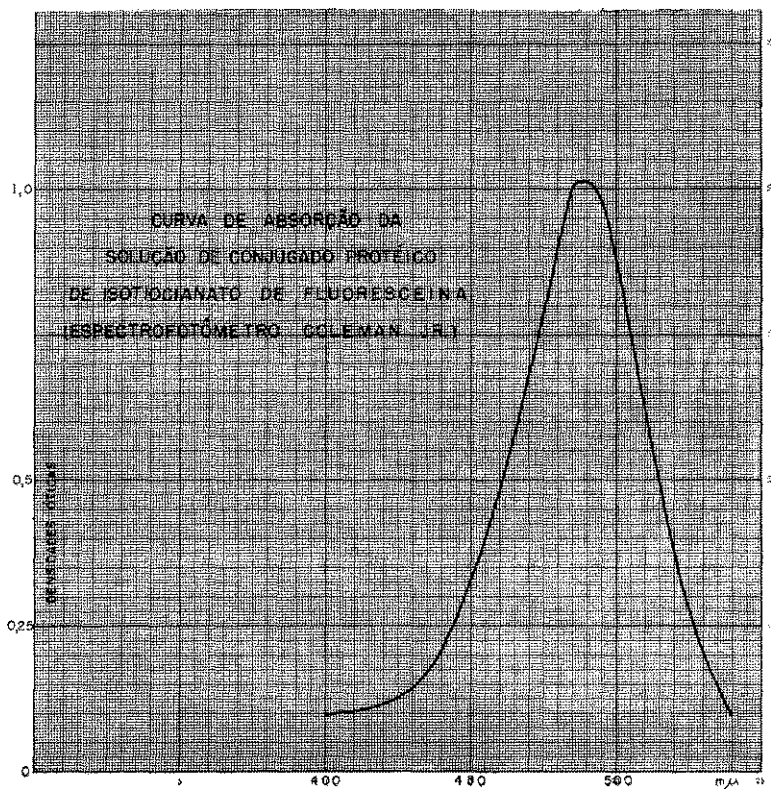


FIGURA 2

(0,5 M, de pH $8,6 \pm 0,3$) e transferiu-se cuidadosamente toda a mistura para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com água destilada. Foram então preparadas, em balões volumétricos de 25 ml ou de 50 ml, diluições crescentes do isotiocianato de fluoresceína, de 0,2 mg em 100 ml até 2,4 mg em 100 ml, intervaladas respectivamente de 0,2 mg (0,2 mg; 0,4 mg; 0,6 mg ... 2,4 mg) a partir de alíquotas da solução mãe, medidas com pipetas volumétricas, completando-se os volumes com água destilada. Utilizou-se um espectrofotômetro Coleman Jr., modelo 6A, fazendo-se as leituras em cubas de 10 mm, contra água, em 490μ . A figura 3 mostra, a título de exemplo, a curva obtida para o aparelho série n.º A42823, lançando-se em papel semilogarítmico as transmitâncias contra as respectivas concentrações de fluorocromo, expressas em miligramas em 100 ml.

ticianato de fluoresceína, foram determinadas espectrofotometricamente pelo método do biureto, segundo GORNALL *et alii*²³ (1949) ou quando em níveis inferiores a 2 g%, pela técnica de LOWRY *et alii* (1949), referida por KABAT & MAYER²⁹ (1961). As respectivas curvas de calibração foram construídas e constantemente verificadas por meio de solução padrão de globulina humana, previamente dosada pelo método de Kjeldahl. As dosagens pela técnica de Gornall *et alii* foram feitas juntando-se 0,1 ml da solução de globulina a 2,0 ml do reativo do biureto, em cubas de 12 mm, fazendo-se a leitura após o desenvolvimento de cor, no comprimento de onda de 560μ , como recomendado por GOLDWASSER & SHEPARD²³ (1958), a fim de se evitar interferência da cor da fluoresceína. Para a técnica de Lowry *et alii*, a solução de globulina era diluída adequadamente em água

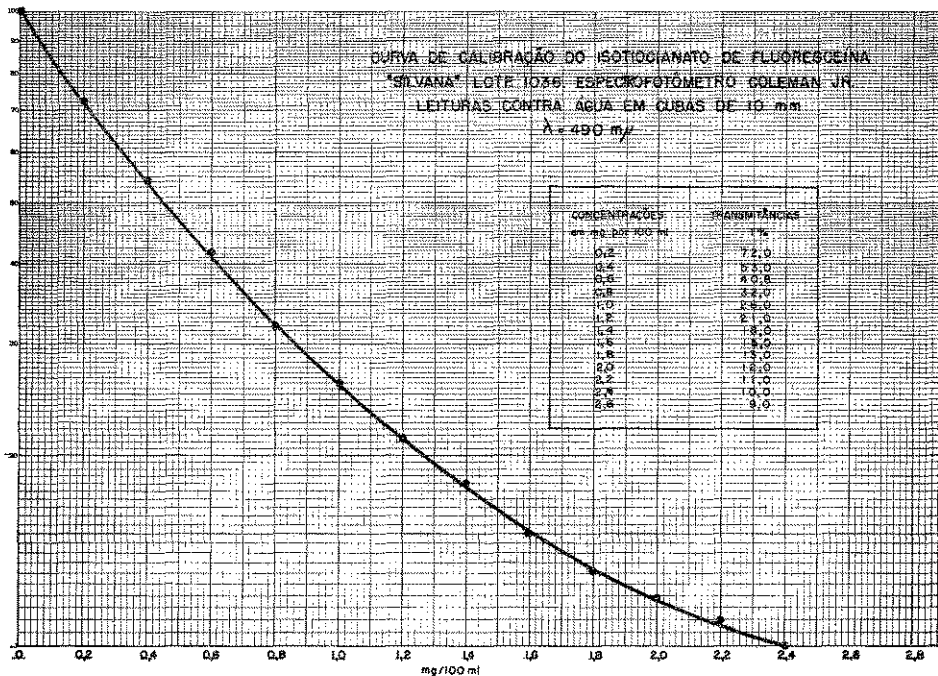


FIGURA 3

As dosagens nos conjugados foram feitas por leitura direta das transmitâncias de diluições adequadas, em solução salina tampoadada, alcalina.

E) DOSAGEM DAS PROTEÍNAS — As concentrações protéicas das soluções de globulinas, não marcadas ou já conjugadas ao iso-

destilada (a 1/50, por exemplo) e a 0,4 ml dessa diluição eram adicionados 2,0 ml do reativo cúprico e, após 10 minutos, 0,2 ml do reativo de Folin-Ciocalteu, fazendo-se as leituras em $660 m\mu$ em cubas de 12 mm.

F) CARACTERÍSTICAS DOS CONJUGADOS — Os resultados das dosagens num dos conju-

gados (*conjugado A*) utilizados no presente trabalho foram os seguintes:

Isotiocianato de fluoresceína	5,6 mg em 100 ml
Globulinas	1,0 g em 100 ml
Relação F/P	5,6 X 10 ⁻³

Determinação da atividade fluorescente inespecífica — Áreas com toxoplasmas, delimitadas sobre lâminas de microscopia, foram submetidas à ação de diluições crescentes de razão 2, do conjugado. Verificou-se que a atividade fluorescente inespecífica era intensa nos preparados correspondentes às primeiras diluições, sendo entretanto muito discreta a 1/16 e totalmente ausente de 1/32 em diante.

Atividade fluorescente específica — Fizeram-se reações, segundo a técnica descrita no parágrafo 3, empregando-se soro reagente, em concentração quatro vezes maior do que o título determinado na reação de Sabin-Feldman, isto é, em diluição correspondente ao penúltimo tubo positivo nessa reação. Foram utilizadas diluições crescentes do conjugado, a partir de 1/25 e na razão 2/3, a saber: 1/25 — 1/38 — 1/60 — 1/90 — 1/130 — 1/200 e 1/300. Resultaram fluorescências de média intensidade (2 + a 3 +) até à diluição de 1/90, de fraca intensidade nas diluições de 1/130 e 1/200 e negativa a 1/300.

O conjugado foi, então, utilizado na diluição de 1/80 nas reações.

Foi feita uma imuno-electroforese do conjugado, contra soro humano, observando-se apenas uma linha de precipitação, correspondente à gamaglobulina. À luz ultravioleta de uma lâmpada de Woods, essa linha era intensamente fluorescente, em contraste com a ausência das linhas de precipitação da mistura de soros hiperimunes usada como testemunha.

Um segundo conjugado (*conjugado B*), preparado a partir de um soro imune de coelho obtido pela injeção de gamaglobulina humana com adjuvante de Freund e com título aglutinante de 1/1 500 diante de hemácias Rh-positivas sensibilizadas, apresentou as características seguintes:

Isotiocianato de fluoresceína	7,5 mg em 100 ml
-------------------------------------	------------------

Globulinas	0,85 g em 100 ml
Relação F/P	8,5 x 10 ⁻³
Atividade inespecífica .	inferior a 1/10
Atividade específica ..	até 1/225

Este conjugado foi preparado por técnica semelhante àquela já descrita, apenas utilizando-se a concentração de 0,2 mg/ml de isotiocianato de fluoresceína no banho de diálise.

3) Técnica da reação

Retiram-se as lâminas do congelador, secam-se por alguns minutos à temperatura ambiente, sob ventilador. Pipetam-se as diluições dos soros, uma em cada quadradinho, em volumes aproximados de 0,01 ml. Cada conjunto de cinco quadradinhos destina-se a um soro diferente, nas diluições de 1/16 a 1/4 096 ou de 1/4 000 a 1/64 000. KELEN *et alii*³² (1962) mantém as lâminas por 30 minutos à temperatura ambiente, para que se processe a reação. Preferimos incubá-las a 37° C por uma hora, a fim de aumentar a sensibilidade da reação. Impede-se a dessecação, cobrindo-as com uma tampa de placa de Petri provida de papel de filtro umedecido com água. Para numerosas reações, preferimos caixa metálica provida de prateleiras plásticas móveis (conjunto Fanem para reações de fixação do complemento em placas planas). Terminada a incubação, escorre-se o excesso de líquido e lavam-se as lâminas, imergindo-as por períodos de 10 minutos em duas trocas de solução salina tamponada. Enxugam-se por pressão delicada, com papel de filtro ou papel absorvente. Em seguida, pipetam-se sobre cada área de reação volumes de cerca de 0,01 ml do conjugado, diluído em solução salina tamponada segundo o título. Incubam-se novamente as lâminas por 1 hora a 37° C em atmosfera úmida. Lavam-se por imersão em duas porções diferentes de salina tamponada por períodos de 5 minutos, enxugam-se com papel e montam-se, colocando uma lamínula de 18 x 18 mm sobre cada grupo de cinco quadradinhos, com uma gota de glicerina alcalina. Esta prepara-se adicionando a 9 partes de glicerina 1 parte de tampão alcalino, por exemplo, de carbonato de sódio — bicarbonato de sódio, 0,5 M; pH 8,7, aproximadamente. As lâminas são examinadas em microscopia de

fluorescência imediatamente após a montagem ou conservadas em geladeiras, ao abrigo da luz, para exame posterior, não perdendo a fluorescência mesmo após vários dias ou semanas.

Trabalhamos com microscópio Zeiss, binocular, com objetiva de imersão de 40 x, provida de diafragma; oculares de 10 x ou de 12,5 x; campo escuro, com condensador cardióide. A iluminação era fornecida por uma lâmpada HBO-200, filtro excitador BG12 de 3 mm e filtro barreira n.º 50 (Zeiss).

As reações positivas traduzem-se por fluorescência dos toxoplasmas, mais evidente na periferia dos parasitas, onde formam um limite brilhante, uniforme, verde-maçã, cuja intensidade vai decrescendo com o aumento progressivo das diluições do soro. Consideramos como título dos soros, as maiores diluições ainda capazes de determinar qualquer grau de fluorescência nos toxoplasmas. A transição entre reações positivas e negativas é bastante nítida, não havendo dificuldade na determinação do ponto de viragem. As reações negativas se evidenciam por total ausência de fluorescência dos toxoplasmas que aparecem com imagem muito tênue, ligeiramente esverdeada, contrastando mal com o fundo. Por vezes, entretanto, especialmente nas baixas diluições dos soros, encontra-se fluorescência dos toxoplasmas localizada exclusivamente na extremidade mais arredondada dos parasitas e nitidamente distinta da fluorescência específica que se dispõe sempre homogêneamente em tôda a periferia. Tal fluorescência zonal ou polar corresponde sempre a reações de Sabin-Feldman negativas, mesmo quando realizadas com soros não diluídos ou diluídos a 1/4.

Um detalhe técnico que facilita mais ainda a leitura das reações, tornando o ponto de viragem mais evidente, é o emprêgo de coloração de contraste pelo azul de Evans, como descrito por NICHOLS & McCOMB⁴⁶ (1962). Entretanto, em vez de tratar os preparados pelo conjugado e depois pelo azul de Evans, reunimos ambas as fases em uma única operação, acrescentando o azul à própria diluição do conjugado, para a concentração final de 1 mg%.

À luz ultravioleta a côr vermelha assumida pelo corante que impregna o corpo dos parasitas contrasta fortemente com a fluorescência periférica dos toxoplasmas.

III — RESULTADOS

Na apresentação dos resultados obtidos nas amostras examinadas, acrescentaremos quando indicado, a estimativa por intervalo que pode ser feita para o valor populacional, em termos dos limites de confiança 95% para a estatística em causa. Tais valores serão apresentados entre parênteses, com o símbolo LC-95.

I — REPRODUTIBILIDADE DAS REAÇÕES

Antes de tentarmos comparar os resultados das reações de Sabin-Feldman e de fluorescência, procuramos verificar os seus graus de reprodutibilidade. Para isso, incluímos nas reações de rotina soros previamente titulados e conservados congelados. Estes eram degelados, retirava-se uma alíquota de cada e o restante era novamente congelado -20°C. Após inativação, preparavam-se as diluições que eram submetidas a uma das reações ou a ambas.

a) *Reprodutibilidade da reação de Sabin-Feldman*

Muito se tem discutido e escrito sobre a variabilidade dos resultados da reação de Sabin-Feldman, por vezes considerados problemáticos, “freqüentemente irregulares e imprevisíveis (GOLDMAN⁴⁶, 1956)”. JACOBS & COOKS²⁶ (1954), por exemplo, demonstraram a influência perturbadora exercida por antígenos solúveis ocasionalmente presentes nos exsudatos peritoneais. Entretanto, estudos feitos por vários pesquisadores mostram que a reação é bastante reprodutível, desde que haja rigorosa padronização dos elementos participantes. RUBIN⁵⁰ (1958) verificou que os títulos, em duplicatas, coincidiam ou desviavam-se no máximo de uma diluição de razão 2. Importante contribuição para o esclarecimento do problema foi dada por VAN SOESTBERGEN *Apud*⁵⁸ (1956), VAN THIEL⁵⁸ (1958) e VAN SOESTBERGEN⁵⁷ (1962), que estabeleceram as relações matemáticas fundamentais da reação, permitindo, assim, o estudo acurado dos fatores interferentes nos resultados. A sensibilidade ao anticorpo, dos toxoplasmas que constituem a população de parasitas nos tubos de reação, se distribui segundo uma curva normal de freqüência. A relação entre quantidades de anticorpo representadas pelas diluições do soro e percentagens de toxoplasmas alterados, traduz-se

por uma reta, quando se lançam logaritmos de diluições contra probitos de percentagens de parasitas não corados. Estabelecidos esses fatos, foi possível aos pesquisadores citados verificar a grande reprodutibilidade da reação, quando alguns princípios fundamentais eram seguidos. Estão, entre estes, o emprêgo constante da mesma amostra de toxoplasma e da mesma linhagem de camundongos, assim como a utilização de "fator acessório" desprovido de atividade lítica inespecífica. Atribuem eles importância, para a boa reprodutibilidade dos resultados, à correção dos títulos por meio de cálculos em que são descontadas, das percentagens respectivas de parasitas corados e não corados, aquelas fra-

ções que decorrem de fatores inespecíficos intercorrentes. Assim por exemplo, nos toxoplasmas corados, há aqueles que escaparam à ação modificadora dos anticorpos por terem permanecido intracelulares durante o período de incubação, tornando-se extracelulares por ocasião da adição do azul de metileno ou das manipulações posteriores. Nos toxoplasmas não corados, há aqueles modificados por fatores lesivos outros que os anticorpos do sêro a testar, oriundos do exsudato peritoneal ou do sêro ativador. Em nossas reações não temos visto necessidade de tais correções. Quanto aos parasitas inespecificamente não alterados, não temos observado senão proporções ínfimas de toxoplasmas intracelulares nos ex-

QUADRO I

Títulos da reação de Sabin-Feldman realizada em duplicata, em 106 soros. Resultados expressos pelas potências de base 2 das reciprocas das diluições

Sêro n.º	Reações		Sêro n.º	Reações		Sêro n.º	Reações	
	1.ª	2.ª		1.ª	2.ª		1.ª	2.ª
1	10	8	37	8	8	73	8	8
2	8	8	38	8	8	74	8	8
3	13	13	39	8	8	75	8	10
4	8	6	40	8	8	76	8	8
5	4	4	41	8	6	77	8	10
6	8	10	42	8	8	78	8	10
7	10	8	43	8	6	79	8	8
8	6	6	44	8	8	80	8	8
9	8	10	45	8	8	81	8	10
10	8	8	46	8	10	82	8	8
11	12	10	47	10	10	83	8	8
12	12	12	48	8	8	84	8	8
13	13	12	49	10	8	85	8	8
14	10	10	50	12	10	86	8	8
15	8	8	51	10	10	87	8	8
16	8	8	52	10	8	88	8	8
17	12	12	53	10	8	89	8	8
18	10	10	54	10	10	90	8	8
19	8	6	55	8	10	91	10	10
20	12	12	56	8	6	92	10	10
21	8	10	57	10	10	93	10	10
22	12	12	58	13	13	94	10	10
23	8	8	59	8	10	95	8	8
24	8	10	60	8	8	96	8	8
25	12	12	61	8	8	97	10	10
26	8	6	62	8	8	98	8	8
27	6	8	63	8	8	99	8	8
28	12	12	64	8	6	100	8	8
29	8	10	65	8	10	101	8	8
30	10	10	66	8	8	102	8	10
31	8	10	67	8	10	103	8	8
32	6	6	68	6	6	104	10	10
33	12	10	69	8	8	105	10	10
34	8	6	70	8	10	106	10	8
35	8	8	71	8	8			
36	8	8	72	8	8			

sudatos peritoneais utilizados nas reações. Quanto aos toxoplasmas inespecificamente alterados, não verificamos sua presença nos tubos testemunhas em proporções que possam interferir nos resultados. Atribuimos esse fato ao emprêgo de exsudatos peritoneais obtidos após somente cerca de 48 horas de inoculação de número relativamente elevado de parasitas. Além disso, os soros usados como ativadores sempre acusaram percentagens desprezíveis, ou mesmo nulas, de modificação inespecífica.

Submetemos 106 soros, de títulos variáveis de 1/16 a 1/8 000, a titulações em duplicata, realizadas a partir de diferentes alíquotas dos soros e em dias também diversos. Os títulos foram idênticos para as duplicatas de cada soro em 70 dêles, correspondentes a 66% (LC-95: 56,6 e 74,4%) do total de soros e diferiram de uma diluição, de razão 2 ou 4, em 36, correspondentes a 34%.

Esses resultados estão reunidos no quadro I, no qual, para comodidade de registro, os títulos dos soros estão expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições. Assim, o número 4 indica a diluição de 1/16 ou 1/2⁴; o número 6 indica 1/64, 8 corresponde a 1/256, 10 a 1/1 024, 12 a 1/4 096 e 13 a 1/8 000.

Mesmo quando os soros foram submetidos a sucessivas titulações, em dias diferentes, com diferentes partidas de exsudato peritoneal e de fator acessório, os resultados mostraram-se muito constantes. O quadro II reúne alguns desses dados.

É necessário assinalar que vários meses decorreram entre algumas dessas titulações, mantendo-se os soros congelados a -20°C. Temos observado que, em tais condições, os títulos dos soros não se alteram, mesmo por longos períodos. Assim, um soro A, titulado em dezembro de 1963 e em dezembro de 1964, deu o título de 1/4 096 em ambas as vezes. Um soro B deu os títulos de 1/256 e 1/1 024.

QUADRO II

Títulos da reação de Sabin-Feldman em sucessivas determinações, expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições

Soros n.º	Títulos em reações sucessivas					
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª
18	10	10	8	10	—	—
12	12	12	12	—	—	—
75	10	8	10	8	—	—
98	8	8	10	8	—	—
99	8	10	10	8	—	—
19	8	6	8	6	6	6
24	8	10	8	10	—	—
45	8	8	8	8	8	8
15	8	8	8	8	8	8

b) *Reprodutividade da reação de imunofluorescência indireta*

Oitenta e quatro soros, com títulos entre 1/16 e 1/32 000, foram submetidos a titulações em duplicata e, em 30 dêles, a titulações em triplicata. Tais repetições foram feitas em diferentes dias, a partir de novas alíquotas dos soros. Os resultados obtidos estão reunidos no quadro III. Em 45 dos 84 soros, isto é, em 53,6% (LC-95: 43,0 e 63,8%) do total, os resultados das duplicatas foram idênticos. Nos 39 soros restantes, isto é, em 46,4%, houve variação de apenas uma diluição, com títulos mais elevados, na repetição, em 24 soros e mais baixos, em 15. Este predomínio de títulos mais elevados na segunda determinação não é estatisticamente significativo, ao nível de 5%.

Nos 30 soros titulados em triplicatas, obtivemos resultados idênticos, nas três reações, em 15 soros, ou seja em 50% dos casos (LC-95: 33,1 e 66,9%). Nos 15 soros restantes houve diferenças de apenas uma diluição de razão 2 ou 4, entre os três valores das triplicatas.

Alguns desses soros foram submetidos a maior número de reações, todas elas realizadas em dias diferentes, por vezes com inter-

QUADRO III

Títulos da reação de imunofluorescência realizada em duplicata em 84 soros e em triplicata, em 30 destes. Resultados expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições.

Soros n.º	Reações			Soros n.º	Reações			Soros n.º	Reações		
	1ª	2ª	3ª		1ª	2ª	3ª		1ª	2ª	3ª
66	8	8	—	94	10	8	—	125	8	8	—
67	8	10	8	95	8	8	—	126	10	10	—
68	8	8	—	96	8	8	—	127	8	10	—
69	8	8	—	97	10	12	—	128	8	6	—
70	10	8	—	98	8	10	10	129	12	12	—
71	8	8	8	99	8	8	8	130	14	15	15
72	8	8	8	100	8	8	—	131	8	10	8
73	8	8	—	101	8	6	8	132	10	10	—
74	8	10	—	103	8	10	—	133	4	4	—
75	10	10	10	104	10	10	10	134	6	6	—
76	8	8	8	107	13	14	—	135	8	10	—
77	10	12	—	108	8	10	—	136	8	10	—
78	10	12	—	109	10	10	10	137	12	12	—
79	8	10	—	110	8	8	—	138	8	8	—
80	8	10	10	111	12	12	12	139	8	8	—
81	10	12	—	112	10	10	10	140	8	8	—
82	8	8	8	113	15	15	—	141	8	8	8
83	8	10	—	114	12	12	—	142	6	6	—
84	8	8	—	115	10	12	12	143	10	8	8
85	8	8	—	116	10	8	8	144	10	10	—
86	8	10	—	117	8	10	—	145	8	10	—
87	8	8	—	118	10	8	10	146	10	8	10
88	8	10	—	119	10	10	—	147	8	8	—
89	8	10	—	120	10	8	10	148	12	10	—
90	8	8	8	121	12	10	10	149	10	8	—
91	10	10	10	122	10	10	—	150	10	8	8
92	10	8	10	123	8	8	8	151	12	12	—
93	10	10	—	124	8	8	8	152	10	8	—

valos de semanas ou meses. Não obtivemos diferenças de mais de uma diluição para os títulos de um mesmo soro, mesmo quando as sucessivas reações eram feitas com diferentes partidas de antígeno. O quadro IV mostra alguns desses resultados.

QUADRO IV

Títulos da reação de imunofluorescência em sucessivas determinações, expressos pelas potências de base 2 das recíprocas das diluições

Soros n.º	Títulos em reações sucessivas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
72	8	10	8	10	—
75	10	10	10	10	—
82	8	8	8	8	—
98	8	10	10	8	—
99	8	8	8	8	—
108	8	10	10	10	—
141	8	8	8	8	8

Outro aspecto que procuramos verificar foi a influência do emprêgo de diferentes conjugados sobre os títulos. Dez soros foram diluídos adequadamente segundo os títulos obtidos na reação de Sabin-Feldman e, com as mesmas diluições de cada, fizeram-se três reações de imunofluorescência, empregando-se em cada um conjugado diferente.

Conjugado A — descrito na pág. 12

Conjugado B — descrito na pág. 12

Conjugado C — da marca "Sylvana, lote 042864, A

que nos foi gentilmente enviado pelo Dr. W. E. Deacon, do C.D.C., Atlanta, U.S.A.

O quadro V mostra que as flutuações eventuais dos títulos mantiveram-se dentro dos limites de variação encontrados ao se estudar a reprodutibilidade da reação.

QUADRO V

Títulos de 10 soros na reação de Sabin-Feldman e em reações de imunofluorescência, com diferentes conjugados. Resultados expressos em potências de base 2 das recíprocas das diluições

Soros	Reação de Sabin-Feldman	Reações de imunofluorescência		
		A	B	C
a	12	12	12	12
b	8	8	8	10
c	14	14	14	14
d	13	13	13	14
e	10	10	10	10
f	6	6	6	6
g	10	10	10	10
h	12	12	12	12
i	13	13	13	13
j	10	12	10	12

2 — RESULTADOS COMPARATIVOS DAS REAÇÕES DE SABIN-FELDMAN E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Dos 1000 soros estudados, 225 foram negativos nas duas reações, enquanto 768 foram positivos em ambas. Somente 7 soros mostraram resultados diversos, negativos na reação de Sabin-Feldman e positivos na reação de imunofluorescência, reagindo entretanto apenas a 1/16. Não houve caso algum de soro realmente positivo na reação de Sabin-Feldman que tivesse sido negativo na reação de fluorescência. O quadro VI mostra tais resultados.

QUADRO VI

Soros distribuídos segundo os resultados qualitativos das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência

Reação de Sabin-Feldman	Reação de imunofluorescência		Totais
	Reagentes	Não reagentes	
Reagentes	768	0	768
Não reagentes	7	225	232
Totais	775	225	1000

Quanto aos títulos obtidos, verificou-se grande concordância de resultados entre as duas reações. Distribuindo os soros segundo os tí-

tulos em uma e outra reação, construímos o quadro VII, em que já se delineia tal concordância. De fato, a soma das caselas da diagonal principal desse quadro, com exclusão da casela superior esquerda onde figuram os 225 soros não reagentes, mostra que obtivemos títulos idênticos em 407 dos 775 soros reagentes, ou seja, em 52,5% (LC-95: 49 e 56%). Evidentemente, na avaliação da concordância dos resultados não levaremos em conta esses 225 soros não reagentes, pois se assim fizéssemos, o grau de concordância ficaria na dependência do percentual de soros reagentes na amostra estudada. Tal percentual, por sua vez, poderia ser expressão, não apenas da prevalência da infecção na população considerada, como também da sensibilidade das reações utilizadas.

Nos demais soros reagentes, em número de 368, houve diferenças de títulos, de apenas uma diluição em 350 e de duas diluições em 18. Não se verificaram discordâncias maiores.


Assim, dos 775 soros reagentes, temos 757, isto é, 97,7% (LC-95: 96,1 e 98,8%) com títulos iguais ou diferindo de somente uma diluição.

No quadro VIII, estudamos as discordâncias, distribuindo os 368 soros em que elas ocorreram, segundo o grau da diferença e segundo a reação em que o título foi mais elevado. Verificamos que, em 308 soros (83,7% dos casos reagentes em que não houve identidade de títulos) os resultados foram mais elevados na reação de imunofluorescência e, somente em 60 (16,3%), eles foram mais elevados na reação de Sabin-Feldman. Evidentemente, se não houvesse diferença de sensibilidade entre as duas reações, dever-se-ia esperar que nesses 368 soros o título mais elevado fosse encontrado em uma ou outra das reações o mesmo número de vezes, ou seja, em 184 vezes (50%) em cada uma. A diferença entre o resultado observado e essa expectativa tem probabilidade de ocorrência casual menor do que 1/1000, o que leva à rejeição da hipótese de igualdade da sensibilidade das duas reações e à aceitação da hipótese de ser mais sensível a reação de imunofluorescência.

QUADRO VII

Soros distribuídos segundo os títulos das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência.

Títulos da reação de Sabin-Feldman	Títulos da reação de imunofluorescência										
	Não reagentes	1/16	1/64	1/256	1/1 024	1/4 096	1/8 000	1/16 000	1/32 000	1/64 000	Totais
Não reagentes	225	7									232
1/16		4	8	7							19
1/64		1	32	42	8						83
1/256		1	5	123	92	1					222
1/1 024				33	175	110					318
1/4 096					4	34	14				52
1/8 000						4	19	8			31
1/16 000						1	3	12	6		22
1/32 000								8	8	5	21
1/64 000											0
Totais	225	13	45	205	279	150	36	28	14	5	1 000

 Caselas correspondentes a soros reagentes com títulos idênticos em ambas as reações

QUADRO VIII

Soros reagentes com títulos diferentes nas duas reações, distribuídos segundo a natureza e a amplitude da discordância

Diferença entre os títulos	Títulos mais altos		TOTAL
	na reação de imunofluorescência	na reação de Sabin-Feldman	
de uma diluição	292	58	350
de duas diluições	16	2	18
TOTAL	308	60	368

3 — COMPORTAMENTO ANÔMALO DE ALGUNS SOROS

Durante a elaboração deste trabalho, nossa atenção foi despertada para outro tipo de discordância entre os resultados das reações de imunofluorescência e de Sabin-Feldman. Raros soros reagentes nesta última, mostraram-se não reagentes na imunofluorescência. Entretanto, ao se repetirem as reações em alíquotas dos soros conservados congelados, para confirmação desses resultados, ambas eram negativas. Habitados com a estabilidade dos títulos em soros mantidos a -20°C, atribuímos inicialmente tais discordâncias a equívocos. Mas, a repetição da ocorrência do fenômeno, sua confirmação em segunda amostra de sangue de um mesmo paciente, colhi-

da dias após a primeira, e a constatação eventual da queda progressiva dos títulos, até total negatificação, em duas oportunidades, vieram afastar a hipótese de erros de técnica.

Tal comportamento anômalo foi verificado somente em 12 soros (de 11 pacientes), durante o presente estudo. Caracterizou-se pela discordância entre as reações, com positividade apenas na prova de Sabin-Feldman, aliada à labilidade dessa positividade, que tende a se anular em prazos relativamente curtos.

Embora não tenha sido possível observação uniforme de tais soros, pela dificuldade de execução da reação de Sabin-Feldman na frequência e regularidade desejadas, procuramos reunir os dados de que dispomos a respeito dos mesmos. O quadro IX traz os

QUADRO IX

Resultados de titulações sucessivas pela reação de Sabin-Feldman em soros constantemente negativos na reação de imunofluorescência

Soros	Resultados das reações					
	1ª reação	Dias *	2ª reação	Dias *	3ª reação	Dias *
A	1/256	4	negativa	10	—	—
B	1/1 024	0	negativa	2	negativa	7
C	1/1 024	6	negativa	8	—	—
D	1/64	2	negativa	4	—	—
E	1/256	1	negativa	3	negativa	8
F	1/256	3	negativa	8	—	—
G	1/16	4	negativa	11	—	—
H	1/256	0	negativa **	2	—	—
I***	1/1 024	1	negativa	12	—	—
J***	1/64	6	negativa	8	—	—
K	1/64	5	1/16	12	negativa	14
L	1/64	0	1/16	2	negativa **	7

* — Dias entre a colheita do sangue e a execução da reação.

** — Soros examinados a partir de 1/1.

*** — Soros do mesmo paciente.

resultados das reações de Sabin-Feldman feitas nesses 12 soros, bem como a época em que foram realizadas, a contar do dia da colheita dos sangues. Os períodos entre a colheita e a feitura da primeira reação variaram de 0 a 6 dias. Dos 12 soros então positivos, somente 2 ainda foram reagentes em segunda prova, feita com 12 e 2 dias respectivamente, depois da colheita de cada soro. Em ambos os casos os títulos foram menores do que os inicialmente observados. Examinados de novo, com 14 e 7 dias respectivamente, a contar da colheita, foram negativos, um deles mesmo a partir de 1/1. Os outros 10 soros, positivos na primeira reação, foram negativos já no segundo exame. Desta maneira, o maior número de dias, entre a colheita dos sangues e a feitura das reações, em que se observou esse tipo de positividade ainda presente, foi de 12 dias, isto mesmo uma única vez. No restante dos soros tal prazo não ultrapassou 6 dias.

Chamou-nos a atenção o fato de 10 dos 11 pacientes referidos serem crianças, de idades variáveis de alguns meses a cerca de 12 anos, havendo, entre estes, somente 1 adulto, com 20 anos de idade. Ora, provindo o nosso material de estudo tanto de adultos como de crianças, e tendo-se verificado mesmo proporção praticamente equivalente desses dois grupos etários nos 225 soros não reagentes, por nós encontrados (47% de adultos e 53% de crianças), torna-se pouco provável que a nítida prevalência de soros de crianças naqueles de comportamento anômalo seja decorrência de mero acaso.

Ainda não pudemos fazer observações sistematizadas sobre o fenômeno por nós verificado. Entretanto, depois de notados os fatos referidos e tendo concentrado nossa atenção nesse particular, tivemos ensejo de constatar, em diferentes ocasiões, a mesma anomalia de comportamento nos soros de cinco crianças normais, com idades de 7 a 12 anos. As reações foram feitas no mesmo dia da colheita dos sangues, em alíquotas dos soros inativados por 30 minutos a 56°C. O restante dos soros não inativados foi guardado a -20°C. Quarenta e oito horas depois, aproximadamente, as reações foram repetidas em duplicatas, uma com soro não inativado e outra com soro inativado. Todas estas repetições foram negativas, observando-se mesmo que as percentagens de toxoplasmas não corados, nos diversos tubos da reação de Sabin-Feldman, foram nulas ou muito diminutas

desde as mais baixas diluições dos soros. Reunimos no quadro X as reações efetuadas no dia da colheita dos sangues.

QUADRO X
Resultado das reações para toxoplasmose efetuadas no dia da colheita dos sangues

Soros	Reação de Sabin-Feldman	Reação de imunofluorescência
M	1/64	negativa
N	1/1 024	negativa
O	1/1 024	negativa
P	1/1 024	negativa
Q	1/256	negativa

Obs.: Foram consideradas reações negativas aquelas não reagentes desde a diluição de 1/16.

Em alguns soros, não reagentes na imunofluorescência, de crianças e de adultos, submetidos às reações logo após a colheita dos sangues, não se observou o fenômeno descrito.

IV — COMENTÁRIOS

Diante dos resultados apresentados, quer nos parecer que a reação de imunofluorescência indireta deva merecer lugar de relevo entre os métodos sorológicos para o estudo da toxoplasmose. Com resultados em geral superponíveis aos da reação de Sabin-Feldman, ela terá o mesmo valor diagnóstico do que esta, a par de grande facilidade de execução.

É preciso salientar, ainda uma vez, que a realização da reação de Sabin-Feldman está limitada a laboratórios especializados, não sendo possível, em geral, aos laboratórios clínicos comuns conseguir as condições necessárias para sua feitura. Isto porque o trabalho com toxoplasmas vivos e infetantes exige biotério e ambiente isolados para as manipulações, bem como pessoal técnico especializado. Não são mesmo infreqüentes casos de contaminação acidental em laboratório. Também constitui dificuldade, nem sempre de fácil solução, a obtenção de soro humano aceitável como "fator acessório", nas

quantidades exigidas para uma rotina razoável. Em contraposição, a reação de imunofluorescência poderá estar ao alcance dos laboratórios clínicos, posto que sua realização é extremamente simples. Não está mesmo fora de possibilidades o eventual fornecimento, por centros especializados, de suspensões de toxoplasmas para antígenos, libertando os laboratórios clínicos de inoculações ocasionais para o preparo das lâminas destinadas à reação. Quanto à obtenção do conjugado antiglobulina humana, já é de âmbito comercial, notando-se que êsse reativo é utilizável igualmente em várias outras reações sorológicas. A instalação de equipamento para microscopia fluorescente está dentro das possibilidades econômicas de laboratórios comuns e apresenta, desde já, grande interesse pela aplicação a vários métodos sorológicos e bacteriológicos extremamente rápidos, sensíveis e específicos.

Embora predomine atualmente na literatura médica o conceito de que a reação de Sabin-Feldman é a reação padrão para a sorologia da toxoplasmose, não apenas pela grande sensibilidade como também pela especificidade de seus resultados, há opiniões ainda discordantes de alguns autores que põem em dúvida especialmente o significado das reações de baixos títulos. Já nos referimos a isso na introdução deste trabalho. Não é nossa finalidade estudar aqui tal problema, desde que a literatura a respeito é bastante rica. Queremos apenas lembrar que um dos argumentos lançados em apoio de tais dúvidas é a não confirmação de resultados da reação de Sabin-Feldman por outros métodos sorológicos. Colocam-se, entre os que assim pensam, KELEN³² *et alii* (1962), justamente por terem verificado sensível discordância entre os resultados das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, mormente quando aquela acusava títulos inferiores a 1/1 024. No entanto, nossos resultados mostram concordância das duas reações em quaisquer níveis de títulos. Provavelmente isto traduz maior sensibilidade da reação de imunofluorescência em nossas mãos, decorrente do emprêgo de conjugados antiglobulina com melhores características, bem como de condições de reação mais adequadas para a interação de antígenos e anticorpos. O argumento de Kelen *et alii* parece estar assim infirmado. A simples concordância entre os resultados de reações de fundamentos aparentemente tão diversos não

constituirá, por si só, garantia de especificidade. Entretanto, a demonstração da especificidade dos resultados de qualquer uma delas aplicar-se-á imediatamente à outra. Recentes pesquisas de FULTON & VOLLER¹⁴ (1964) documentam, pela absorção de soros com antígenos diversos, o valor específico de resultados da reação de imunofluorescência indireta para a toxoplasmose, ainda quando êstes revelam baixos títulos.

Nos casos de comportamento anômalo, descritos em nosso trabalho, poderemos estar diante de anticorpos específicos lábeis, não evidenciáveis na reação de imunofluorescência, talvez por não se tratar de globulinas capazes de reagir com os conjugados utilizados. Mas, a verificação de discordâncias apenas em soros não reagentes na imunofluorescência, desde que a instabilidade de títulos não foi observada em soros que reagiram nas duas provas, leva-nos a suspeitar da existência, em tais soros anômalos, de mecanismo modificador de toxoplasmas diverso daquele intervindo no comum das reações. A Atividade modificadora mediada habitualmente por anticorpos específicos poderia ser desencadeada por elementos outros, talvez relacionados com mecanismos inespecíficos de defesa.

É interessante notar que STADTSBAEDER *et alii*³³ (1964) também ficaram impressionados com a discordância marcante entre resultados negativos da reação de imunofluorescência indireta e reações positivas na prova de Sabin-Feldman, em dois soros, em contraposição ao estreito paralelismo de resultados nos 70 soros reagentes restantes, do grupo de 500 examinados. A divergência era mais chocante porque ocorria também com a reação de fixação do complemento, igualmente negativa, embora tivesse sido sempre positiva em soros com títulos superiores a 1/1 000 na reação de Sabin-Feldman, como encontrado, aliás, nesses dois soros. Stadtsbaeder *et alii* limitaram-se a registrar o fato.

Não encontramos qualquer referência na literatura quanto a diferenças de comportamento de títulos, na reação de Sabin-Feldman, de soros guardados congelados, como por nós observado. Vários pesquisadores reconhecem a existência em soros ditos normais, de fatores modificadores de toxoplasmas, diversos dos anticorpos termoestáveis. Assim, WESTPHAL & MÜHLPFORDT⁶⁰ (1950) encontraram em alta percentagem de soros normais, não inativados, atividade modificado-

ra de toxoplasmas que tendia a aumentar de intensidade com o envelhecimento dos soros, mantidos estéreis à temperatura ambiente por alguns dias. Tal atividade, atribuída à “estrutura coloidal dos soros” (também por eles denominada “Dispersitätsgrad des Serum”), era nitidamente termolábil, desaparecendo inteiramente pela inativação a 56° C. Além disso, era evidenciável somente em soros não diluídos.

JETTMAR²⁸ (1954) descreveu uma “propriedade hostil para toxoplasmas (*Toxoplasmafeindlicher Qualität*),” presente em soros normais, capaz de modificar a coloração dos parasitas. Encontrou títulos de até 1/64 para essa atividade, que se caracterizava tanto pela termolabilidade, inativável em 15 minutos, a 56° C, como pela estabilidade, a 4° C, sendo perfeitamente conservada em soros mantidos em geladeira.

GRÖNROOS²⁴ (1955) retomou as experiências de Jettmar e demonstrou que essa atividade hostil está relacionada, ao menos em parte, com a properdina, inativável a 56° C ou removível pelo “Zimosan”.

Nossas observações parecem orientar-se para um fenômeno totalmente diverso, desde que a atividade modificadora por nós verificada não tem a termolabilidade referida pelos pesquisadores citados e não se conserva em soros congelados a -20°C como acontece para o fator acessório, que Grönroos também identifica, ao menos parcialmente, com a properdina.

Parece-nos, portanto, que ao menos em alguns soros humanos há uma atividade modificadora de toxoplasmas, nas condições da reação de Sabin-Feldman, termorresistente ao menos em parte, em geral muito lábil em soros congelados, desaparecendo dos mesmos em períodos variáveis, provavelmente no mais das vezes em menos de 48 horas, mas podendo permanecer nesses soros excepcionalmente por uma semana ou mesmo mais e que se distingue da atividade modificadora habitualmente encontrada nos soros reagentes não apenas pela labilidade, mas também pela não reatividade na reação de imunofluorescência. Serão necessárias investigações cuidadosas para melhor caracterização do fenômeno; os dados disponíveis permitem apenas afirmar a sua existência e entrever alguns aspectos curiosos como, por exemplo, a presumível maior frequência em soros de crianças.

V — RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho procuramos estudar comparativamente os resultados das reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman em 1 000 soros humanos, bom como expor em minúcias as técnicas utilizadas.

Até hoje a reação de Sabin-Feldman tem sido considerada por muitos como reação padrão para a pesquisa de anticorpos antitoxoplasma, em vista da alta sensibilidade e especificidade de seus resultados. Entretanto, é de execução difícil, o que limita sua divulgação como método sorológico de rotina. As técnicas de realização mais simples, aplicáveis à sorologia da toxoplasmose, como a fixação do complemento e a hemaglutinação, ainda não apresentam níveis de sensibilidade ou de reprodutibilidade que recomendem seu uso, a não ser como complemento da reação de Sabin-Feldman.

A técnica de imunofluorescência indireta, pela facilidade de execução e sensibilidade, surge como nova alternativa no diagnóstico da toxoplasmose.

Na parte I deste trabalho, fizemos revisão da literatura sobre aplicações das técnicas de imunofluorescência ao estudo da toxoplasmose, referindo inclusive nota prévia do autor que, comparando os resultados das reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman, em 140 soros, encontrou grande concordância nas duas provas quanto a soros reagentes e não reagentes.

Na parte II, referimos o material de estudo — 1 000 soros humanos não selecionados — e os métodos utilizados, discutindo ao mesmo tempo os motivos da escolha de alguns deles. Descrevemos minuciosamente as técnicas das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta. Para esta última, estudamos o preparo dos toxoplasmas e das lâminas usadas na reação e, em seguida, analisamos o conjugado antiglobulina humana-isotiocianato de fluoresceína quanto a seus constituintes, soro imune e fluorocromo, e quanto à técnica de preparo. Para a marcação das globulinas imunes preferimos o método da diálise, a fim de se conseguir marcação homogênea das moléculas de anticorpo, procurando afastar colorações inespecíficas, em grande parte decorrentes de marcação excessiva. Descrevemos o estudo das características do conjugado quanto à intensidade da marcação, indicada pelas proporções res-

pectivas de proteínas e de fluorocromo, e quanto às atividades corantes específica e inespecífica.

Na parte III, estudamos a reprodutibilidade da reação de imunofluorescência em 84 soros para, em seguida, compararmos os resultados das duas reações nos 1 000 soros incluídos no trabalho. Houve concordância nos resultados qualitativos, havendo 786 soros reagentes em ambas as provas e 225 não reagentes também em ambas. Nenhum soro negativo na imunofluorescência foi positivo na prova do corante, de Sabin-Feldman. Somente 7 soros, negativos nesta, reagiram na prova da imunofluorescência, mas com títulos de apenas 1/16. Quanto aos resultados quantitativos, houve concordância de títulos, dentro da variação de uma diluição de razão 2 ou 4, em 97,7% dos soros reagentes, os 2,3% restantes mostrando diferenças de duas diluições. Não houve discordância maior do que esta. Em 52,5% dos soros reagentes houve mesmo identidade de títulos. A maioria dos soros com resultados diferentes em ambas as reações apresentou títulos mais elevados na prova de imunofluorescência, (83,7%) e somente nos 16,3% restantes eram mais altos os títulos na reação de Sabin-Feldman. Isto indica, com significância estatística, maior sensibilidade, ainda que ligeira, da reação de imunofluorescência indireta sobre a reação de Sabin-Feldman.

A execução paralela das duas reações permitiu evidenciar, em raros soros, atividade modificadora de toxoplasmas na reação de Sabin-Feldman, com características diversas daquelas já descritas na literatura. Além de corresponder a reações de fluorescência totalmente negativas, tal atividade mostrou-se pouco estável, tendendo rapidamente para a negatividade.

Na parte IV, tecemos considerações sobre o emprêgo da reação de imunofluorescência na rotina sorológica da toxoplasmose e analisamos de maneira sumária o comportamento anômalo de alguns soros, anteriormente referido.

Concluimos que:

1) O estudo comparativo entre as reações da Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta fornece resultados semelhantes, com títulos coincidentes ou apenas pouco mais ele-

vados nesta última. A reação de imunofluorescência pode substituir a reação de Sabin-Feldman e com nítidas vantagens quanto à exequibilidade.

2) A discordância flagrante entre os resultados das duas reações observada em apenas 12 dos 1 000 soros estudados não vem modificar a conclusão acima, não somente pela pequena freqüência com que ocorreu, mas principalmente pelas características anômalas apresentadas. Estas sugerem a existência de atividade modificadora de toxoplasmas de natureza diversa daquela associada aos anticorpos habitualmente encontrados que, além de reagirem de maneira idêntica nas duas reações, mostram-se estáveis em soros congelados.

RESUMO

Compararam-se as reações de imunofluorescência indireta e de Sabin-Feldman para a toxoplasmose, em 1 000 soros humanos. Encontrou-se estreita concordância quanto a reatividade ou não reatividade dos soros. Quanto a títulos, em 97,7% dos 775 soros reagentes verificou-se concordância ou diferenças de somente uma diluição. Nos demais 2,3% de soros reagentes, estas diferenças não excederam de duas diluições. Em raros soros, entretanto, observaram-se divergências entre os resultados, negativos na reação de imunofluorescência e reagentes na de Sabin-Feldman. Porém tal reatividade apresentou-se instável, tendendo a desaparecer rapidamente desses soros, embora mantidos congelados a -20°C , em contraste com a estabilidade de títulos observada habitualmente nos soros reagentes.

Sugere-se a presença de fator modificador de citoplasma, de natureza inespecífica, para os soros de reatividade instável, diverso do fator específico presente no comum dos soros reagentes.

Agradecimentos — Ao Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, a confiança em nós depositada, propiciando-nos ambiente de estudo e pesquisas no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, bem como o estímulo e auxílio constantes na elaboração deste trabalho; ao Prof. Dr. Walter Leser, a assistência na análise dos dados obtidos; aos Drs. Maria P. Deane e José Lopes Netto, as críticas e sugestões apresentadas; ao Sr. Waldomiro Siquei-

CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:1-26, 1964.

ra Jr., a confecção de gráficos e tabelas; aos colegas e técnicos do I.M.T., o estímulo, amizade e auxílio que nos prestaram e à Srta. Hermínia Muzanek, o cuidado e o interesse demonstrados na datilografia deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLDECH, V. & JIRA, J. — Bemerkungen zur Methodik und Auswertung der Komplexbindungsreaktion mit den Toxoplasmaantigenen. Z. Tropenmed. Parasit. 12:385-409, 1961.
2. CAMARGO, M. E. — Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 6:117-118, 1964
3. CAMARGO, M. E. — Preparation of microscopical slides to simplify immunofluorescence serological titrations. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 7:39-40, 1965.
4. CATHIE, J. A. B. — An appraisal of the diagnostic value of the serological tests for toxoplasmosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 51:104-110, 1957.
5. CHADWICK, C. S.; Mc ENTEGART, M. G. & NAIRN, R. C. — Fluorescent protein tracers: a simple alternative to fluorescein. Lancet 1:412-414, 1958.
6. CLARK, H. F. & SHEPARD, C. C. — A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. Virology 20:642-644, 1963.
7. COONS, A. H.; CREECH, H. J. & JONES, R. N. — Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47:200-202, 1941
8. COONS, A. H. & KAPLAN, M. H. — Localization of antigens in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 91:1-13, 1950.
9. CURTAIN, C. C. — Electrophoresis of fluorescent antibody. Nature, 182:1305-1306, 1958.
10. DALLENBACH, F. & PIEKARSKI, G. — Über der Antikörper (Methode nach COONC). Vir-Gewebe mit Hilfe markierter fluoreszierender Antikörper (Methode nach COONS). Virchows Arch. Path. Anat. 333:607-618, 1960.
11. DESMONTS, G. — Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Path. et Biol. 8:109-125, 1960.
12. EMMART, E. W. — Observations on the absorption spectra of fluorescein, fluorescein derivatives and conjugates. Arch. Biochem. 73:1-8, 1958.
13. FROMMHAGEN, L. H. & SPENDLOVE, R. S. — The staining properties of human serum proteins conjugated with purified fluorescein isothiocyanate. J. Immun. 89:124-131, 1962.
14. FULTON, J. D. & VOLLER, A. — Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection of specific Toxoplasma antibodies. Brit. Med. J. 2:1173-1175, 1964.
15. GARIN, J. P. & AMBROISE-THOMAS, P. — Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (technique indirecte). Presse Méd. 71:2485-2488, 1963.
16. GOLDMAN, M. — Observations on some problems encountered in the routine performance of the dye test for toxoplasmosis. J. Clin. Path. 9:55-58, 1956.
17. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. I. The reaction in smears of peritoneal exsudate. J. Exp. Med. 105:549-556, 1957.
18. GOLDMAN, M. — Staining *Toxoplasma gondii* with fluorescein labelled antibody. I. The new serologic test for antibodies to Toxoplasma based upon inhibition of specific staining. J. Exp. Med. 105:557-573, 1957.
19. GOLDMAN, M. & CARVER, R. K. — Microfluorimetry of cells stained with fluorescent antibody. Exp. Cell. Res. 23:265-280, 1961.
20. GOLDMAN, M.; GORDON, M. A. & CARVER, R. K. — Comparison of titers of dye and fluorescence-inhibition tests in the serologic diagnosis of toxoplasmosis. Amer. J. Clin. Path. 37:541-550, 1962.
21. GOLDSTEIN, G.; SLIZYS, J. & CHASE, M. W. — Studies on fluorescent antibody staining. I. Non-specific fluorescence with fluorescein coupled sheep antirabbit globulins. J. Exp. Med. 114:89-110, 1961.
22. GOLDWASSER, R. A. & SHEPARD, C. C. — Staining complement and modifications of fluorescent antibody procedures. J. Immunol. 80:122-131, 1958.
23. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-766, 1949.
24. GRÖNROOS, P. — The action of properdin on *Toxoplasma gondii*. Ann. Med. Exp. Fenn. 33:310-315, 1955.
25. HULDT, G. — The dye test and complement fixation test in toxoplasmosis: a comparative investigation. Acta path. microbiol. Scand. 43:141-156, 1958.
26. JACOBS, L. & COOKS, K. — Variations in the dye test for toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. 3:860-867, 1954.
27. JACOBS, L. & LUNDE, M. N. — A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasit. 43:308-314, 1957.
28. JETTMAR, H. M. — Zum Nachweis toxoplasmafeindlicher Qualitäten im Menschenserum. Wien Klin. Wschr. 66:276 1954.

CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reacções de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmosse, em 1000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:1-26, 1964.

29. KABAT, E. A. & MEYER, M. M. — Experimental Immunochemistry. 22. Estimation of protein with the Folin-Ciocalteu phenol reagent. Springfield, Charles C. Thomas, c 1961. p. 556-558.
30. KABELITZ, H. J. — Die diagnostische Bedeutung und Klinische Beurteilung der Toxoplasma-Seroreaktionen und des Toxoplasmin-Hauttest. Z. Tropenmed. Parasit. 11: 287-298, 1960.
31. KABELITZ, H. J. — Untersuchungen über unespezifische Mitreaktionen und Titterschwankungen in den Toxoplasma-Seroreaktionen. Klin. Wschr. 38:602-606, 1960.
32. KELEN, A. E.; AYLLON-CLEINDL, L. & LABZOFFSKY, N. A. — Indirect fluorescent antibody method in serodiagnosis of toxoplasmosis. Canad. J. Microbiol. 8:545-554, 1962.
33. KNIERIM, F.; NIEDMAN, G. & THIERMANN, E. — La reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de la toxoplasmosis. Bol. Chil. Parasit. 15:48-50, 1960.
34. KRAMARZH, I. A. — Use of the fluorescent antibody method in the serological diagnosis of toxoplasmosis. Med. Parazit. (Mosk). 32: 454-460, 1963.
35. LACAZ, C. S. — Contribuição para o estudo dos anticorpos bloqueadores através da prova de Coombs, Mourant e Race. São Paulo, 1953. Tese Prof. F.M.U.S.P.
36. LEWIS, V. J. *et alii* — Technical considerations in the preparation of fluorescent antibody conjugates. Appl. Microbiol. 12:343-348, 1964.
37. LEWIS, W. P. & KESSEL, J. F. — Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis. Arch. Ophthalm. 66:471-476, 1961.
38. LUNDE, M. N.; JACOBS, L. & WOOD, R. M. — Comparison of dye and hemagglutination tests on sera of suspected cases of toxoplasmic uveitis. Arch. Ophthalm. 69:10-12, 1962.
39. MCKINNEY, R. M.; SPILLANE, J. T. & PEARCE, G. W. — Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. J. Immunol. 93: 232-242, 1964.
40. MALONEY, E. D. & KAUFMAN, H. E. — The rapid and convenient detection of Toxoplasma antibodies using formaldehyde-treated human erythrocytes. Amer. J. Ophthalm. 50: 945-950, 1960.
41. MANDRAS, A.; VANINI, G. C. & CIARLINI, E. — La reazione di immunofluorescenza per la dimostrazione degli anticorpo contro "*Toxoplasma gondii*". Ig. Mod. 56:636-644, 1962.
42. MARSHALL, J.D.; EVELAND, W.C. & SMITH, C.W. — Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:898-900, 1958.
43. MAYERSBACH, H. & SCHUBERT, G. — Die unespezifischen Reaktionen zwischen markierten Seren und Geweben bei der immunohistologischen Technik. Acta Histochem. 10: 44-82, 1960.
44. MEIRA, J. A. *et alii* — Resultados de reacções sorológicas para o diagnóstico da Toxoplasmosse efetuados com soros de pacientes com protozooses. Hospital 55:691-698, 1959.
45. MITCHELL, R. G. & GREEN, C. A. — The hemagglutination test for Toxoplasma antibodies. J. Clin. Path. 13:331-335, 1960.
46. NICHOLS, R. L. & Mc COMB, D. E. — Immunofluorescent studies with trachoma and related antigens. J. Immun. 89:545-554, 1962.
47. PORTNOY, I. & GARSON, W. — New and improved antigen suspension for rapid reaction in test for syphilis. Pub. Hlth. Rep. 75: 985-988, 1960.
48. REUSS, K. — Untersuchungen zur Hämagglutinationsreaktion auf Toxoplasmosse nach Jacobs und Lunde. Z. Immun. Forsch. 121: 75-90, 1961.
49. RIGGS, J. L. *et alii* — Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. Amer. J. Path. 34:1081-1097, 1958.
50. RUBIN, M. — Studies on Toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. 7:358-364, 1958.
51. RUCKERBAUER, G. M. *et alii* — Toxoplasmosis. I. Studies by the fluorescein-labelled antibody technique. Canad. J. Comp. Med. 27:27-33, 1963.
52. SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. — Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). Science 108:660,663, 1948.
53. STADTBAEDER, S.; TELLIER-VERHEYDEN, N. & WEBER, E. M. — Diagnostic serologique de la toxoplasmosse par l'immunofluorescence. Acta Clin. Belg. 19:161-166, 1964.
54. THALHAMMER, O. — Apud BOZDECH & JIRA, 1: 1961.
55. THIERMANN, E.; KNIERIM, F. & NIEDMANN, G. — Vergleichende Untersuchungen über die Sabin-Feldmanreaktion und den Haemagglutinationstest bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii*. Z. Bakt. Parasikde. 192:230-260, 1964.
56. VAN SOESTBERGEN, A. A. 1956 — Apud VAN THIEL, 1958.
57. VAN SOESTBERGEN, A. A. — The titration of toxoplasma antibody. J. Hyg. (Lond.) 60:333-339, 1962.
58. VAN THIEL, P. H. — Das Problem der Spezifität des Sabin-Feldman Farbtestes. Antonie v. Leeuwenhoek. 24:113-133, 1958.

CAMARGO, M. E. — Estudo comparativo das reações de Sabin-Feldman e de imunofluorescência indireta, para a toxoplasmose, em 1.000 soros humanos. Comportamento anômalo de alguns soros. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:1-26, 1964.

59. WELLER, T. H. & COONS, A. H. — Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 86:789-794, 1954.
60. WESTPHAL, A. & MÜHLPFORDT, H. — Untersuchungen über wesen und fehlerquellen des Toxoplasmose-Serofarbtstes nach Sabin und Feldman. Z. Hyg. Infekt. Kr. 131:423-439, 1950.
61. WITTMER, R.; ROTH, W. & FAORO, N. — Die Toxoplasmose-Haemagglutination. Ophthalmologica (Basel) 141:402-409, 1961.
62. ZARDI, O. — Gli anticorpi fluorescenti nella diagnostica per la Toxoplasmosi. Nuovi Ann. Ig. 14:585-612, 1963.

Recebido para publicação em 1 de setembro de 1965.