

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
(Diretor: Prof. Ernesto de Souza Campos)

MICRO-REACÇÃO DE MAZZINI NO DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS

(Primeiros resultados obtidos em nosso meio).

Pelos Drs.

CARLOS DA SILVA LACAZ e PAULO C. DE AZEVEDO

(2.º assistente de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina. Professor da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo)

(Assistente extra-numerário de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de São Paulo)

Está hoje estabelecido que, para o sôro-diagnóstico da lues, devem ser realizados, no mínimo, três tipos de reações: uma, de fixação de complemento, uma de opacificação rápida e a outra, de clarificação. As reações de opacificação e clarificação são dotadas, segundo Eagle (1937) de maior sensibilidade que a de fixação de complemento, preferindo aquele autor, esta última prova, para o diagnóstico líquido da lues.

Das reações de fixação de complemento, as mais utilizadas são as técnicas de Kolmer, A. Assis, Eagle e Castro Cerqueira. Dentre as reações de opacificação rápida, a de Kahn é a mais empregada, sendo de um valor indiscutível. As reações de clarificação, propostas inicialmente por Meinicke (M. K. R. II) são de fácil leitura, porque se formam precipitados densos, ficando o restante clarificado. Vários tipos de técnicas têm sido propostas para este grupo de reações, tais como as de Müller (ou de conglobação), as de Meinicke, Kline, Hinton, Ide, Chediak, Migliano e Castro Cerqueira.

Em 1939, Mazzini publicou um trabalho sobre uma nova técnica de micro-reacção para o sôro diagnóstico da sífilis, cujo valor tem sido posto em evidência pelos trabalhos de diversos pesquisadores.

Achamos que toda nova técnica de reacção proposta para o sôro-diagnóstico da sífilis, deve ser julgada por um grande número de ex-

perimentadores, afim de que, do conjunto das provas realizadas, se avalie do valôr da reação em questão. Foi com êste objetivo que realizámos o presente trabalho.

O trabalho de Mazzini foi publicado no *Am. Journ. of Clin. Path.*, 9: 163, 1939.

Esta reação foi praticada inicialmente na secção de Sorologia do Indiana State Board of Health, dos Estados Unidos. Posteriormente, devido ao alto valôr da referida reação, no que diz respeito à sua sensibilidade e especificidade, foi ela, em 1938, oficializada pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos.

Mazzini realizou perto de 100.000 micro-reações, fazendo estudos comparativos com os testes de Eagle (fixação de complemento e floculação), Hinton, Kahn (presuntivo e standard) e Kline (diagnóstico e exclusão), chegando aos seguintes resultados: a reação de Mazzini dava uma sensibilidade de 86,7 % e 100 % de especificidade.

Segundo os dados contidos no trabalho de OOSTING e WATSON (1943) o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, em 1941, dava à reação de Mazzini uma especificidade de 99,6 % em casos de indivíduos normais e não sífilíticos e 95,8 % em pacientes com malária e lepra. A sensibilidade foi de 78,6 %, incluindo casos de sífilis inicial, latente e tratados.

O alto gráu de sensibilidade e de especificidade desta reação, segundo Mazzini, se explicam:

- 1.º — pela proporção lipóide-colesterina;
- 2.º — concentração H^+ da suspensão;
- 3.º — proporção sôro-antígeno;
- 4.º — emprego da gema de ovo, reforçando a suspensão antigênica.

Mazzini julga sua reação como de grande valôr no diagnóstico particularmente da sífilis inicial, sífilis latente, neurosífilis e nos pacientes em tratamento antilúético.

Nos Estados Unidos, a reação de Mazzini está sendo praticada em grande escala.

Na Argentina, Raices, Etcheverry e Battaglia (1940) publicaram um trabalho sôbre a referida reação, baseando-se em resultados obtidos com 2.200 sôros. Os autores praticaram esta prova juntamente com as reações de Wassermann e Kahn.

Em 334 exames foram praticadas igualmente a reação de Kline e em 37 casos a de Chediak.

Os resultados foram os seguintes:

- 1.º — Em 1906 sôros, as 3 reações foram francamente negativas.
- 2.º — Nos 294 sôros restantes:
 - a) sôros com as 3 reações positivas
(Mazzini, Wassermann e Kahn)

- | | | |
|----|--|----|
| b) | sôros com as reações de Mazzini e Kahn positivas e Wassermann duvidoso ou negativo | 42 |
| c) | sôros com a reação de Mazzini positiva e Wassermann e Kahn negativas | 35 |

Desimone e Lopez (1942) realizando um estudo comparativo entre as reações de Kahn (Standard e presuntiva) e Mazzini, concluíram ser esta última de uma sensibilidade superior à primeira, constituindo desta maneira uma excelente prova para o sôro diagnóstico da lues.

No Uruguay, Invernizzi e Yannicelli (1944) praticaram a micro-reação de Mazzini em 1.700 sôros, concluindo pela elevada sensibilidade desta prova.

Graças à nímia gentileza do Dr. Graña, obtivemos de Montevideo, dos Drs. Invernizzi e Yannicelli, uma pequena quantidade do antígeno de Mazzini, juntamente com a solução buffer e com êste pouco material realizamos as primeiras micro-reações em nosso meio, as quais nos deram os melhores e mais animadores resultados.

O antígeno de Mazzini e a solução estabilizadora ou solução buffer, podem ser adquiridos da casa E. Lilly and Co., preparados sob a licença da Faculdade de Medicina da Universidade de Indiana e controlado pelos Laboratórios Mazzini, apresentando-se o antígeno em pequenos frascos de 15 c.c., acompanhado de outro frasco de 115 c.c. de solução salina buffer, necessária para o preparo da suspensão.

A reação de Mazzini, segundo o seu Autor (1939) e Gradwohl (1943) se pratica da seguinte maneira;

Material — Pipetas de 5 cc. para medir a solução salina Buffer. Pipetas de 1 cc. graduadas em 0,01 cc. para medir o sôro e o antígeno. Pipetas de 0,2 cc. graduadas em 0,01 para medir o ácido acético. Frascos de 30 cc., com 3 cms. de diâmetro, para se preparar uma suspensão do antígeno (3,4 cc.). Frascos de 15 cc. com aproximadamente 2,3 cms. de diâmetro, para se preparar metade da quantidade de uma suspensão de antígeno (1,7 cc.). Seringas de 5 cc. ajustadas com uma agulha de tamanho 25 para ser usada como pinga-gotas. Bateria para se colocar os sôros. Banho-maria regulado a 55-56°C. Tubos para se colocarem os sôros. Centrífugos. Microscópio. Lâminas de vidro com anéis (idênticos aos usados na reação de Kline).

Reagentes

Antígeno — 1 Colocar 20 grs. de pó de coração bovino desidratado (Difco), 10 grs. de pó de gema de ovo e 200 cc. de éter de

anestesia em um balão de 500 cc. (de boca larga). Agitar em um agitador mecânico durante 5 minutos ou com o auxílio das mãos durante 15 minutos. Filtrar através de um papel de filtro. Repetir a extração etérea por 4 vezes, usando 100 cc. de éter cada vez. Usar papéis de filtro novos para cada extração. Coletar todo o extrato etéreo em um frasco de 500 cc. Estes filtrados combinados são usados posteriormente.

2. Depois da última extração, espalhar o pó úmido em uma folha de papel de filtro. Deixar o pó à temperatura ambiente ou colocar a 37°C até que o éter se evapore. Colocar o pó seco em um frasco de boca larga (500 cc.). Juntar 80 cc. de álcool etílico. Agitar a mistura em um agitador mecânico durante 4 horas ou deixar à temperatura ambiente durante 3 dias, agitando-se durante 5 minutos 3 vezes ao dia. Filtrar a mistura através um papel de filtro, coletar o filtrado em um frasco de 100 cc.. Desprezar o pó.

3. Colocar os extratos etéreos combinados em uma travessa ou placa e evaporar o éter, colocando em banho maria a 55°C até que nenhuma bolha de éter se levante na superfície do líquido. Colocar 100 cc. de acetona Merck, previamente aquecida a 55°C., rapidamente, sobre o extrato etéreo. Misturar com uma espátula. Decantar em dois tubos centrífugos de 50 cc.. Centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos. Desprezar a acetona. Adicionar 10 cc. de acetona a cada tubo. Misturar os lipóides insolúveis na acetona com um bastão de vidro. Colocar a palma da mão sobre a boca do tubo e inverter várias vezes. Desprezar a acetona sobrenadante. Coletar os lipóides insolúveis na acetona e juntar ao extrato alcoólico. Colocar em um balão. Banho maria a 55°C durante 30 minutos, agitando com intervalos frequentes. Deixar esfriar, colocando o balão em um refrigerador durante 30 minutos.

4. Filtrar o extrato através de um papel de filtro de fina textura. O antígeno está pronto para ser titulado. Remover por filtração qualquer precipitado que apareça. Guardar o antígeno bem fechado à temperatura ambiente.

Álcool colesterinizado a 1%. — Colocar 500 mgrs. de colesteroína (Pfanstiehl) em um frasco de 100 cc.. Juntar 50 cc. de álcool etílico absoluto. Aquecer em banho-maria através papel de filtro de fina textura.

Sol. salina Buffer — Esta solução deve ter um pH de 6,3 a 6,4 e uma concentração salina de 10 grs. por litro.

NaCl	2,025 gr.
Na ₂ HPO ₄	0,425 gr.
KH ₂ PO ₄	0,050 gr.

Água bi-distilada ..	250,0	cc.
HCL N1 ..	0,8	cc.
Formólaldeido (Merck) ..	0,25	cc.

Dissolver e filtrar. Determinar o pH pelo método colorimétrico. Guardar em tubos Pyrex bem fechados. Si esta solução se contaminar com partículas as mais variadas possíveis, filtrá-la. Em casos de emergência aquecer a 60°C, durante 10 minutos.

Sôro — Inativar a 55-56°C durante 30 minutos. Precipitados visíveis após a inativação devem ser removidos por centrifugação e decantação. Sôros hemolisados podem ser testemunhados, a não ser que estejam muito viscosos depois do aquecimento.

Titulagem do antígeno — A) *Determinação da proporção ótima de Lipóides-colesterina* — Colocar 5 tubos em uma bateria e numerá-los de 1 a 5. Os tubos devem estar bem secos. Colocar 0,1 cc. do antígeno diretamente no fundo de cada tubo.

Colocar 0,9 cc. de álcool colesterinizado a 1% no tubo 1	(1:10)
1,4 cc. " " " " " "	2(1:15)
1,9 cc. " " " " " "	3(1:20)
2,4 cc. " " " " " "	4(1:25)
2,9 cc. " " " " " "	5(1:30)

Misturar o conteúdo dos tubos. Usar 5 balões de 30 cc. Numerá-los 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, e 1:30 respectivamente. Pipetar 3 cc. de sol. salina buffer no fundo de cada balão. Usando 1 pipeta graduada em 1 cc., retirar 0,4 cc. do antígeno colesterinizado a 1:10, colocando no balão que contém a sol. salina buffer. Aspirar 3 a 4 vezes. Fazer o mesmo com os outros balões. Arrolhar os balões e deixar em temperatura ambiente 3 horas.

B) *Ensaio das suspensões* — No fim de 3 horas, agitar a suspensão ligeiramente. Colocar em uma seringa de 5 cc. com uma agulha de tamanho 25. Selecionar 30 sôros de casos não sifilíticos. Pipetar 0,05 cc. de cada sôro em um anel da lâmina especial já descrita anteriormente. Juntar 1 gota da suspensão a 1:10 em cada um dos 30 sôros. Praticar movimentos de rotação durante 4 minutos numa média de 120 rotações por minuto. Examinar ao microscópio, com objetiva de pequeno aumento. Anotar os resultados. Todos os sôros devem mostrar numerosas e pequenas partículas do complexo lipóide-colesterina. Fazer a mesma coisa, usando os 30 sôros e as diluições diferentes do antígeno-colesterina. Há, geralmente, uma proporção (entre 1:10 e 1:30) em que a colesterina está em excesso nos lipóides e haverá então floculação espontânea das partículas. Está claro que nessas proporções, o antígeno não deverá ser usado.

C) *Determinação da qualidade antigênica da suspensão* — Havendo-se determinado a proporção lipóide-colesterina que não determina falsas reações positivas com sôros negativos, deve-se avaliar a propriedade antigênica dessa suspensão. Para isto, selecionar 10 sôros parcialmente positivos, preferentemente aqueles já tratados, e que contêm pequena quantidade de reagina. Colocar 0,05 cc. de cada um dos sôros nos anéis da lâmina já anteriormente considerada. Colocar uma gota da diluição a 1:10 em cada sôro. Agitar 4 minutos (120 rotações por minuto) e examinar ao microscópio. Ler os resultados. Verificar as outras diluições que dão reações negativas, seguindo-se a mesma técnica. Usar a suspensão que contiver a mais alta diluição lipóides-colesterina e que não determina floculação em presença de um sôro negativo. Si a diluição for a de 1:20, adicionar 0,5 cc. do antígeno a 9,5 cc. de álcool colesterinizado a 1 % afim de se obter um suprimento para 1 mês. O antígeno colesterinizado, quando bem fechado, conserva as suas qualidades durante vários meses.

Técnica da reação

Teste qualitativo com o sôro. — Pipetar 3 cc de sol. salina buffer em um frasco de 30 cc. Medir 0,4 cc. de antígeno colesterinizado e, segurando o frasco com a mão esquerda, dando-lhe movimentos de rotação, descarregar o antígeno direta e imediatamente na sol. salina. Aspirar com a pipeta e descarregar várias vezes. Arrolhar e deixar em temperatura ambiente durante 3 horas, findas as quais o antígeno alcança o seu ótimo de sensibilidade. Colocar em um refrigerador a 6-8°C durante 15 minutos para acelerar o amadurecimento do antígeno, quando se quer usar imediatamente. A suspensão pode ser usada dentro de 24 horas. OOSTING e WATSON (1943) realizaram uma interessante série de experiências, com a finalidade de verificar o valôr de suspensões de antígenos "amadurecidos" segundo várias técnicas, à saber:

1. — Suspensão conservada em temperatura ambiente durante 4 horas;
2. — Suspensão conservada em geladeira a 6-8°C, durante 15 minutos;
3. — Suspensão conservada em geladeira a 6-8°C, durante 15 minutos, seguida 1 hora em temperatura ambiente;
4. — Suspensão conservada durante 27-28 horas em temperatura ambiente.

O A.A. praticaram a reação de Mazzini com êstes 4 tipos de antígeno, verificando que a maior sensibilidade era obtida quando se

empregava uma suspensão amadurecida durante 4 horas em temperatura ambiente.

Agitar do fundo do tubo para a rolha de cortiça cerca de 10 vezes e transferir para uma seringa de vidro de 5 cc. com uma agulha de tamanho médio de 25. Colocar 0,05 cc. do sôro do paciente em um anel da lâmina. Colocar 1 gota do antígeno em cada sôro. Fazer contrôles, positivo e negativo. Agitar 4 minutos (120 rotações por minuto). Examinar macroscopicamente para ter certeza que não houve transbordamento. Examinar ao microscópio com ocular 10. Inspeccionar a periferia dos anéis para se verificar a formação ou não de grumos ou aglomerados.

Resultados:

Negativo — não há flóculos
 Flóculos pequenos (+ +)
 Flóculos de tamanho médio (+ + +)
 Flóculos grandes (+ + + +)

Pode-se ler também da seguinte maneira:

Ausência de floculação:	.NEGATIVA
Flóculos muito pequenos:	.DUVIDOSA
Flóculos de tamanho médios e grandes	.POSITIVA

Téste quantitativo com o sôro: — Proceder da mesma maneira que a reação qualitativa, excepto no sôro que deverá estar diluído em série. Colocar para isto, 6 tubos em uma bateria. Juntar 0,5 cc. de sol. fisiológica em cada tubo. Colocar 0,5 cc. de sôro aquecido no tubo n.º 1. Misturar e transferir 0,5 cc. para o tubo 2, misturar e transferir 0,5 cc. para o tubo 3 e continuar da mesma maneira até o tubo 6. Ler os resultados:

0,025 cc.	++++
0,0125 cc.	++++
0,0062 cc.	++++
0,0031 cc.	++
0,0015 cc.	+
0,0007 cc.	NEGATIVA

Téste qualitativo para o liquor: — Não aquecer o liquor. Não empregar líquores contaminados. Centrifugar a 2.000 r. p. m. durante 5 minutos. Colocar o líquido sobrenadante em um tubo bem limpo. Usando uma pipeta de 0,2 cc. graduada em 0,01 cc., colocar 0,01 cc. de uma sol. de ácido acético a 6% em um lado da concavidade da lâmina usada. Usando 1 pipeta de 1 cc., colocar

0,1 cc. do liquor, no lado oposto da câmara. Misturar o ácido e o liquor com um pedacinho de madeira (bastão). Praticar movimentos de rotação durante 1 minuto. Juntar 1 gota de antígeno. Movimentos de rotação durante 10 minutos a 120 rotações por minuto. Examinar ao microscópio, tal como para o sôro.

Teste quantitativo: — preparar diluições como para o sôro.

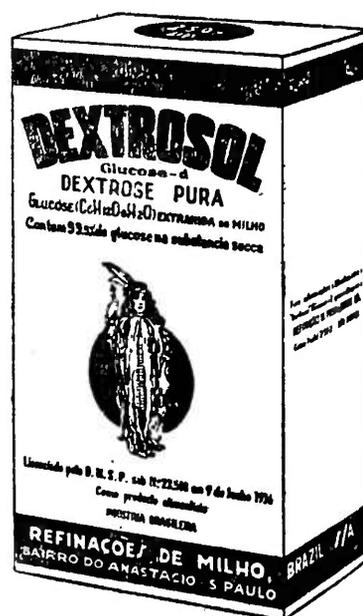
Resultados por nós obtidos: — Dada a pequena quantidade de antígeno por nós recebido, o número de reações praticadas foi de 168, sendo que a maioria dos sôros nos foi fornecida pela secção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, graças a gentileza do colega Dr. Flery.

No Instituto Adolfo Lutz, assim como na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram praticadas as reações de Wassermann e Kahn.

DEXTROSOL

(GLUCOSE — D)

QUANDO NÃO FÔR POSSÍVEL INJETAR O SÔRO GLYCOSADO, DEXTROSOL IMPÕE-SE COMO SUBSTITUTO POR VIA BUCAL



REFINAÇÕES DE MILHO, BRASIL S. A.
 SÃO PAULO
 Caixa Postal, 151-B

RIO DE JANEIRO
 Caixa Postal, 3421

Sôros do Inst. A. Lutz.
Dia: 26-VII-44.

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
38	++++	++++
37	+++	++++
31	+	+++
65	++++	++++
28	++++	++++
68	++++	++++
70	++++	++++
41	—	—
55	—	—
57	—	—
66	—	—
17	++++	++++
53	—	—
64	—	—
51	—	—
52	—	—
58	—	—
59	—	—

Sôros da Faculd. Medicina.
Dia: 26-VII-44.

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
1	+	+
2	++	++
3	—	—
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	—	+

(Cont.)

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
8	++++	++++
9	—	—
10	—	—
11	—	—
12	—	—
13	—	—
14	++++	++++
15	+	+
16	—	+

Sôros do Inst. A. Lutz.
Dia: 27-VII-44.

N.º	Resultado	
	W. — K	Mazzini
6	—	—
9	—	—
1	—	—
22	—	—
15	—	—
23	—	—
70	—	—
69	—	—
63	—	—
33	—	—
37	—	—
27	+	+
2	—	—
30	++++	++++
36	++	+++
39	—	—
11	—	—
56	—	—

(Cont.)

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
75	+++	+++
58	—	—
54	—	—
38	—	—
73	—	—
46	—	—
42	—	—
47	—	—
66	—	—
65	—	—
3	—	—
74	—	—
17	—	—
61	—	—
44	—	—
60	—	—
41	—	—
50	—	—
62	++	+++
53	—	—
12	++++	++++

Sôros da Faculd. Medicina.
Dia: 28-VII-44.

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
1	—	—
2	—	—
3	++++	++++
4	++++	++++
5	—	—
6	—	—
7	—	++
8	—	—
9	+	+
10	++++	++++

Sôros do Inst. A. Lutz.
Dia: 2-8-44 (reação).
Sôros recebidos nos dias:
31-VII-44,
1-VIII-44,
2-VIII-44.

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
45	—	—
72	—	—
7	—	—
4	—	—
79	++	++++
51	—	—
55	—	—
54	—	—
77	—	—
73	—	—
46	—	—
100	—	—
63	—	—
101	—	—

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
19	—	—
17	—	—
25	—	—
24	—	—
57	—	—
82	—	—

94	+	+++
49	—	—
35	++	+++
50	—	—
83	—	—
80	—	—
61	—	—
76	—	—
78	—	—
52	—	—
34	—	—
68	—	—
66	—	—
7	—	—
18	—	—
69	—	—
52	—	—
57	—	—
43	—	—
40	—	—
46	—	—
58	—	—

N.º	Resultado	
	W — K	Mazzini
59	—	—
39	—	—
48	—	—
71	—	++
30	—	—
55	—	—
22	—	—
27	++	+++
34	—	—
57	—	—
38	+++	+++
41	++	++
44	—	—
58	—	—
45	—	—
43	—	—
25	—	—
60	—	—
7	—	—
12	—	—
29	—	—
27	—	—
33	—	—
10	—	—
24	—	—

Sóros recebidos nos dias :

1-VIII-44,

2-VIII-44.

(Inst. A. Lutz) Reação : 3-VIII-44.

N.º	Resultado		N.º	Resultado		N.º	Resultado	
	W - K	Mazzini		W - K	Mazzini		W - K	Mazzini
5	-	-	48	-	-	76	-	-
16	-	-	78	-	-	2	-	-
1	-	-	79	-	-	72	++	++
55	-	+	19	-	-	73	-	-
22	-	-	74	-	-	31	-	-
27	++	++	5	-	-	6	-	-

TOTAL		168	
Positivas		Negativas	
W - K	Mazzini	W - K	Mazzini
31	36	137	132
Positividade superior (Mazzini)		2,97 %	

Verificamos que a reação de Mazzini, em todos os casos de Wassermann ou Kahn positivos, se mostrou igualmente positiva, assim como foi já verificado por outros autores.

Com o pequeno número de casos que possuímos (168) verificamos uma superior positividade de 2,97%, da reação de Mazzini sobre os outros testes ensaiados. Ao nosso ver, pela facilidade de execução, pela reduzida quantidade de sôro empregado e pela sua especificidade e sensibilidade, a micro-reação de Mazzini deve ocupar um lugar de destaque entre as reações de clarificação para o sôro-diagnóstico da sífilis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Desimone, L. y Lopes. (1942)** — Estudio comparativo de las reacciones de Kahn (Standard, presuntiva y combinada con la reaccion de Mazzini). Rev. Ass. Bioq. Arg., 8 (25).
- Eagle, Harry (1937)** — The Laboratory Diagnosis of Syphilis. The C. V. Mosby Company, St. Louis.
- Gradwhl, R. B. H. (1943)** — Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. The C. V. Mosby Company, St. Louis.
- Invernizzi, W. y Yasnicelli, S. E. (1944)** — Exclusión de la sífilis y otras enfermedades infecciosas en los dadores de sangue. Arch. Urug. Med. Cir. y Espec., 124: 476-500.
- Mazzini, L. Y. (1939)** — A reliable, sensitive, simple, and rapid slide flocculation test for syphilis. Am. J. of Clin. Path., 9:163
- Oosting, Melvin and Watson, Virginia (1943)** — The Mazzini slide flocculation test — sensitivity of its antigen. The American Journal of the Medical Sciences, 206:486.
- Raices, A. E., Etcheverry, M. A. y Battaglia, A. (1940)** — La seroreacción de Mazzini para la syphilis. La Semana Médica, 47:1297.