UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

FEBRE REUMÁTICA:
Perfis imunoquímicos desenvolvidos por antígenos celulares
e extracelulares do *Streptococcus pyogenes* e isotipos de
anticorpos de pacientes com a doença

MARIA DE FÁTIMA BORGES PAVAN

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu

São Paulo
1996

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P337f Pavan, Maria de Fátima Borges
Febre reumática : perfis imunoquímicos desenvolvidos por antígenos celulares e extracelulares do *Streptococcus pyogenes* e isotipos de anticorpos de pacientes com a doença / Maria de Fátima Borges Pavan. -- São Paulo, 1996. 149p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Hoshino-Shimizu, Sumie

1. Microbiologia médica 2. Imunologia 3. Imunoensaio I. T. II.
Hoshino-Shimizu, Sumie, orientador.

616.01 CDD

Maria de Fátima Borges Pavan

FEBRE REUMÁTICA:

Perfis imunoquímicos desenvolvidos por antígenos celulares e extracelulares do *Streptococcus pyogenes* e isotipos de anticorpos de pacientes com a doença

COMISSÃO JULGADORA:

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. SUMIE HOSHINO SHIMIZU
Presidente (Orientadora)

Profa. Tit. *Sumie Hoshino Shimizu*
Presidente e Orientador

Prof. Dr. *Edilson Luiz Durigon*

1º. Examinador

Profa. Dra. *Kioko Takei*

2º. Examinador

Profa. Dra. *Marina Baquerizo Martinez*

3º. Examinador

Profa. Livre Docente *Ilka Landgraf*

4º. Examinador

São Paulo, 5 de Dezembro de 1996

*Ao Newton,
meu companheiro, amigo,
marido, amante,
amor da minha vida*

*Aos meus amados filhos
Luana e Luiz Henrique*

*À minha mãe querida,
exemplo de coragem e de vida,
cuja saudade que deixou
ainda me é tão doída...*

Ao meu querido e saudoso pai

*Aos meus irmãos,
sempre unidos na alegria e na dor*

dedico este trabalho

*"Alma minha gentil, que te partiste
Tão cedo desta vida, descontente,
Repousa lá no céu eternamente
E viva eu cá na terra sempre triste.
Se lá no assento etéreo, onde subiste,
Memória desta vida se consente,
Não te esqueças daquele amor ardente
Que já nos olhos meus tão puro viste.
E se vires que pode merecer-te
Alguma cousa a dor que me ficou
Da mágoa, sem remédio, de perder-te,
Roga a Deus, que teus anos encurtou,
Que tão cedo de cá me leve a ver-te,
Quão cedo de meus olhos te levou."*

Luís V. de Camões

Aos meus pais queridos

*O amor vence a distância, a ausência
e até mesmo a morte.
Um dia estaremos todos juntos novamente.
Até lá, só nos resta a infinita saudade...*

À Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu, por ter me acolhido como sua orientada, pelo apoio, incentivo, pela experiência dividida e sobretudo pela paciência e tranquilidade que me transmitiu;

À Marina Baquerizo Martinez, querida amiga, pela ajuda inestimável, pelo incentivo incansável, pelos conselhos, enfim pela amizade sempre a mim demonstrada;

À Elsa Masae Mamizuka, amiga de tantos anos, sempre disposta a ajudar em tudo e a todos, pela paciência, pela colaboração imensa, pelo apoio e pelo carinho que sempre me ofertou;

Ao Prof. Dr. Seizi Oga, Diretor desta Faculdade, pela cortesia e gentileza com que sempre me tratou, pelo apoio oferecido, pela amizade desde cedo demonstrada;

Ao Prof. Paulo Minami, pela confiança em mim depositada e pela amizade;

À Agda Andrade, pela amizade, solidariedade e ajuda sempre inestimável;

Às amigas Sonia Caramico e Regina Martins pelo incentivo, amizade e apoio técnico dado neste trabalho;

Aos amigos pós-graduandos e estagiários da disciplina Monique, Ermelinda, Geraldo, Carla, Regina, Daniela, pela corrente de incentivo, pela amizade e pelo convívio agradável;

À amiga Kioko Takei pelo incentivo, amizade e pelo auxílio inestimável dado neste trabalho, cedendo-me amostras de soro do Laboratório de Sorologia do H.S.P.E.S.P.;

Às amigas Yoshimi Imoto, Neusa da Silva e Mônica Asciuti, pelo constante incentivo, pela amizade sincera e pelas valiosas amostras de soro que me cederam do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas;

À Dra. Maria Odete Hilário, da Clínica de Reumatologia do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina, pela gentileza e pelo fornecimento de amostras clínicas de crianças com febre reumática aguda;

À Dra. Maria Helena Kiss, da Clínica de Reumatologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas amostras clínicas de crianças com febre reumática aguda fornecidas, sem as quais não teria se realizado este trabalho;

À colega e amiga do Instituto Adolfo Lutz, Maria das Graças, pela amizade, apoio, pelo fornecimento das amostras do grupo controle, pelo auxílio prestado;

O meu muito obrigada, de coração

Os meus sinceros agradecimentos

Aos queridos amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, em especial à Marisa Porta, Arlete Cury, Aparecida Fujimura, Lúcia Meloni, Antonio Altair, Rosário Hirata, Mário Hirata, Silvia Berlanga, Primavera Borelli, Ovandir Alves, Flávio Midio, pelo constante apoio e incentivo e pela amizade sincera de tantos anos;

Às colegas Regina Cunha, Adelaide, Ana Campa, Dulcinéia, Ligia, Herminia, Yara, Elizabeth, Regina Lúcia e Miriam pelo apoio;

Aos amigos Edna, Jacira, Márcia, Renata, Luís, Suely, Sofia, Dorley, Maria Auxiliadora, pelo incentivo;

Às Bibliotecárias Moema, Marina e Gisele, pela composição da ficha catalográfica e revisão das referências bibliográficas;

Aos demais colegas e amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio;

Aos meus queridos amigos, Sita e Eufrásio, pelo ânimo que sempre me deram, pela confiança que sempre me depositaram, pela amizade sincera a toda prova;

Aos meus cunhados, Nancy, Rubens, Edna, Lola, Antonio, Marcos, e aos meus sobrinhos pelo carinho e

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho

*"E vos digo que a vida é realmente escuridão,
exceto quando há um impulso.*

E todo impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vazio, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.

*E quando trabalhais com amor, vós vos unis a
vós próprios e uns aos outros e a Deus".*

G. K. Gibran

ÍNDICE

	pg.
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO.....	3
1.2 - ASPECTOS GERAIS DA BACTÉRIA.....	4
1.3 - PATOLOGIA.....	6
1.3.1 - Aspectos clínicos.....	6
1.3.1.1 - Tratamento.....	9
1.3.1.2 - Prevenção.....	11
1.3.2 - Aspectos patogenéticos.....	11
1.3.3 - Imunidade.....	18
1.4 - EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.5 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	23
1.5.1 - Detecção de anticorpos anti-estreptolisina O (ASLO).....	24
1.5.2 - Detecção de anticorpos contra outras enzimas extracelulares.....	28
1.5.3 - Detecção de anticorpos contra outros antígenos estreptocócicos.....	31
2 - OBJETIVOS.....	34
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 - AMOSTRAS DE SORO.....	39
3.1.1 - Soros-padrão.....	40
3.1.2 - Soros de pacientes com febre reumática (Grupo A).....	41
3.1.3 - Soros de indivíduos com suspeita de infecção estreptocócica, sem diagnóstico de sequela não-supurativa.....	42
3.2 - TITULAÇÃO DE AC ASLO NOS SOROS DOS PACIENTES DOS GRUPOS A E C ATRAVÉS DE REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO DA SLO (REAÇÃO DE REFERÊNCIA).....	43

3.3 - CEPA BACTERIANA UTILIZADA NA PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR.....	44
3.4 - OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS BACTERIANOS.....	45
3.4.1 - <i>Antígeno celular</i>	45
3.4.2 - <i>Antígeno extracelular</i>	46
3.5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DOS ANTÍGENOS.....	47
3.6 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS DE <i>S. pyogenes</i> POR “IMMUNOBLOT”.....	47
3.6.1 - <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	48
3.6.1.1 - Soluções e reagentes utilizados.....	48
3.6.1.2 - Procedimento.....	50
3.6.1.3 - Preparo das amostras.....	50
3.6.1.4 - Tratamento e coloração do gel.....	51
3.6.2 - <i>Transferência das bandas antigênicas</i>	52
3.6.2.1 - Procedimento.....	52
3.6.3 - <i>Revelação das frações antigênicas transferidas, por técnica de “immunoblot”</i>	53
3.6.3.1 - Solução e reagentes utilizados na técnica de “immunoblot”.....	54
3.6.3.2 - Procedimento da técnica de “immunoblot”.....	54
3.6.4 - <i>Cálculo da massa molecular das frações antigênicas</i>	55
3.7 - TITULAÇÃO DOS CONJUGADOS ENZIMÁTICOS.....	55
3.8 - DETERMINAÇÃO DA MELHOR DILUIÇÃO DO SORO A SER UTILIZADA NA REAÇÃO DE “IMMUNOBLOT”.....	56
3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4 - RESULTADOS.....	57
4.1 - TÍTULO DE AC ASLO DOS SOROS DOS PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA E DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE.....	58
4.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DOS ANTÍGENOS.....	58

4.3 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS DE <i>S. pyogenes</i> POR “IMMUNOBLOT”	59
4.3.1 - Padronização da eletroforese de antígenos de <i>S. pyogenes</i> em gel contínuo de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	59
4.3.2 - Padronização da reação de “immunoblot”	60
4.3.3 - Análise dos “blots” com os soros dos diferentes grupos estudados.....	61
4.3.3.1 - Bandas antigênicas reveladas nos antígenos celular e extracelular de <i>S. pyogenes</i>	61
4.3.3.2 - Frequência de positividade dos isotipos de imunoglobulinas frente às diversas bandas, nos diferentes grupos estudados.....	72
4.3.3.3 - Análise das frações antigênicas relevantes para diagnóstico de febre reumática aguda, identificadas pela técnica de “immunoblot”	89
4.3.3.4 - Análise da reatividade dos soros dos grupos A e B, com as diversas frações antigênicas, segundo o seu título de Ac ASLO.....	92
4.3.3.5 - Análise dos padrões de bandas encontrados nos diferentes grupos estudados.....	99
4.3.3.6 - Análise dos padrões de bandas encontrados nos grupos A e B, segundo o seu título de anticorpos ASLO.....	105
5 - DISCUSSÃO	106
6 - CONCLUSÕES	120
7 - RESUMO	122
8 - SUMMARY	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
APÊNDICE	142

1 - INTRODUÇÃO

Dentre as várias espécies de Streptococcus vamos nos ater à mais importante delas, aquela pertencente ao grupo A de Lancefield, ou S.pyogenes, a qual descreveremos a seguir em mais detalhes. S.pyogenes, clássico agente de infecções humanas, produz ampla variedade de doenças que diferem grandemente em severidade - de moderada a fatal. Em alguns casos, uma infecção branda como faringite ou impetigo é seguida por severas sequelas imunológicas - febre reumática ou glomerulonefrite. A febre reumática, considerada um problema de saúde pública em várias regiões do mundo, é uma doença aguda e febril, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, que a cada ano faz de 15 a 20 milhões de vítimas, a maioria jovens que têm diante de si os anos mais produtivos, deixando patente sua relevância sócio-econômica. Profilaxia dessa doença deve ser feita por longo período, com altas doses de antibióticos, o que pode causar efeitos deletérios para alguns indivíduos. Infelizmente, o diagnóstico de certeza das doenças pós-estreptocócicas constitui-se um problema sério, devido à impossibilidade de isolamento do agente, baixa sensibilidade aliada a dificuldades técnicas de alguns ensaios imunológicos empregados e altos custos de outros.

1.1 - HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO

A primeira descrição dos microrganismos hoje pertencentes ao Gênero *Streptococcus* data de 1874, quando Billroth relatou o encontro de microrganismos globulares crescendo em cadeias, isolados a partir de exsudato purulento de lesões de erisipela. Tais microrganismos tiveram uma classificação inicial com base na sua capacidade de hemolisar hemácias de carneiro, tendo sido introduzidos por Brown, em 1919, os termos alfa, beta e gama para descrever três tipos de reações hemolíticas observadas em placas de ágar-sangue⁷⁶.

Graças aos esforços de Lancefield na década de 1930, os diversos estreptococos beta-hemolíticos, os quais produzem uma ampla zona de hemólise total no ágar-sangue, puderam ser diferenciados entre si de acordo com seus grupos imunológicos, designados então por letras de A até O. Observou-se, porém, que a maioria das cepas causadoras de infecção humana eram pertencentes ao grupo A, comumente referidos como *Streptococcus pyogenes*. Por outro lado, esse grupo A continha uma variedade de tipos antigênicos, demonstrados mais tarde por reações de precipitação e de aglutinação. Os antígenos grupo-específicos foram identificados como carboidratos e os antígenos tipo-específicos como proteínas⁷⁶.

1.2 - ASPECTOS GERAIS DA BACTÉRIA

O estreptococo beta-hemolítico do grupo A, ou *S. pyogenes*, à semelhança dos demais estreptococos, é um coco Gram-positivo, geralmente disposto aos pares ou em cadeias e é anaeróbio facultativo. Na rotina laboratorial os estreptococos são diferenciados de outros cocos Gram-positivos por não produzirem a enzima catalase. Cepas de *Streptococcus* do grupo A são diferenciadas presuntivamente de cepas pertencentes a outros grupos sorológicos pela sua sensibilidade à bacitracina (discos com 0,005 U). Para bom crescimento, *S. pyogenes* requer meio de cultivo nutricionalmente complexo, contendo sangue desfibrinado de animal ou soro. A temperatura ótima para seu crescimento é de 37°C. Em placas de ágar-sangue *S. pyogenes* pode formar um dos 3 tipos de colônias: mucóides ou rugosas ou lisas^{52,76}.

S. pyogenes é envolvido por uma cápsula de ácido hialurônico, que lhe confere resistência à fagocitose⁸. A parede celular é formada por três camadas distintas, sendo que a camada superficial contém as proteínas M, R e T. As proteínas M e T são marcadores imunológicos de sorotipos dentro de uma espécie, e por serem capazes de estimular a síntese de anticorpos, possibilitaram a classificação de 85 sorotipos de estreptococos do Grupo A¹⁸. A proteína M localiza-se nas fímbrias das bactérias e é de vital importância no mecanismo de virulência, pois dificulta a fagocitose. Cepas ricas em proteína M são patogênicas, enquanto que as cepas isentas de proteína M são avirulentas⁷⁶.

A camada média da parede celular é formada por carboidratos imunologicamente distintos, os quais são os responsáveis pela especificidade de grupo. No grupo A, por exemplo, o carboidrato de

grupo é composto de N-acetilglicosamina (componente imunodominante) e ramnose, numa proporção molar de 1:2,47, enquanto no grupo C (o mais próximo de A) é composto de N-acetilgalactosamina ligado a ramnose. Os carboidratos dos grupos B e G têm como componente imunodominante a ramnose, aparecendo como componentes secundários a N-acetilglicosamina e galactose no grupo B e a galactosamina no grupo G, respectivamente.

A camada mais interna da parede celular é formada por mucopeptídeo (peptideoglicana) que lhe confere rigidez e forma⁵².

Produtos extracelulares liberados pelo *S.pyogenes* também exercem importante atividade biológica². Dentre eles destacam-se as exotoxinas, sendo uma delas a toxina eritrogênica que é responsável pelas erupções cutâneas na escarlatina. Essa substância exibe uma variedade de propriedades tóxicas, incluindo a pirogenicidade e a citotoxicidade.

Outras duas exotoxinas importantes, denominadas hemolisinas, são também elaboradas pela maior parte das cepas de *S.pyogenes*: a estreptolisina O (SLO), que é reversivelmente inibida pelo oxigênio e irreversivelmente pelo colesterol, exerce seu efeito tóxico sobre os eritrócitos, sobre uma variedade de outras células e suas organelas, e sobre o coração de mamíferos e anfíbios^{2,53,99}; e a estreptolisina S, não antigênica, que é produzida pelos estreptococos na presença de soro ou de outras substâncias como albumina sérica, lipoproteínas, ácido ribonucléico ou ainda de detergentes como Tween. Ambas hemolisinas O e S danificam as membranas das células polimorfonucleares, plaquetas e organelas sub-celulares².

Outros produtos extracelulares podem auxiliar na liquefação do pús, promovendo a disseminação dos estreptococos através dos

tecidos, como: a) as desoxirribonucleases (DNases) A, B, C e D, distintas imunológica e eletroforeticamente; b) hialuronidase, originalmente chamado de fator de propagação; c) estreptoquinase ou fibrinolisinase; d) nicotinamida adenina dinucleotidase (NADase); e) proteinase estreptocócica; f) amilase e g) esterase. A maior parte destas enzimas é antigênica⁷⁶.

Quanto à sensibilidade a antibióticos, todas as cepas de *Streptococcus* do grupo A são altamente sensíveis à penicilina.

Variações genéticas no *S. pyogenes* podem afetar numerosas características, incluindo elaboração de hemolisinas, morfologia colonial, formação de cápsula, produção de proteína M, síntese de outros antígenos da parede celular e resistência a drogas antimicrobianas. Essas variações podem afetar também a virulência da bactéria⁷⁶.

1.3 - PATOLOGIA

1.3.1 - Aspectos clínicos

S. pyogenes causa uma série de doenças supurativas, assim como sequelas não-supurativas. Tem sido responsabilizado ainda por uma infecção invasiva severa que passou a constituir uma nova entidade clínica, denominada "síndrome do choque tóxico estreptocócico"^{22,25,95}. Dentre as doenças supurativas destaca-se a faringite estreptocócica aguda e todas suas complicações, incluindo adenite cervical, otite média, mastoidite, sinusite, abscesso peritonsilar, meningite, peritonite e pneumonia. Em crianças com idade inferior a 4 anos, as infecções do trato respiratório superior podem ser subagudas, tendo como única

manifestação uma rinorréia. Crianças em idade escolar geralmente têm uma manifestação aguda da doença respiratória, com febre, dor de garganta, tonsilite exsudativa e adenite cervical^{36,76}.

Outras doenças supurativas causadas pelo *S. pyogenes* são:

- escarlatina, ocorrendo como uma complicação da doença estreptocócica piogênica, quando a cepa infectante é produtora de toxina eritrogênica e o paciente é susceptível a essa substância. A produção dessa toxina é conferida por bacteriófago, portador do gene que a codifica. Os sinais clínicos da doença são língua aframboesada e exantema;
- erisipela é uma inflamação aguda, caracterizada por febre, leucocitose e uma lesão cutânea vermelha, dolorosa e edematosa. Os sítios afetados são preferencialmente as pernas. A enfermidade pode ser grave com bacteremia, ocorrendo recaídas frequentes;
- piodermite e impetigo são doenças geralmente superficiais, podendo no entanto agravar-se e passar pelas fases vasculares e pustulares;
- febre puerperal estreptocócica é uma enfermidade aguda, decorrente da passagem das bactérias do canal vaginal para o sangue, na hora do parto;
- celulite, endocardite, linfadenite, osteomielite e artrite são doenças supurativas também associadas ao *S. pyogenes*, porém com menor frequência^{36,76}.

Vários relatos da "síndrome do choque tóxico estreptocócico" descrevem pacientes com hipotensão e falha em múltiplos órgãos. Na maioria das vezes o foco inicial da infecção tem sido a pele ou tecidos moles, provocando em algumas ocasiões fascite necrosante e miosite. Outrossim, a síndrome tem surgido também após infecção do trato respiratório superior ou ainda do trato genital

feminino. A maioria dos pacientes, mas não todos, tem manifestações cutâneas variando de celulite local, frequentemente com vesículas ou bolhas, a erupções eritematosas sistêmicas. Em adição à pirexia e hipotensão, os pacientes podem ter disfunção cerebral de moderada a profunda, severa falha renal, síndrome da angústia respiratória do adulto, cardiomiopatia tóxica, disfunção hepática e hipocalcemia. No choque tóxico estreptocócico geralmente está presente um foco de inflamação piogênica, e uma larga proporção de pacientes teve bacteremia documentada^{22,25,95}. Essa síndrome frequentemente se inicia com sintomas não específicos, incluindo mialgia, calafrio e febre. Sintomas gastrointestinais, incluindo náuseas, vômitos e diarreia, tem sido comumente reportados²⁵.

Na categoria de sequelas não-supurativas causadas pelo *S. pyogenes* encontramos como principais doenças a glomerulonefrite aguda e a febre reumática.

Glomerulonefrite aguda pode acometer indivíduos que tiveram prévia infecção estreptocócica tanto na faringe como na pele. Os sintomas característicos de hematúria, edema, proteinúria e hipertensão aparecem cerca de 10 dias após a infecção da faringe e de 18 a 21 dias após uma infecção cutânea; há uma queda no título sérico de complemento e deposição de imunoglobulinas, de C₃ e de antígeno estreptocócico na lesão glomerular^{36,75,76}.

A febre reumática, também chamada de reumatismo articular agudo, é a sequela mais grave da faringite estreptocócica, pois frequentemente resulta em lesões do miocárdio e das válvulas cardíacas. Cerca de 3% dos pacientes acometidos de faringite estreptocócica aguda desenvolvem posteriormente a febre reumática, a qual caracteriza-se por lesões inflamatórias não supurativas e podem envolver o coração,

articulações, tecido subcutâneo e sistema nervoso central. Na sua forma clássica a doença é aguda e febril; entretanto, os danos às válvulas cardíacas podem ocorrer, sendo estes crônicos e progressivos, levando à falência cardíaca. A febre reumática aguda é extremamente variável nas suas manifestações clínicas, onde as mais importantes são: cardite, poliartrite, coréia, nódulos subcutâneos e eritema "marginatum". O período latente entre o início da faringite estreptocócica aguda e os sinais e sintomas de febre reumática é geralmente de duas ou três semanas, podendo variar de 5 a 45 dias^{36,75,76,92}.

1.3.1.1 - Tratamento

Streptococcus beta-hemolítico do grupo A é praticamente a mais susceptível de todas as bactérias patogênicas quanto à ação de drogas anti-microbianas. As sulfonamidas inibem prontamente tanto o crescimento "in vitro" como "in vivo", porém como são apenas bacteriostáticas, seu uso não eliminaria os organismos do trato respiratório superior, nem modificaria significativamente a resposta de anticorpos do hospedeiro. Penicilina é bactericida e portanto muito mais eficaz. Quando usada em dosagem adequada por um espaço de tempo suficiente, esta droga frequentemente expulsa os estreptococos hemolíticos da faringe. Persistência geralmente indica uma complicação supurativa, como um abscesso intratonsilar ou sinusite purulenta. Quando administrada logo no início do curso da faringite estreptocócica aguda, a penicilina também deprimirá a resposta imune humoral do paciente, e tal tratamento, de indivíduos susceptíveis, reduz grandemente a taxa de ataques reumáticos, pela ausência de anticorpos⁷⁶.

Outros antibióticos, como a eritromicina, podem também ser usados no tratamento da infecção por estreptococos do grupo A, particularmente em pacientes que têm história de hipersensibilidade à penicilina. Muitas cepas atualmente são resistentes às tetraciclinas, às quais não são, por esse motivo, muito recomendadas⁷⁶.

Para os pacientes acometidos de febre reumática aguda a rotina terapêutica compreende medidas gerais, tratamento profilático e tratamento específico. Como *medidas gerais* temos: a) erradicação do estreptococo, sendo um dos esquemas terapêuticos o uso de penicilina procaína por via intramuscular, na dose de 400.000 U de 12 em 12 horas, durante 10 dias, podendo-se utilizar ainda eritomicina ou ampicilina; b) repouso no leito; c) dieta hipossódica; d) reposição oral de cloreto de potássio; e) tratamento da insuficiência cardíaca, se houver. O *tratamento profilático* tem por finalidade evitar a reincidência da doença e é instituído logo após o término do tratamento erradicador da estreptococcia na fase aguda da doença ou imediatamente na fase crônica. Um dos esquemas adotados é a administração quinzenal de penicilina benzatina, por via intramuscular, por vários anos. O tempo que deve durar o tratamento profilático é discutível; teoricamente por toda a vida, porém, na prática, são mantidos em profilaxia permanente aqueles pacientes que apresentaram estreptococcias repetidas após a suspensão do antibiótico, em pacientes com lesões valvares graves ou comissurotomia e os que vivem ou trabalham em ambientes contaminados. O *tratamento específico* é dirigido contra os sinais e sintomas clínicos manifestos pelo doente, como p.ex. o uso de ácido acetil-salicílico nos pacientes com artrite, corticosteróide naqueles com cardite e assim por diante^{8,51}.

1.3.1.2 - Prevenção

Imunização da população em geral contra infecções por estreptococo do grupo A provou não ser praticável devido ao grande número de tipos sorológicos existentes; porém continuam os esforços para se encontrar uma vacina polivalente contra diversos sorotipos de estreptococos, para fins especiais⁷⁶.

1.3.2 - Aspectos patogénéticos

A patogênese das doenças estreptocócicas supurativas está razoavelmente bem compreendida. Uma importante característica biológica que ajuda na patogenicidade do *Streptococcus pyogenes* é sua habilidade de aderir-se às células epiteliais, por meio do ácido lipoteicóico localizado nas fímbrias que cobrem a parede celular⁹². Os fatores que determinam invasibilidade também são particularmente importantes. Uma vez que os estreptococos hemolíticos ingeridos pelas células fagocíticas são quase todos mortos em poucos minutos, suas propriedades anti-fagocitárias desenvolvem um papel crítico na invasibilidade. Essas propriedades, por sua vez, dependem do ácido hialurônico capsular e da proteína M⁷⁶.

Embora quase todos os estreptococos fagocitados sejam prontamente mortos, ocasionalmente um organismo pode escapar ileso, graças à elaboração de um fator leucotóxico, associado à estreptolisina S⁷⁶.

Outros produtos extracelulares têm ação na patogenia das infecções, como a hialuronidase que facilita a disseminação das bactérias no organismo e a estreptoquinase que pode levar à desintegração de coágulos de fibrina. A estreptolisina O danifica a membrana de células de mamíferos, gerando canais transmembrânicos, através da formação de polímeros que se inserem na mesma; ataca as membranas que possuem o colesterol e também se liga às imunoglobulinas G naturais do soro, ativando o complemento pela via clássica. Apesar de muito estudada, não se sabe o papel exato dessa hemolisina na patogênese das infecções estreptocócicas e pós-estreptocócicas²⁰.

A localização mais frequente do *S. pyogenes* no homem é a nasofaringe. Após a sua penetração e aderência às células epiteliais a bactéria difunde-se rapidamente para o tecido linfático e para o sangue. As lesões locais por ela causadas são de hiperemia, edema e infiltração de leucócitos polimorfonucleares. Ocorre uma hiperplasia linfóide generalizada. Quando a cepa infectante é produtora de toxina eritrogênica e o indivíduo é susceptível à ela, haverá a erupção da escarlatina, cujo exantema é devido à capilarite. Existe controvérsia, contudo, se a erupção é secundária à ação direta da toxina circulante ou de uma reação de hipersensibilidade cutânea generalizada⁷⁶.

A patogenia da glomerulonefrite aguda tem sido associada à presença de imunocomplexos. Durante um ataque, os níveis séricos de complemento diminuem e demonstra-se por imunofluorescência a presença de imunoglobulina, de componente C₃ do complemento e de antígenos estreptocócicos na lesão glomerular. Uma proteína extracelular que é produzida por cepas nefritogênicas, mas raramente por outras cepas, foi recentemente identificada como uma estreptoquinase, que

difere imunologicamente daquela descrita anteriormente. Seu papel na doença está sob investigação⁷⁶.

A febre reumática tem sido muito estudada e várias são as teorias que tentam esclarecer sua patogenia. Anticorpos anti-estreptococos são constantemente encontrados no soro de pacientes com febre reumática aguda e, após uma estreptococcia epidêmica, a maioria dos pacientes que desenvolvem febre reumática (cerca de 3%)²¹ tem títulos mais altos de anticorpos anti-estreptococos nos seus soros do que aqueles indivíduos que não contraíram a doença. Contudo, não está claro como a hiperreatividade imunológica aos produtos estreptocócicos poderia causar a cardite e as lesões nas articulações e na pele que caracterizam a doença, assim como não está claro quais produtos estreptocócicos, em particular, estariam envolvidos, embora muitos tenham sido implicados em experimentos com animais e com anticorpos monoclonais contra antígenos cardíacos frente a diversos antígenos estreptocócicos. Por exemplo, SLO tem sido apontada como cardiotóxica; proteinase estreptocócica injetada intravenosamente causa lesões subendocárdicas e fragmentos da parede celular, compostos de carboidrato grupo-específico e peptidoglicana, são capazes de causar cardite e lesões articulares^{38,76,113}. Uma proteína de superfície de estreptococos - C5a peptidase (125 kDa), tem um papel mais bem definido na virulência dessa bactéria. Essa grande molécula cliva o fator C5a do complemento e incapacita-o para a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares. O gene para C5a peptidase é estreitamente relacionado aos genes que codificam para proteínas M e para as proteínas ligantes de imunoglobulinas¹⁶. Dentre as várias proteínas extracelulares envolvidas na virulência, temos ainda a cisteína-proteinase estreptocócica (SCP) a qual, segundo *BERGE & BJÖRCK*¹⁶ demonstraram, é idêntica à exotoxina pirogênica extracelular. Entretanto,

essa enzima, que tem atividade fibrinolítica, é também ativa dentro da célula bacteriana. Efeitos mitogênicos foram encontrados nas toxinas eritrogênicas A, B e C e também em outras, bem menos definidas, proteínas extracelulares com diferentes pontos isoelétricos¹⁰. Proteínas mitogênicas estreptocócicas parcialmente purificadas (referidas como SM) e seus componentes (frações protéicas de ~70.000 e ~30.000 kDa), têm como atividades biológicas: mitogenicidade para linfócitos T CD4, ativação policlonal, indução da síntese de interferon, atuando ainda como adjuvantes¹⁰. Recentemente, foi detectada também a produção pelos estreptococos do grupo A de exotoxinas que atuam como superantígenos, os quais seriam responsáveis pelas doenças invasivas severas, como a síndrome do choque tóxico estreptocócico e a febre reumática^{78,95}. MOLLICK e cols.⁷⁸, utilizando um ensaio específico para superantígenos, purificaram uma proteína de 28 kDa de sobrenadante de cultura de *S.pyogenes* que se ligava a moléculas de classe II e estimulava células T humanas, a qual foi designada de superantígeno estreptocócico (SSA).

Além disso, reações imunológicas cruzadas têm sido descritas entre antígenos estreptocócicos e antígenos tissulares do músculo cardíaco, cérebro e outros tecidos, causando lesões com o auxílio do complemento^{38,76,113}. Essas reações cruzadas foram evidenciadas em crianças que foram a óbito por febre reumática aguda e falência cardíaca, em cujos miocárdios foram encontrados depósitos de gamaglobulina. Esses anticorpos eram direcionados contra o sarcolema e o sarcoplasma de miofibras cardíacas⁶². GOLDSTEIN e cols.^{44,45} reportaram a existência de uma reação imunológica cruzada entre glicoproteínas extraídas de válvulas cardíacas de humanos ou de bovinos e o carboidrato C da parede celular do estreptococo beta-hemolítico do grupo A. Os estudos em bovinos servem de base para reforçar as

hipóteses da patologia em humanos. Foram feitas secções de tecido cardíaco de bovino, que reagiram com soro imune anti-estreptococo beta-hemolítico do grupo A, pelo teste de imunofluorescência. A reação foi positiva apenas quando se fez um tratamento do tecido cardíaco com enzimas proteolíticas, sugerindo desta forma a existência de um determinante tecidual "oculto" que é exposto apenas quando o paciente sofre a ação das enzimas bacterianas. Reações cruzadas foram ainda evidenciadas por alguns autores que pesquisaram proteínas da parede ou membrana celular de estreptococos, que reagissem cruzadamente com anticorpos contra actina ou miosina do coração, utilizando para isso anticorpos monoclonais contra estreptococos que reagiam cruzadamente com o coração e/ou anticorpos monoclonais contra esses antígenos cardíacos^{13,14,49}. Anticorpos monoclonais anti-actina e anti-miosina cardíaca reconheceram proteínas da parede celular do estreptococo com as seguintes massas moleculares: 2 proteínas de cerca de 60 kDa, uma de ~43 kDa e outra de ~86 kDa. Essas proteínas foram reconhecidas também pelos anticorpos presentes na maioria dos soros dos pacientes com Febre Reumática Aguda, quando da reação com extratos protéicos estreptocócicos^{13,14}. Outros anticorpos monoclonais humanos, produzidos a partir de linfócitos de paciente com febre reumática, reconheceram 2 bandas protéicas, de 83 e 48 kDa, tanto na reação com preparações cardíacas quanto na reação com estreptococo do grupo A sonificado⁵⁵. Por outro lado, anticorpos monoclonais produzidos contra membrana estreptocócica, ao reagirem com proteínas de válvulas cardíacas humanas solubilizadas, reconheceram uma proteína de alta MM, 205 kDa, identificada como miosina, além de outras três bandas com MM entre 116 e 200 kDa, as quais os autores classificaram como prováveis produtos de degradação da miosina. Reação intensa foi

verificada ainda com uma banda de ~57kDa, a qual foi também reconhecida por anticorpos monoclonais contra vimentina⁴⁹.

Estudo realizado em crianças com comprometimento do sistema nervoso central (coréia reumática aguda), revelou que anticorpos presentes nos seus soros reagiam com antígenos citoplasmáticos neuronais e estes eram completamente absorvidos por preparações de membranas do estreptococo beta-hemolítico do grupo A. Ademais, a severidade da doença correlacionava-se com os níveis de anticorpos anti-neuronais¹¹³.

BAHR e cols.¹⁰ utilizaram a técnica de Western blotting (WB) para tentar traçar um perfil da resposta imune em crianças com febre reumática aguda contra mitógenos extracelulares do estreptococo, que pudesse estar relacionado com a patogênese da doença. Para tanto, os autores utilizaram sobrenadante de cultura em caldo, o qual foi precipitado, dialisado, gel-filtrado e finalmente concentrado por ultracentrifugação. Essa preparação - SM (streptococcal mitogen) - foi utilizada na reação de WB, para caracterizar a especificidade dos Ac contra esse antígeno, previamente detectados pelos autores em técnica de ELISA no soro de crianças saudáveis (controle) e de crianças reumáticas. Os soros escolhidos eram representantes de níveis baixos, médios e altos desses anticorpos, de ambos os grupos. Foram reveladas, por anticorpos IgG, 6 bandas antigênicas maiores, correspondentes a aproximadamente 22, 32, 46, 60, 66 e 95 kDa. Três crianças saudáveis (controle) as quais possuíam relativamente altos níveis de Ac anti-SM, reagiram com todas as bandas antigênicas que foram reveladas quando usados os soros de crianças com febre reumática aguda (FRA). Por outro lado, soro de crianças controle com baixos níveis de Ac não mostraram reatividade no WB (nenhuma banda) na diluição usada (soro 1/40). A intensidade das

bandas reveladas com cada soro testado não foi analisada quantitativamente. Contudo, reatividade variada foi notada com soro de ambos os grupos e não puderam ser deduzidos perfis distintos de reconhecimento de epítomos restritos. Os autores relatam que os Ac da classe IgA mostraram um perfil ligeiramente diferente daquele da classe IgG. Níveis de Ac IgM mitógeno-específico no soro de todos os grupos foi muito baixo, sem haver diferenças significantes entre os diversos grupos estudados. Os autores ratificam a hipótese de exacerbação de resposta a nível de Ac em crianças com FRA. Entretanto, os dados com WB demonstram que essa exacerbação de resposta contra SM é meramente na magnitude e não ligada ao reconhecimento de epítomos adicionais que normalmente pudessem não ser reconhecidos pelo sistema imune de controles sadios.

O processo autoimune observado na febre reumática é sugestivo da patogenia da doença, porém, não se sabe se o dano tecidual é uma causa, uma consequência ou é concomitante ao processo⁴⁹.

Alguns autores aventam a possibilidade de que na patogênese da febre reumática esteja envolvida uma predisposição genética, através do complexo maior de histocompatibilidade (HLA)^{8,64,91}.

Tem sido investigada ainda a possibilidade de que formas L estreptocócicas estejam envolvidas na patogênese da febre reumática e da glomerulonefrite, porém não existem claras evidências da participação dessas formas penicilina-resistentes⁷⁶.

1.3.3 - Imunidade

Imunidade contra a escarlatina está associada com a presença da anti-toxina eritrogênica no soro; todavia ela não oferece proteção contra a faringite estreptocócica. A imunidade antitóxica tem especificidade para o tipo de toxina eritrogênica e como existem 5 diferentes tipos imunológicos da mesma há a possibilidade, embora remota, do indivíduo ter a escarlatina uma segunda vez^{46,57,76}.

Das muitas variedades de anticorpos que são gerados em resposta às doenças causadas pelo *S. pyogenes*, somente aqueles dirigidos contra a sua proteína M sabidamente protegem o hospedeiro contra a invasibilidade desse microrganismo. Nas doenças estreptocócicas agudas esses anticorpos geralmente tornam-se detectáveis no soro no prazo de poucas semanas a vários meses, e geralmente persistem por 1-2 anos; em alguns indivíduos pode estar presente até após 10-30 anos. Um indivíduo infectado por uma cepa de estreptococo apenas desenvolve anticorpos contra a cepa do mesmo sorotipo. Visto existirem cerca de 85 tipos sorológicos de estreptococos do grupo A, o indivíduo pode ter durante a vida várias infecções estreptocócicas, aparentes ou não, sendo cada infecção causada por um sorotipo de estreptococo.

Quanto às sequelas pós-estreptocócicas, sabe-se que a glomerulonefrite aguda é causada por relativamente poucos sorotipos de estreptococos nefritogênicos; por conseguinte, persistência de anticorpos anti-M contra um desses sorotipos pode justificar a observação de que um ataque inicial de glomerulonefrite aguda diminui grandemente a probabilidade de um ataque subsequente. Esse efeito protetor não ocorre

na febre reumática, pois uma ampla variedade de sorotipos estreptocócicos podem causar a doença⁷⁶.

Resulta daí a dificuldade de se desenvolver uma vacina anti-estreptocócica de proteção segura, e o que se pretende é encontrar uma vacina polivalente que proteja contra diversos tipos de estreptococos^{76,101}.

1.4 - EPIDEMIOLOGIA

Estudos sobre a ocorrência e propagação das infecções causadas por estreptococos do grupo A ao homem têm elucidado as características epidemiológicas dessas doenças, as quais diferem marcadamente entre si^{75,92}.

As mais importantes infecções estreptocócicas do grupo A são as que acometem o trato respiratório superior. A doença ocorre preferencialmente em crianças, sobretudo na faixa etária compreendida entre 5 e 15 anos, tendo seu auge durante os primeiros anos escolares. Todas as faixas etárias são susceptíveis, não havendo predileção pelo sexo ou pela raça. Disseminação maior da doença ocorre entre pessoas confinadas, por exemplo, em campos militares, em colégios internos, etc. Reservatórios humanos são as maiores fontes do microrganismo para essa infecção. Os organismos são transmitidos de pessoa-a-pessoa, por gotículas de saliva ou secreção nasal, através do contato direto entre indivíduos infectados ou portadores sadios e indivíduos susceptíveis. Os microrganismos podem também ser dispersos no ar e na superfície de fômites por portadores, porém em regra esses estreptococos não são fontes de infecção respiratória. Algumas epidemias de faringite

estreptocócica foram causadas pela contaminação de alimentos. Os sintomas da doença respiratória geralmente se desenvolvem dentro de 2-3 dias. Após uma infecção estreptocócica aguda cerca de 15 a 25% dos pacientes desenvolvem o estado de portador, a despeito de terapia apropriada com penicilina. Variações dessa taxa são dependentes das diferentes localizações geográficas e das estações do ano. Culturas semi-quantitativas não fazem uma diferenciação verdadeira entre a infecção estreptocócica ativa e o estado de portador^{36,75,79,92}.

A incidência das faringites estreptocócicas aumenta nos meses de inverno e início da primavera, enquanto que a incidência das infecções de pele, por sua vez, aumenta nos meses de verão e início de outono¹¹⁰.

A febre reumática aparece como uma complicação da infecção faríngea, enquanto que a glomerulonefrite aguda pode ocorrer tanto após uma faringite estreptocócica como após uma infecção de pele^{47,87,91}.

Relatos de infecções invasivas severas pelo *Streptococcus pyogenes*, hoje denominadas "síndrome do choque tóxico estreptocócico", começaram a ocorrer em meados de 1980, logo após o aparecimento de vários surtos de febre reumática aguda. O aparente aumento na severidade das infecções estreptocócicas tem sido notado nos Estados Unidos, Canadá e Europa. A epidemiologia dos casos reportados sugerem uma mudança na virulência da bactéria e na susceptibilidade do hospedeiro, especificamente quanto à sua imunidade. Casos têm sido reportados em todos os grupos etários, mas a maioria tem ocorrido em adultos. A taxa de mortalidade parece variar muito com a idade da população atingida. Enquanto essa taxa é bastante baixa entre crianças, ela é bastante alta (de 30% até 60%) entre adultos ^{22,25,95}. A

incidência dessas infecções invasivas na população é estimada em 10 a 20 casos/100.000 habitantes¹⁰⁰.

A epidemiologia da febre reumática e glomerulonefrite aguda exibe todas as principais características da epidemiologia da infecção estreptocócica aguda, constituindo um reflexo da prevalência e da gravidade da mesma. É extremamente rara a associação simultânea de febre reumática e glomerulonefrite aguda como sequelas de uma infecção estreptocócica.

Nos países em desenvolvimento, onde as condições de vida, como de habitação e de higiene, são precárias, observam-se aumentos na morbidade e mortalidade decorrentes das doenças estreptocócicas e de suas sequelas^{46,84}.

No Brasil, muitos estudos têm sido feitos a respeito das estreptococcias e de suas sequelas^{8,91,103}. Segundo TELLES¹⁰³, estudos feitos em 1937, em São Paulo, revelam que 12% dos 530 pacientes hospitalizados apresentavam cardiopatia reumática, sendo que em 1951 a porcentagem subiu para 15,9% dos 558 casos relatados, no mesmo estado. No Rio de Janeiro, no mesmo ano, 10% dos 724 pacientes apresentavam a doença reumática. Apesar do sério problema da falta de notificação dos casos ocorridos no nosso meio, Telles constatou, em 1961, que de cada 100 crianças infectadas com *S. pyogenes*, 2 a 4 desenvolviam a doença reumática e cerca de 25% padeciam de glomerulonefrite latente. Segundo o autor, as vítimas da febre reumática encontram-se entre jovens que têm diante de si os anos mais produtivos, ficando patente a relevância sócio-econômica da cardiopatia reumática. Outros estudos, realizados no Rio de Janeiro, em 1981, mostraram que a incidência da doença se mantinha. A gravidade das lesões valvulares em baixa idade foi significativa, atingindo 28% dos doentes⁸.

Em várias regiões do mundo, como Egito, Índia, Paquistão, Indonésia, Filipinas, Tailândia, Nigéria, Sudeste da Ásia, Ilhas do Caribe (Haiti, Trindade, Jamaica), México, América Central e países da América do Sul, a taxa de prevalência da febre reumática é alta e a doença pode ser ainda considerada um problema de Saúde Pública, estimando-se a ocorrência de 15 a 20 milhões de casos novos a cada ano, nesses países^{51,91}.

Nos países desenvolvidos, todavia, os dados são diferentes. Nos EUA, por exemplo, observou-se um declínio na incidência da febre reumática do início do século até o início de 1980, tendo sido mais acentuado após o advento da penicilina^{84,101}. Desde meados de 1980, porém, houve um ressurgimento de infecções invasivas por estreptococo do grupo A nesse país, encontrando-se vários relatos de epidemias de infecções invasivas de tecidos moles, síndrome do choque tóxico e de febre reumática⁹⁵, como a verificada em Salt Lake City, em 1985, e vários outros surtos ocorridos em campos de recrutamento militar²⁶.

No Japão, a mortalidade causada pela febre reumática foi reduzida entre os anos de 1960 e 1981. Contudo, essa diminuição na prevalência da falência cardíaca conduziu a um aumento da cardite latente. Entre 1970 e 1982, de um total de 4658 admissões de crianças em hospitais, 0,13% apresentavam a febre reumática^{63,111}.

QUINN⁸⁴ (1989) relata alta prevalência da doença reumática cardíaca em vários países da América Latina, como Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, México, Panamá e Peru, onde a mesma é apontada como uma das formas mais comuns de doença cardíaca e responsável por 10 a 20% das necrópsias decorrentes de doenças com acometimento cardiovascular.

Recentemente, o Programa Cardiovascular para Pesquisa de Doenças Cardíacas Reumáticas da Organização Mundial de Saúde estimou que a prevalência média global de febre reumática/doença cardíaca reumática em crianças na idade escolar é de 2,2/1.000¹¹². Segundo estudos de HAFFEJEE⁵¹ a prevalência da doença cardíaca reumática varia de 0,05 casos/1.000 na população do Japão e de algumas partes dos Estados Unidos contra 11/1.000 em algumas áreas da Índia.

1.5 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial das infecções estreptocócicas agudas geralmente é feito pelo método bacteriológico clássico, através do qual faz-se a cultura do material clínico em meio de ágar-sangue e após o crescimento das colônias faz-se a identificação das mesmas por meio de provas bioquímicas e/ou por soroaglutinação. Testes de imunofluorescência direta e aglutinação de partículas de látex para a detecção de antígenos estreptocócicos foram desenvolvidos para o diagnóstico rápido dessas infecções. O princípio desses testes é baseado na extração do carboidrato grupo-específico do estreptococo a partir do material clínico, empregando-se como extrator o ácido nitroso. Em seguida, faz-se uma reação com partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-carboidrato obtidos em coelhos^{39,77}. Outro teste de aglutinação foi desenvolvido no qual as partículas de látex foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais ou monoespecíficos polivalentes⁵⁰. Esses testes têm fornecido boa correlação com a cultura^{39,50,77}.

Muitos testes têm sido desenvolvidos e comercializados sob a forma de "kits" para o diagnóstico rápido das infecções

estreptocócicas, tais como ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunoensaio óptico, o qual detecta os antígenos polissacarídicos do estreptococo através de mudanças na reflexão de luz, teste de sonda de DNA, que detecta o estreptococo diretamente da secreção da orofaringe. Entretanto, com relação à sensibilidade, nenhum teste mostra-se superior à cultura bacteriológica, havendo por esse motivo uma recomendação da Academia Americana de Pediatria para que sejam confirmados pela cultura todos os casos com resultados negativos pelos testes rápidos³².

Os problemas mais sérios porém, estão relacionados com o diagnóstico das sequelas pós-estreptocócicas, quando a pesquisa de antígeno, quer por cultura, quer por outros testes, é negativa. Nestes casos, recorre-se a testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos, para auxiliar no diagnóstico individual e nos estudos soroepidemiológicos das infecções estreptocócicas e das doenças pós-estreptocócicas.

1.5.1 - Detecção de Anticorpos Anti- Estreptolisina O (ASLO)

Desde a descoberta de TODD^{104,105}, em 1932, que a estreptolisina O obtida de filtrados de estreptococos hemolíticos era antigênica, provocando o aparecimento no soro de animais normais ou imunizados de anticorpos anti-estreptolisina O (ASLO), desenvolveram-se testes para detectá-los, como a técnica padronizada por Rantz e Randall⁸⁶, que é utilizada até hoje, com algumas modificações, em muitos laboratórios de rotina diagnóstica. Essa técnica pesquisa a presença de anticorpos ASLO no soro de pacientes, através de uma reação de neutralização da estreptolisina O (SLO). Ou seja, os anticorpos ASLO, quando presentes no soro do paciente, bloqueiam a SLO evitando que esta enzima, ao entrar em contato com hemácias, provoque

hemólise. Por outro lado, na ausência dos anticorpos ASLO a estreptolisina O usada na reação fica livre para então promover a lise das hemácias. Deve-se ressaltar que a SLO só é ativa na sua forma reduzida, porém deve ser conservada na sua forma oxidada, efetuando-se a redução somente na hora do uso⁸⁵.

Os níveis de anticorpos ASLO são fornecidos em Unidades Todd (UT). Neonatos têm níveis de anticorpos ASLO de 100-166 UT, aproximadamente, semelhante aos encontrados em adultos, significando a ocorrência de passagem transplacentária destes anticorpos⁶⁹. Na idade escolar os anticorpos ASLO atingem valores mais elevados, devido aos sucessivos contatos com os estreptococos. Desta forma, 50 a 60% das crianças com idade entre 6 a 12 anos têm níveis maiores que 200 UT e quase 50% destas, níveis acima de 400 UT³¹. Alguns autores consideram anormais apenas valores iguais ou acima de 333 unidades Todd para crianças até os 5 anos e de 500 UT para as crianças na idade escolar⁸. Esta é a faixa etária de maior incidência de infecção do trato respiratório superior e conseqüentemente também de febre reumática³¹. Na idade adulta, como já mencionado, os níveis ficam em torno de 100-166 UT. Acima dos 75 anos poucos indivíduos têm níveis maiores que 166 UT, o que se atribui a uma queda da imunocompetência aliada a uma menor exposição à infecção estreptocócica¹.

Os títulos de ASLO são importantes em clínica e fazem parte da rotina laboratorial na avaliação da doença estreptocócica. Entretanto, a ação antigênica da estreptolisina O pode ser bloqueada pelos componentes lipoprotéicos alfa-2 e beta do soro humano, verificando-se, em consequência, uma menor produção de anticorpos (ASLO) em casos de pacientes com grandes quantidades daquelas lipoproteínas circulantes⁸. Deste modo podemos entender que os títulos

de ASLO podem ser falseados, ou não, na dependência das lipoproteínas séricas.

Títulos elevados de ASLO traduzem basicamente uma infecção estreptocócica recente. Os valores médios encontrados por alguns autores⁸ em pacientes reumáticos agudos com idade compreendida entre os 5 e 20 anos foi de 513 unidades Todd, com variações entre 166 e 1250 unidades Todd. Nos reumáticos crônicos o valor médio obtido foi de 233 unidades Todd, variando entre 166 e 625 UT. Como se pode notar por essas observações, nem sempre títulos elevados de ASLO são encontrados nos doentes reumáticos, atribuindo-se o fato à utilização precoce de antibióticos ou ao uso de imunossupressores que impedem a elevação dos títulos desses anticorpos. Títulos pouco elevados ou até mesmo não-detectáveis podem ocorrer ainda nos pacientes reumáticos nos quais a única manifestação clínica da doença é a coréia de Sydenham, devido ao longo período de latência que ocorre entre a infecção aguda pelo estreptococo do grupo A e o aparecimento desse sinal clínico^{48,90}. Por outro lado, outras situações que evoluem com dislipemias ou retenção biliar e ainda a tuberculose pulmonar podem ocasionar níveis elevados de ASLO, inespecificamente⁸.

Apesar dos problemas que podem levar a falsos resultados positivos ou negativos, a determinação dos anticorpos ASLO pela reação de neutralização ainda é tida como a principal ferramenta de investigação das doenças causadas pelos estreptococos, na rotina diagnóstica de vários países. Essa reação é muito útil em estudos epidemiológicos, onde se necessita a confirmação da infecção por estreptococos beta-hemolíticos. Tem sido utilizada ainda como teste auxiliar na confirmação do diagnóstico da febre reumática, quando esses

anticorpos, pelo menos em cerca de 80% dos pacientes, costumam apresentar-se em níveis elevados^{66,107}.

Alguns autores fizeram modificações na técnica de diluições em tubo de Rantz e Randall, com o intuito de tornar o método mais simples e eficiente para a determinação de anticorpos ASLO^{37,73}.

Atualmente, as técnicas em tubo vêm sendo substituídas por técnicas de microtitulação, pelas suas vantagens quanto à economia de reagentes e de tempo²⁸. Além disso, a automatização também tem se desenvolvido nas últimas décadas, facilitando sobremaneira a execução do trabalho e eliminando a subjetividade da leitura visual do ponto final da reação^{30,89}.

Como alternativa à reação de neutralização da SLO, têm sido propostas outras reações para a detecção de Ac contra essa enzima, como a de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com SLO, para triagem de casos suspeitos⁵⁶. Em estudos comparativos dessas duas reações, foram obtidos com a reação de aglutinação 34% de resultados falso-positivos, embora nenhum resultado falso-negativo tenha sido encontrado. Os autores assinalaram como desvantagem dessa reação para triagem o seu elevado custo, sendo viável apenas para detecção de Ac ASLO em uma única amostra de soro⁶⁷.

Existem disponíveis no mercado vários reagentes comerciais de látex sensibilizados com estreptolisina O. GERBER e cols.⁴¹ testaram vários deles em comparação à reação clássica de neutralização da enzima, concluindo que o RHEUMAGEN ASO (Biokit Inc., New Britain, Conn.) era o que apresentava melhor eficiência diagnóstica, podendo ser utilizado como substituto da reação clássica de neutralização. Os demais reagentes apresentaram baixa sensibilidade, inviabilizando seu uso como teste de triagem.

Outras reações que têm sido propostas para a detecção de Ac ASLO são as reações imunoenzimáticas (ELISA e dot-ELISA), que têm a vantagem de permitir a detecção inclusive das subclasses de imunoglobulinas a que os anticorpos pertencem^{12,15,88,94}. REITANO e cols.⁸⁸, comparando a reação de neutralização da SLO com a técnica de ELISA para detecção de anticorpos IgG contra a SLO, concluíram que esta última é mais rápida, mais confiável e mais sensível, tendo as vantagens do uso de apenas uma diluição do soro, leitura espectrofotométrica e possibilidade de adaptação a sistemas de automação⁹⁴. Quanto à reação de dot-ELISA, BARBOSA e cols.¹² relatam que sua utilização com estreptolisina O para detecção de Ac IgG ou IgA sozinhos é de limitado valor para propósitos diagnósticos, enquanto a reação que detecta ambos anticorpos contra a SLO é potencialmente utilizável como ferramenta diagnóstica.

1.5.2 - Detecção de Anticorpos contra Outras Enzimas Extracelulares

Foi verificado que entre 15% a 23% dos pacientes com febre reumática aguda apresentam títulos de Ac ASLO considerados insignificantes ou ainda não detectáveis^{5,17,21}. Além disso, o teste de ASLO é de valor muito limitado nas infecções cutâneas, como a piodermite estreptocócica,²³. Para solucionar estes problemas, desenvolveram-se outras reações de neutralização que visam a detecção de anticorpos contra outras enzimas extracelulares, como a estreptoquinase, a hialuronidase, a desoxirribonuclease B e a NADase,

escolhendo-se para cada uma delas o método adequado para determinar sua atividade, bem como a sua inibição.

Assim, para a titulação dos anticorpos anti-hialuronidase utiliza-se o método turbidimétrico, que detecta um aumento de turbidez da solução na presença dos mesmos. Anticorpos anti-estreptoquinase são detectados através da reação de inibição da lise de coágulos.

A desoxirribonuclease despolimeriza o DNA e isto é visualizado, na prática, através do complexo DNA/verde de metila que sofre descoloração. O anticorpo anti-DNAse inibindo a enzima, mantém o complexo colorido. Existem vários "kits" comerciais para a detecção de anti-DNAse, que aumentam a praticidade e rapidez do teste em relação às reações clássicas que requerem preparo do antígeno (DNA) e diluição dos soros a partir de duas séries distintas. Os estreptococos do grupo A produzem 4 enzimas DNAse (A, B, C e D) distintas antigenicamente, sendo a DNAse B a mais importante delas.

A presença de anticorpos anti-NADase é detectada através de leitura espectrofotométrica dos complexos coloridos formados na reação do NAD com o bissulfito de sódio ou cianeto de potássio. Na ausência desses anticorpos a enzima NADase degrada tais complexos diminuindo a coloração da solução^{4,9}.

Quando se determinam os valores de ASLO e de anti-hialuronidase, aproximadamente 90% dos pacientes com febre reumática ou com glomerulonefrite podem ser diagnosticados. Se for acrescida a determinação da anti-estreptoquinase, os valores elevam-se para 95%. Contudo, na prática, torna-se muito oneroso e trabalhoso realizar estas reações anti-enzimas associadas. Além disso, muitos dos testes para detecção de anticorpos contra as diversas enzimas foram abandonados por problemas na reprodutibilidade e na padronização dos mesmos^{35,66}.

Com o intuito de tornar mais prática e rápida a detecção de anticorpos contra vários produtos extracelulares do estreptococo, JANEFF e cols.⁵⁸ desenvolveram, em 1970, uma reação de hemaglutinação em lâmina, denominada STREPTOZYME (STZ), realizada em apenas dois minutos, na qual são usados eritrócitos de carneiro tratados com formaldeído e sensibilizados com SLO, DNase B, hialuronidase, NADase e estreptoquinase, obtidos de sobrenadante de cultura de estreptococo do grupo A. O reagente STZ foi comercializado (WAMPOLE LABORATORIES, Division of Carter Wallace Inc., Crambury, N.J.), mantendo-se em sigilo os conteúdos de antígenos, toxinas ou hemolisinas utilizados no processo de preparo do mesmo, por constituir patente⁵⁷.

Inúmeros trabalhos foram realizados para a avaliação do reagente STREPTOZYME, em relação a outras reações^{17,24,59,107}. Em um modelo experimental de camundongos imunizados com diversos antígenos celulares, verificou-se a elevação rápida de anticorpos através da reação de hemaglutinação com STZ. Em pacientes com faringite, a elevação dos títulos de anticorpos são detectados mais precocemente pela reação com STZ do que pela reação clássica de neutralização. Após tratamento dos soros com beta-mercapto-etanol, demonstrou-se que os anticorpos detectados pela reação de STZ eram da classe IgM, justificando assim sua detecção precoce⁶¹.

KAPLAN & KUNDE⁶⁰ avaliaram 5 lotes diferentes de STZ frente a soros de pacientes na fase aguda e na fase convalescente da febre reumática, tendo os pesquisadores encontrado dificuldades em interpretar os resultados obtidos, os quais variaram de lote para lote do reagente. Outro inconveniente observado foi que o limiar de reatividade correspondia à diluição 1/100 e qualquer variação que viesse a ocorrer

na composição antigênica dos eritrócitos, afetaria a reprodutibilidade dos títulos de anticorpos⁶⁰. Outros autores também constataram a variação entre diferentes lotes de reagente STZ, além de relatarem a ocorrência de muitos resultados falso-positivos decorrentes do limiar de reatividade muito baixo⁴².

Utilizando ainda a reação de hemaglutinação com o STZ no estudo de soros de pacientes com febre reumática e glomerulonefrite aguda, EL KHATEEB³³ concluiu que essa reação, embora detecte múltiplos anticorpos, é menos sensível do que a associação das reações de neutralização da SLO e da DNase B e portanto seu uso deveria se restringir a laboratórios nos quais não fosse possível a realização das duas reações citadas.

1.5.3 - Detecção de Anticorpos contra Outros Antígenos Estreptocócicos

A reação de hemaglutinação passiva tem sido ensaiada por muitos autores, empregando hemácias adsorvidas com diferentes antígenos estreptocócicos, tais como: carboidrato C grupo-específico, proteína M, sobrenadante de cultura de estreptococos concentrado e sem concentrar^{6,34,43,65,82,96,97,114}. Foram usados vários processos para extração dos diferentes antígenos, salientando-se que os resultados variavam de acordo com o método utilizado na obtenção³⁴.

Os anticorpos contra carboidratos da parede celular dos estreptococos foram pesquisados através da reação de hemaglutinação passiva por diversos autores^{6,43,82,96,97}, verificando-se a elevação dos seus níveis em pacientes portadores de doença valvular cardíaca crônica,

fato este que parece estar relacionado com a patogênese dessa doença⁹⁷. Através dessa reação pode-se observar também que, na infecção estreptocócica, a resposta contra o antígeno polissacarídico era mais lenta, porém mais persistente, em comparação à resposta contra a estreptolisina O, podendo persistir por mais de 8 anos após a fase aguda da febre reumática^{6,96}. Além disso, os níveis de anticorpos contra esse antígeno são mais elevados que os daqueles contra enzimas. Uma possível explicação seria a de que com a morte da bactéria o estímulo antigênico dos produtos celulares teria maior duração, em relação aos produtos extracelulares⁴³.

A técnica de ELISA tem sido utilizada para diagnóstico das infecções estreptocócicas e suas sequelas, empregando-se como antígenos também o carboidrato C, protoplastos de membrana, proteína M e produtos extracelulares da bactéria, para detecção de diferentes isotipos de anticorpos^{7,11,15,93,94,106}. Os dados obtidos com a utilização do carboidrato C revelaram que a maioria dos anticorpos contra esse carboidrato encontrados no soro humano normal pertencia à classe IgG2, enquanto na maioria dos pacientes com sequelas pós-estreptocócicas os anticorpos eram da classe IgG3¹⁰⁶. Os títulos de Ac IgG contra o carboidrato C no soro desses pacientes foram significativamente mais altos do que aqueles dos indivíduos sadios¹⁵, ou daqueles com infecção estreptocócica sem sequela não purulenta⁷. Títulos mais elevados de Ac IgA também foram notados, em relação ao grupo controle⁷. Quanto aos títulos de Ac da classe IgM, contudo, há discrepância de resultados, alguns autores relatando o encontro de diferenças significativas de títulos desses Ac entre os grupos reumático e controle⁷ e outros, títulos semelhantes entre esses grupos¹⁵. Os títulos de Ac obtidos nessa reação contra protoplastos de membrana não se correlacionaram com os níveis detectados de anticorpos ASLO¹¹.

Tendo em vista o que expusemos até o momento, pode-se concluir que as doenças pós-estreptocócicas são de extrema importância, principalmente em nosso meio, onde a febre reumática é considerada um problema de Saúde Pública. Em relação ao diagnóstico laboratorial destas sequelas, a maioria dos laboratórios no Brasil, senão a sua totalidade, como também em outros países, realizam tão-somente a determinação de Ac ASLO, quer produzindo seus próprios reagentes, quer adquirindo "kits" comerciais⁴¹. A determinação de Ac ASLO apresenta uma série de inconvenientes quanto ao diagnóstico das doenças pós-estreptocócicas, como limiar de reatividade não bem definido na nossa população, fornecimento de alguns resultados falso-positivos e outros falso-negativos, os quais são responsáveis pela falha no diagnóstico de cerca de 20% dos pacientes com febre reumática aguda. Outrossim, os vários testes descritos para a determinação dos mais variados anticorpos anti-estreptococos devem ser padronizados para a determinação do valor máximo considerado normal para cada população, não servindo para diagnóstico de febre reumática sem o suporte dos achados clínicos.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

No presente trabalho, propomos abordar melhor os aspectos pertinentes aos perfis imunoquímicos, desenvolvidos por antígenos celulares e extracelulares do *Streptococcus pyogenes* e isotipos de anticorpos presentes nos soros de pacientes com febre reumática, na tentativa de estabelecer correlação com a patogenia como também com o diagnóstico desta doença.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar, por técnica de "immunoblotting", os perfis das bandas de antígenos celular e extracelular do *S. pyogenes* revelados por anticorpos IgG, IgM e IgA em grupos de pacientes com febre reumática, de indivíduos com suspeita de infecção estreptocócica sem diagnóstico clínico de seqüela e de indivíduos não-infectados.

Associar as bandas antigênicas, isotipos de anticorpos e/ou perfil imunoquímico com a doença sintomática, além de determinar componentes imunoquímicos que potencialmente auxiliem no diagnóstico laboratorial da doença em questão.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados têm grau analítico e foram obtidos da Sigma Chemical Co. ou Merck S.A. Indústrias Químicas, a não ser quando especificado. Os meios de cultura foram procedentes da Difco Laboratories.

O presente trabalho foi realizado em duas etapas, constituindo a primeira da padronização de métodos e de condições ótimas de execução das técnicas e a segunda do estudo dos soros de pacientes com febre reumática aguda, de indivíduos com suspeita de infecção mas sem diagnóstico de seqüela e de crianças sadias que compuseram o grupo controle.

BREVE RESUMO DA PADRONIZAÇÃO

Na fase de padronização, quando utilizamos "pools" de soro -padrão-secundário (discrimados adiante no item 3.1.1) - para a realização dos testes, trabalhamos com células de *S. pyogenes* provenientes de cultivos em meio sólido (Ágar-sangue) e em meio líquido (caldo de Todd-Hewitt). Tendo obtido resultados semelhantes com as células provenientes de ambos meios de cultivo, optamos pelo meio líquido por propiciar maior rendimento celular, além de permitir ao mesmo tempo a obtenção dos produtos extracelulares do estreptococo lançados no meio de cultura. As células provenientes do meio de cultura líquido (antígeno celular) foram coletadas após centrifugação e lavagens com tampão fosfato, 0,01 M, pH 7,2 (PBS), no qual foram ressuspensas, e o sobrenadante foi também reservado. Este último, chamado de

antígeno extracelular, foi testado sob a forma bruta e concentrada: com sacarose (10 e 20 vezes) e posteriormente sob liofilização.

Os antígenos celular e extracelular, além de serem analisados na sua forma "bruta", foram ainda submetidos a tratamentos com diferentes detergentes aniônicos, não-iônicos e anfóteros, utilizados comumente para extração antigênica, tais como: Desoxicolato de sódio (DOC) a 0,2%^{29,80}, Triton X-100 (nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 4%, 6% e 8%)⁷⁰, Dodecilsulfato de sódio (SDS) a 5%⁸⁰, "CHAPS" 8 mM^{54,70}, Nonidet P40 (NP40) a 0,5%⁷⁰, a fim de se verificar a influência dos mesmos na obtenção de resultados mais sensíveis, específicos e de fácil visualização nas reações de "immunoblotting".

Foram feitos estudos da melhor forma de manutenção dos antígenos, a fim de manter sua estabilidade e antigenicidade, quando testamos a influência da adição de formalina 4% (v/v), a adição de PMSF com posterior congelamento e por fim a liofilização, também após adição de PMSF.

Em paralelo à cepa de *S. pyogenes*, foram ensaiadas cepas pertencentes aos grupos antigenicamente mais próximos dessa espécie, a saber: cepa de *Streptococcus* sp do grupo C - ATCC nº. 12388 e de *Streptococcus* sp do grupo G - ATCC nº. 12394, obtidas sob a forma liofilizada e rehidratadas na hora do uso, a fim de estudar e eliminar possíveis reações cruzadas no "immunoblotting".

Após estes estudos, optamos por empregar, na 2ª etapa do nosso trabalho, os antígenos celular e extracelular sem tratamento, apenas adicionados de PMSF e liofilizados (sendo que o antígeno extracelular foi reconstituído na hora do uso de maneira a ficar 20x concentrado), uma vez que analisando todos os resultados obtidos

concluimos que estes antígenos tinham apresentado resultados mais promissores.

Para a titulação dos anticorpos ASLO dos soros dos pacientes reumáticos e das crianças do grupo controle, cujos volumes de que dispúnhamos eram ínfimos, foi necessária a adaptação de técnica, já descrita na literatura como micrométodo²⁸, para reduzirmos de 50 µl de soro, necessários para aquele ensaio, para volumes tão pequenos como 5 µl. Para tanto, rigorosa padronização se fez necessária, durante a qual fomos fazendo mudanças na velocidade e no tempo de centrifugação, nos tempos de incubação das várias etapas, nos familiarizando com o "ponto final" da reação e outros detalhes técnicos, até que obtivéssemos concordância com os resultados obtidos com a macrotécnica de neutralização da SLO de Rantz & Randall⁸⁶ (reação de referência). Após acertados detalhes da padronização, testamos cerca de 30 soros, em triplicata, com seus títulos de Ac ASLO previamente determinados pela reação de referência, tendo obtido 100% de concordância entre as duas técnicas.

Outros detalhes de padronização (como das técnicas de SDS-PAGE e de "immunoblotting") encontram-se a seguir, quando descrevemos o que foi utilizado na segunda etapa do trabalho.

3.1 - AMOSTRAS DE SORO

Um total de 228 amostras de soro foi utilizado neste trabalho. Soros-padrão positivo e negativo ("pool" de soros de pacientes com febre reumática e de indivíduos sadios) foram preparados para a fase de padronização das reações, bem como para a avaliação das

mesmas. Ademais, foram ensaiadas amostras individuais de soro obtidas de pacientes com febre reumática aguda (FR), de indivíduos com suspeita de infecção estreptocócica, mas sem diagnóstico de sequela não-suprativa e de crianças clinicamente sadias (grupo controle), como discriminados adiante.

Todos os soros foram conservados a -20°C, após adição de solução salina tamponada com fosfato, 0,01 M, pH 7,2 (PBS) 20 vezes concentrada, na proporção de 1v/20v de soro, até o momento do uso.

3.1.1 - Soros-padrão

Na fase de padronização de técnicas e de tratamento dos antígenos, utilizamos 4 "pools" de soros, preparados pela mistura de soros de 10 indivíduos diferentes cada um.

Os "pools" de soros utilizados constituíram soros-padrão secundários e foram formados pela mistura de soros de pacientes com febre reumática (soros-padrão positivos) e de indivíduos clinicamente sadios (soro-padrão negativo) cujas amostras foram obtidas, respectivamente, da Clínica de Reumatologia do Hospital São Paulo e da Seção de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com títulos de Ac ASLO já previamente determinados. Após a composição do "pool", nós titulamos novamente o soro-padrão para Ac ASLO, pela reação de neutralização de Rantz e Randall⁸⁶.

a) Soro-padrão positivo 1, tendo alto título de ASLO (1.250 UT) - este soro-padrão foi obtido da mistura de soros cujos títulos de ASLO variavam de 833 a 2.500 UT

b) Soro-padrão positivo 2, com título médio de ASLO (625 UT) - este soro-padrão foi obtido da mistura de soros cujos títulos de ASLO variavam de 333 a 625 UT.

c) Soro-padrão positivo 3, com título baixo de ASLO (250 UT), obtido da mistura de soros cujos títulos de ASLO eram iguais ou inferiores a 250 UT.

d) Soro-padrão negativo (166 UT), obtido da mistura de soros de indivíduos sem evidências clínico-laboratoriais de infecção estreptocócica, cujos títulos de ASLO eram iguais ou inferiores a 166 UT.

3.1.2 - Soros de pacientes com febre reumática (Grupo A)

Foram estudadas 56 amostras de soro de pacientes com episódio inicial de febre reumática aguda, provenientes das Clínicas de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina. A faixa etária desse grupo variou de 6 a 13 anos de idade.

O diagnóstico de febre reumática aguda foi baseado nos critérios clínico-laboratoriais de Jones, modificados⁴⁸.

3.1.3 - Soros de indivíduos com suspeita de infecção estreptocócica, sem diagnóstico de seqüela não-supurativa (Grupo B)

Foram analisadas 91 amostras de soro de indivíduos com suspeita de infecção estreptocócica, porém sem diagnóstico clínico de seqüela não-supurativa, das quais 31 apresentavam níveis de anticorpos ASLO iguais ou inferiores a 250 UT, 30 apresentavam tais níveis na faixa intermediária de 500 a 625 UT e as 30 restantes, níveis de ASLO iguais ou superiores a 833 UT. A faixa etária desse grupo variou de 5 a 41 anos.

Essas amostras foram gentilmente cedidas pela Seção de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Imunologia do Hospital do Servidor Público do Estado de São Paulo (HSPESP), os quais fizeram a determinação prévia dos títulos de Ac ASLO desses soros.

3.1.4 - Soros de crianças clinicamente sadias (Grupo C -Controle)

Este grupo foi constituído por 41 amostras de soro provenientes de crianças na faixa etária entre 6 meses a 7 anos de idade, as quais não apresentavam nenhum sinal ou sintoma que sugerisse infecção passada ou presente por *S. pyogenes*.

Essas amostras foram gentilmente cedidas pela Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.2 -TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ASLO NOS SOROS DOS PACIENTES DOS GRUPOS A E C, ATRAVÉS DE REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO DA SLO (REAÇÃO DE REFERÊNCIA)

Todos os soros dos grupos A e C foram por nós titulados para Ac ASLO, através de uma modificação padronizada por nós da microtécnica de neutralização da SLO descrita por CARDOSO²⁸, modificação essa que consistiu principalmente na considerável redução do volume de soro utilizado no ensaio (de 50 µL para 5µL), aumento na velocidade e no tempo de centrifugação das placas de microtitulação (200G por 3 minutos). Essa modificação da técnica descrita e a rigorosa padronização da mesma foi necessária, uma vez que os volumes de soro de que dispúnhamos desses indivíduos eram muito reduzidos.

Os soros a serem titulados foram diluídos inicialmente a 1/100 e 1/160, em tampão fosfato pH 6,5, em duas fileiras da placa de microtitulação, procedendo-se a partir daí a diluições seriadas, na razão 2, de modo a obtermos as seguintes diluições finais: 1/100, 1/160, 1/200, 1/320, 1/400, 1/640, 1/800, 1/1280, 1/1600 e 1/2560, para os soros do grupo A, e de 1/100 até 1/640 para os soros do grupo C (grupo controle), sendo que os níveis de ASLO, expressos em UT, correspondem à recíproca da maior diluição do soro ainda capaz de neutralizar a estreptolisina O, visualizada pela ausência de hemólise na reação.

Os soros foram titulados com o reagente comercial (estreptolisina O liofilizada) da BIOLAB DIAGNÓSTICA S.A., Brasil, no mínimo em duplicata.

Deve-se ressaltar que foram sempre incluídos, nestas reações, os controles da estreptolisina O e das hemácias, assim como, no

mínimo, 1 soro negativo e 2 soros positivos, com títulos de Ac ASLO diferentes, que serviram como soros-padrão da reação, cujas UT eram previamente determinadas pela macrotécnica de neutralização de Rantz e Randall⁸⁶.

3.3 - CEPA BACTERIANA UTILIZADA NA PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

Trabalhamos com a cepa de *Streptococcus pyogenes* - ATCC nº 10389, adquirida sob a forma liofilizada.

As cepas liofilizadas foram rehidratadas, com caldo nutriente, e ativadas por meio de cultivo em caldo Todd-Hewitt. Foi feita incubação por 24 horas a 37°C, após o que as cepas foram repicadas para placas de ágar-sangue de carneiro, para verificação de sua pureza e posterior realização de provas para identificação bioquímica e sorológica.

Assim, após a visualização dos cocos Gram-positivos pela bacterioscopia com coloração de Gram, as colônias apresentando beta-hemólise no ágar-sangue, que davam reação negativa para a prova de produção de catalase, foram submetidas às provas para identificação bioquímica, segundo o Manual of Clinical Microbiology⁷². A confirmação do grupo sorológico da cepa foi feita utilizando-se o "kit" comercial "Streptococcal Grouping kit" (OXOID Diagnostic Reagents), conforme instruções do fabricante.

3.4 - OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS BACTERIANOS

Após ativação da cepa e realização das provas bioquímicas e sorológicas, a mesma foi cultivada, a partir de repique de colônias puras e isoladas provenientes do ágar-sangue, em caldo de Todd-Hewitt, o qual foi incubado sob agitação em "shaker" a 37°C, por cerca de 8 horas.

O crescimento bacteriano obtido em caldo Todd-Hewitt (TH) após a incubação inicial foi transferido para outro frasco de erlenmeyer contendo novo meio de TH, num volume 9 vezes maior do que o inicial. Esse meio foi agora incubado por 18 horas, a 37°C, após o que acrescentou-se mais caldo TH, numa proporção de um volume de inóculo para 4 volumes de caldo, fazendo-se nova incubação por 18 horas, sob agitação em "shaker" a 37°C.

O caldo com crescimento bacteriano foi então centrifugado por 15 minutos, a 10.000 rpm, em centrífuga refrigerada (Sorvall). Após a centrifugação separou-se o sedimento bacteriano do sobrenadante límpido, o qual foi reservado.

Deve-se ressaltar que foi feito controle de pureza do estreptococo antes e após as centrifugações, por meio de bacterioscopia por coloração de Gram.

3.4.1 - Antígeno celular

O sedimento bacteriano (antígeno celular) resultante da centrifugação acima citada foi ressuspenso em (PBS) e acrescido de inibidor de proteases - PMSF 1mM (Sigma Chemical Co.). Após a determinação da concentração protéica da suspensão bacteriana,

adicionou-se 5% (p/v) de leite em pó desnatado (Molico) nessa suspensão, a qual foi em seguida aliquotada em frascos tipo ampola (cerca de 4 ml em cada frasco) e congelada a -20°C para posterior liofilização.

Após a liofilização das alíquotas de suspensão bacteriana, as mesmas foram mantidas em geladeira (4°C) até a hora do uso.

Na hora do uso, pegamos uma alíquota do antígeno celular liofilizado, o qual foi ressuspenso em tampão PBS, transferido para tubos do tipo Eppendorf e lavado três vezes por meio de centrifugações por 90 segundos a 16.000 rpm em microcentrífuga Spin I (Incibrás), para remoção do leite, sendo em seguida ressuspenso novamente em tampão PBS até se obter a mesma concentração anterior à liofilização.

3.4.2 - Antígeno extracelular

O sobrenadante límpido resultante da centrifugação da cultura bacteriana (que contém os produtos extracelulares produzidos pelo estreptococo) o qual havia sido reservado, foi filtrado em membrana filtrante Millipore (poro de 0,45µm de diâmetro) e imediatamente adicionado de inibidor de proteases - PMSF, 1 mM. Em seguida esse sobrenadante foi aliquotado em frascos tipo ampola, congelados a -20°C e liofilizado, sendo mantidos posteriormente a 4°C, até o momento do uso. Uma das alíquotas foi utilizada para dosagem da concentração protéica.

Na hora do uso, tomamos uma alíquota do produto extracelular estreptocócico, concentrado por liofilização, e o ressuspendemos em PBS de modo a obtermos um volume 20 vezes

menor do que o anterior à liofilização. Este sobrenadante de cultura contendo os produtos extracelulares estreptocócicos, concentrado 20 vezes por liofilização, foi por nós denominado de antígeno extracelular.

3.5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DOS ANTÍGENOS

O teor de proteínas dos diferentes antígenos de *Streptococcus* sp foi dosado pelo método de Lowry⁷⁴.

3.6 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS DE *Streptococcus pyogenes* POR "IMMUNOBLOT"

Para identificar e caracterizar os componentes antigênicos de *S. pyogenes*, realizamos com os antígenos citados uma análise imunoquímica pela técnica de "western-blot". Esta técnica consistiu em se efetuar uma eletroforese em gel de poliacrilamida dos antígenos estudados, seguida ou de coloração do gel ou da transferência das frações protéicas separadas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore-HATF-151). Quando realizada a transferência, os antígenos transferidos para a membrana de nitrocelulose foram revelados mediante técnica imunoenzimática.

3.6.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

Os componentes protéicos dos antígenos de *S. pyogenes* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio, SDS/PAGE, sob condições redutoras, como descrito por Laemmli, em 1970⁷¹ e posteriormente por Studier em 1973¹⁰², em sistema descontínuo.

3.6.1.1 - Soluções e reagentes utilizados

- Solução A - 30% acrilamida (p/v) e 0,8% bisacrilamida (p/v) em água bidestilada, armazenadas à 4°C em frasco escuro.
- Solução B - Tris HCl 1,5M; SDS 0,4% pH 8,8
- Solução C - Tris HCl 0,5M; SDS 0,4% pH 6,8
- Solução D - persulfato de amônio 10 mg/ml
- TEMED - N,N,N',N' tetrametilfenileno-diamina
- Tampão de corrida- Tris 0,075N; glicina 0,576M, SDS 0,1% pH 8,3.
- Tampão de amostra - 2,5 ml de solução C, 2,5 ml de SDS 20% (p/v); 2,0 ml de glicerol; 0,1 ml de EDTA 0,1M; 1,0 ml de 2-mercaptoetanol; 0,002% de azul de bromofenol. O tampão foi armazenado à -20°C, em alíquotas.
- Marcadores de peso (massa) molecular (Pharmacia Chem. Co.): fosforilase b (94 kDa); albumina bovina (67 kDa); ovo albumina (43 kDa); anidrase carbônica (30kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lacto-albumina (14,4 kDa).

Preparo do gel de separação: A separação dos componentes protéicos dos antígenos de *S. pyogenes* foi inicialmente efetuada em diferentes concentrações de gel: 10%, 12,5%, 15% e 20%, tendo-se concluído que a melhor concentração era a de 12,5% de acrilamida. Os volumes das soluções utilizadas para o preparo deste gel estão indicados a seguir:

<u>Soluções</u>	<u>Volumes</u>
água bidestilada	10,25 mL
solução A	9,9 mL
solução B	5,0 mL
Solução D	0,3 mL
SDS 10%	0,2 mL
TEMED	0,02 mL

Preparo do gel de empilhamento: A concentração do gel de empilhamento foi de 5% e os volumes das soluções utilizadas para o seu preparo estão indicados a seguir:

<u>Soluções</u>	<u>Volumes</u>
água destilada	3,5 ml
solução A	0,85 ml
solução C	0,65 ml
Solução D	0,025 ml
SDS 10%	0,050 ml
TEMED	0,005 ml

3.6.1.2 - Procedimento

Em placas de vidro retangulares, contendo gel de poliacrilamida, foram aplicadas as amostras de antígenos de *Streptococcus* sp. A corrida eletroforética foi efetuada utilizando-se inicialmente uma voltagem de 50 V e posteriormente 120 V, após a penetração da amostra no gel de separação, até que o corante indicador (azul de bromofenol) atingisse o final do gel de separação. As proteínas contidas no gel de separação foram tratadas com a solução fixadora, coradas e descoradas, ou então transferidas para membranas de nitrocelulose para testes posteriores empregando a técnica de "immunoblot".

3.6.1.3 - Preparo das amostras

As amostras, constituídas dos antígenos celular e extracelular, foram diluídas em igual volume de tampão de amostra (destinado a lisar o antígeno bacteriano em frações menores a fim de permitir a sua separação de acordo com as massas moleculares através da eletroforese), fervidas durante 5 minutos em banho-maria, resfriadas e aplicadas no gel, paralelamente com o padrão de massa molecular diluído também em volume igual de tampão de amostra.

3.6.1.4 - Tratamento e colorações do gel

Proteínas separadas pela eletroforese em gel foram tratadas com solução fixadora e posteriormente coradas, ou com corante Coomassie-Blue ou por solução de nitrato de prata, como segue:

Coloração por Coomassie-Blue

Soluções utilizadas na coloração

- solução fixadora - 50% (v/v) metanol; 7% (v/v) ácido acético glacial
- solução corante - 0,25% (p/v) Coomassie Blue R-250 em solução fixadora
- solução descorante - 5% (v/v) metanol; 7% (v/v) ácido acético glacial

Técnica de coloração

O gel contendo as proteínas foi tratado com solução fixadora por 30 minutos, imerso em solução corante por 60 minutos e, em seguida, em solução descorante, até a evidenciação das bandas protéicas.

Coloração pela solução de nitrato de prata

Soluções e reagentes utilizados na coloração

- solução fixadora - 10% (p/v) ácido tricloroacético
- solução oxidante - dicromato de potássio 0,0034M
- ácido cítrico 0,0032N
- solução corante - nitrato de prata 0,012M
- solução redutora - bicarbonato de sódio 0,028M
- formaldeído 0,018% (v/v)

Técnica de coloração

O gel foi tratado com solução fixadora por, no mínimo, 2 horas, à 4°C, após o que foi submetido à oxidação, coloração com a solução de nitrato de prata e em seguida tratado com solução redutora¹⁰⁹.

3.6.2 - Transferência das bandas antigênicas

Terminada a eletroforese, o gel foi cuidadosamente retirado da placa e as bandas antigênicas, separadas no gel, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, conforme Towbin & cols.¹⁰⁸ e Burnette²⁷, utilizando-se para tanto o tampão de transferência constituído de 25 mM de Tris; 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

3.6.2.1 - Procedimento

Inicialmente a membrana de nitrocelulose foi cortada nas dimensões exatas do gel.

Num reservatório contendo tampão de transferência, um sistema de sobreposição de membranas foi montado obedecendo-se a seguinte ordem: suporte plástico rígido perfurado, 1 esponja de nylon com espessura de 10 mm, 3 folhas de papel de filtro de 0,16 mm (Whatman), 1 folha de papel de filtro de 0,33 mm (Whatman), 1 membrana de nitrocelulose, o gel, 1 folha de papel de filtro de 0,33 mm (Whatman), 3 folhas de papel de filtro de 0,16 mm (Whatman), 1 esponja de nylon e finalmente outro suporte plástico perfurado. Este

conjunto foi colocado rapidamente em cuba de transferência já contendo o tampão, tomando-se o cuidado de eliminar eventuais bolhas de ar.

A transferência foi realizada por 16-18 horas, à 4°C em voltagem constante de 25 V, e corrente de 1A. Após este período, a membrana de nitrocelulose foi corada, com Ponceau S a 0,5% em ácido tricloroacético a 10%, a fim de se testemunhar a eficiência da transferência, e depois descorada para dar continuidade às reações imunoquímicas. A membrana foi então imediatamente processada para análise imunoenzimática das frações (item 3.6.3) e/ou armazenada à 4°C, hermeticamente acondicionada em saco plástico (seladora ARNO).

3.6.3 - Revelação das frações antigênicas transferidas, por técnica de "immunoblot"

A membrana de nitrocelulose foi processada por ensaio imunoenzimático "in situ", segundo Towbin & cols.¹⁰⁸.

Todos os ensaios foram realizados em grupos, incluindo-se número proporcional de soros de cada categoria (dos grupos A, B e C), para permitir melhor comparação da reatividade obtida com os mesmos. Em cada ensaio incluiu-se também um soro "controle positivo da reação", proveniente do "pool" de soros-padrão secundário, citado no item 3.1.1.

3.6.3.1 - Soluções e reagentes utilizados na técnica de "immunoblot"

- solução bloqueadora e diluente do soro e do conjugado: na fase de padronização ensaiamos duas soluções bloqueadoras: uma com 5% (p/v) de leite desnatado (Molico) em tampão PBS e a outra acrescida de 3% de soro normal de cabra, tendo fornecido melhores resultados as soluções acrescidas do referido soro.
- soluções de lavagem: ensaiamos 2 soluções de lavagem: 1 só com PBS e outra com PBS mais Tween 20 a 0,05%, tendo fornecido melhores resultados a solução de lavagem acrescida de Tween.
- conjugados imunoenzimáticos marcados com peroxidase: anti-IgG humana (cadeia γ), anti-IgM humana (cadeia μ) e anti-IgA humana (cadeia α), obtidos comercialmente (Sigma).
- substrato cromógeno: 5 mg de diaminobenzidina (DAB) em 30 ml de PBS e 5 ml de H₂O₂ 30% (p/v) por ml de tampão.

3.6.3.2 - Procedimento da técnica de "immunoblot"

A membrana de nitrocelulose contendo as bandas antigênicas foi lavada por 15 minutos em PBS e incubada com solução bloqueadora por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada com o soro diluído em solução de leite desnatado 1% em PBS acrescida de 3% de soro normal de cabra, por 18 horas, a 4°C, após o que foi lavada: por 2 vezes apenas com PBS seguida por 2 lavagens com PBS acrescido de Tween 20 e novamente por mais 2 lavagens apenas com PBS, por 10 minutos cada lavagem, para retirada do excesso de

anticorpo. Após as lavagens, a membrana foi incubada por 30 minutos, à 37°C, com conjugado de peroxidase anti-gamaglobulina humana previamente titulado (ítem 3.7), também diluído na solução diluente acima citada, segundo o seu título (ítem 3.10). O excesso de conjugado foi retirado com novo ciclo de lavagens. Fez-se então a revelação, dos complexos antígeno-anticorpo formados, com substrato cromógeno. Após a revelação das bandas antigênicas, a reação foi bloqueada com água destilada.

3.6.4 - Cálculo da massa molecular das frações antigênicas

Para definir as bandas antigênicas reativas, a massa molecular foi calculada utilizando-se um "software"- DNASTAR, o qual nos fornece a massa molecular bem como o gráfico das bandas reveladas, com base nos dados de migração eletroforética das bandas em estudo em relação à migração das bandas protéicas do padrão de massa molecular.

3.7 - TITULAÇÃO DOS CONJUGADOS ENZIMÁTICOS

A titulação dos conjugados enzimáticos, obtidos comercialmente (Sigma), foi efetuada testando-se diluições crescentes dos conjugados contra soros-padrão positivo e negativo diluídos a 1/50. A maior diluição do conjugado que forneceu reatividade máxima com o soro-padrão positivo, sem apresentar frações antigênicas inespecíficas com o soro-padrão negativo, foi tomada como título desse conjugado.

3.8 - DETERMINAÇÃO DA MELHOR DILUIÇÃO DO SORO A SER UTILIZADA NA REAÇÃO DE "IMMUNOBLOTTING"

Após a titulação dos conjugados, determinamos a melhor diluição dos soros a serem testados, frente aos diferentes conjugados.

Para tanto, realizamos a reação de "immunoblotting" com diferentes diluições dos soros-padrão positivo e negativo, utilizando os conjugados diluídos segundo os seus títulos anteriormente determinado.

3.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise das porcentagens de reatividade dos soros dos diferentes grupos com as diversas frações antigênicas foi utilizado o teste do quiquadrado para tabelas de contingência 2×2^{81} . Nesse teste, o nível de significância da hipótese de nulidade foi fixado em 0,01 ($\alpha \leq 1\%$) (quiquadrado crítico = 6,64).

Para a avaliação das características imunodiagnósticas de diferentes bandas, os valores de sensibilidade, especificidade, eficiência e preditivos de resultado positivo e negativo foram determinados segundo GALEN & GAMBINO⁴⁰.

4 - RESULTADOS

4.1 - TÍTULO DE ANTICORPOS ANTI-ESTREPTOLISINA O (ASLO) DOS SOROS DOS PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA E DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE

Os resultados obtidos na titulação dos anticorpos (Ac) ASLO dos pacientes com febre reumática (grupo A) e das crianças do grupo controle (grupo C), feita por microtécnica de neutralização da estreptolisina O, por nós padronizada, foram os seguintes:

- **Soros do grupo A** - do total de 56 soros de pacientes com febre reumática, 15 apresentaram títulos de Ac ASLO iguais ou inferiores a 200 UT; 26 apresentaram títulos entre 320 e 640 UT e outros 15, títulos iguais ou superiores a 800 UT.

- **Soros do grupo C** - dos 41 soros do grupo controle, 38 apresentaram títulos de Ac ASLO iguais ou inferiores a 200 UT, 2 deles apresentaram título de 320 UT e 1, título de 400 UT.

4.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DOS ANTÍGENOS

antígeno celular: 3,8 mg/ml

antígeno extracelular concentrado: 3,62 mg/ml

4.3 -CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ANTÍGENOS DE *Streptococcus pyogenes* POR "IMMUNOBLOT"

4.3.1 - *Padronização da eletroforese de antígenos de Streptococcus sp em gel contínuo de poliacrilamida contendo SDS (SDS- PAGE)*

As primeiras caracterizações dos extratos antigênicos foram feitas utilizando-se géis com concentrações de 10%, 12,5%, 15% e 20% de acrilamida. Em gel de 10% a resolução das bandas de baixa massa molecular não foi satisfatória, enquanto que nos géis de 15 e 20%, as bandas de massa molecular maior que 70 kDa não ficaram claras. A concentração que passamos a adotar foi a de 12,5% de acrilamida, pois a resolução das bandas tanto de alta como de baixa massa molecular pareceu-nos satisfatória nessa concentração.

Para se determinar a concentração mínima de antígeno protéico necessária para que as bandas fossem melhor evidenciadas na reação de "immunoblotting", foi feito um gel de poliacrilamida no qual foram aplicadas diferentes concentrações protéicas por cavidade (de 20 a 100 µg por poço de 5 mm de largura). A melhor concentração protéica utilizada na eletroforese foi em torno de 80 µg por poço para o antígeno extracelular e em torno de 40 µg para o antígeno celular.

4.3.2 - Padronização da reação de "immunoblot"

Na padronização da reação de "immunoblot", observamos que a introdução do detergente Tween 20 a 0,05% na solução de lavagem diminuiu sensivelmente a reação de fundo observada nas fitas de nitrocelulose, bem como restringiu as reações inespecíficas a títulos mais baixos ($< 1:100$).

Também durante a fase de padronização da reação, observamos que a introdução de soro normal de cabra (3%) na solução de bloqueio reduzia as reações inespecíficas.

Após a titulação dos conjugados de peroxidase anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM humanos passamos a utilizar: para o conjugado anti-IgG o título 2.000 e para o conjugado anti-IgA o título 1.000. Na titulação do conjugado anti-IgM humano, com os soros-padrão positivos e negativo, não houve evidênciação de bandas antigênicas, para ambos os antígenos aqui estudados, motivo pelo qual deixamos de pesquisar essa classe de anticorpos.

Quando os "blots" foram incubados com conjugado anti-IgG humano, usamos os soros diluídos a 1/200 e quando da incubação com anti-IgA usamos a diluição dos soros de 1/50, de acordo com a padronização feita anteriormente.

4.3.3 - Análise dos "blots" com os soros dos diferentes grupos estudados

Para a análise da reatividade dos anticorpos IgG e IgA presentes nos soros dos indivíduos dos grupos A, B e C, frente aos 2 antígenos (celular e extracelular) fracionados em SDS/PAGE, foi feito um total de 752 "blots".

4.3.3.1 -Bandas antigênicas reveladas nos antígenos celular e extracelular de *S. pyogenes*

Várias bandas antigênicas, com massas moleculares (MM) diferentes, expressos em kDa, foram reveladas por anticorpos (Ac) IgG e/ou IgA nos referidos "blots" de antígenos celular e extracelular. Na Tabela I e Figura 1, encontram-se discriminados as MM de todas as bandas reveladas, como também os percentuais de isotipos de anticorpos dos diferentes grupos que reconheceram as mesmas. A Tabela II mostra numericamente as bandas dos antígenos celular e extracelular reconhecidas por referidos isotipos de anticorpos presentes nos 3 grupos de indivíduos estudados, informando com minúcias quanto às bandas comuns, específicas, não específicas e exclusivas. O antígeno celular apresentou maior número de bandas reativas em relação ao antígeno extracelular. O grupo B reconheceu praticamente as mesmas bandas do antígeno extracelular que o grupo C - controle. No grupo C, anticorpos IgA não reconheceram nenhuma banda dos dois tipos de antígenos estudados.

TABELA I

REATIVIDADE DOS ISÓTIPOS DE ANTICORPOS DOS INDIVÍDUOS DOS DIFERENTES GRUPOS,
COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

MM da Banda em (kDa)	Frações do Antígeno Celular reconhecidas por			Frações do Antígeno Extracelular reconhecidas por					
	Ac IgG dos soros (%)			Ac IgG dos soros (%) (*)					
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
14	5%	1%							
17	5%	1%							
19	2%								
22	30%	8%							
23	43%	10%		4%	3%		11%	1%	2%
28	45%	2%					25%		2%
29	5%	2%			1%				
30	43%	15%	12%	2%	8%		4%	31%	2%
32	36%	19%			2%		16%	2%	
36	41%	9%					57%	15%	17%
38	70%	44%	27%	32%	10%		43%		5%
40	43%	23%	34%				36%	9%	29%
42				20%	22%		34%	53%	32%
43	63%	21%	2%	2%	2%		46%		
46	71%	22%	22%	45%			13%	54%	15%
48	57%	63%	37%	55%	25%		91%	16%	61%
54	96%	26%	37%	2%	23%		46%	38%	15%
57	61%	14%	17%	39%	7%		34%	49%	15%
60	39%	51%	15%	27%	13%		54%	62%	34%
67	91%	31%	32%	7%	10%		5%	13%	2%
73	18%	4%		11%	3%				
78	50%	15%	2%	2%	4%		29%	7%	7%
83	29%	5%			1%		59%	35%	10%
95	59%	2%	5%						
102	71%								
104	32%								
108	64%	1%					2%		2%
110	39%								
116	36%			2%					
118	20%								
125	14%						2%		

(*) Grupo C - ausência de anticorpos IgA

FIGURA 1 - REATIVIDADE DOS ISOTIPOS DE ANTICORPOS DOS INDIVÍDUOS DOS DIFERENTES GRUPOS COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

TABELA II

NÚMERO DE BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR RECONHECIDAS POR SOROS DE:
 PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA (GRUPO A), SEM DIAGNÓSTICO DE SEQUÊLA (GRUPO B) E
 CRIANÇAS NÃO-INFECTADAS POR *Streptococcus pyogenes* (GRUPO C)

Reatividade	Antígeno Celular						Antígeno Extracelular					
	A	B	C	A	B	C	IgG	A	B	C	A	C
Geral	30	23	12	14	15	0	19	13	16	12	8	0
Comum entre A, B e C	12	12	12	0	0	0	13	13	13	0	0	0
Comum entre A e C	12	-	12	0	-	0	16	-	16	0	-	0
Comum entre B e C	-	12	12	-	0	0	-	13	13	-	0	0
Comum entre A e B	23	23	-	12	12	-	13	13	-	6	6	-
Exclusiva	7	0	0	2	3	0	3	0	0	6	2	0
Específica	18	11	0	14	15	0	3	0	0	12	8	0

Numa análise comparativa das bandas dos antígenos celular ou extracelular reconhecidas por anticorpos IgG e/ou IgA, encontramos para os diferentes grupos, o que segue (Tabelas III e IV e Figuras 2 e 3):

1) Grupo de Pacientes com Febre Reumática (Grupo A)

a) Do total de 31 bandas do antígeno celular reveladas por anticorpos IgG e/ou IgA, 18 foram específicas (14, 17, 19, 22, 23, 28, 29, 32, 36, 42, 73, 83, 102, 104, 110, 116, 118 e 125 kDa), sendo 7 bandas (19, 102, 104, 110, 116, 118 e 125 kDa) exclusivas deste grupo.

b) Das 20 bandas do antígeno extracelular reveladas, 4 foram específicas e também exclusivas (40, 46, 104 e 125).

c) Quando os soros reagiram com o antígeno celular, pudemos observar uma distribuição heterogênea da frequência de reatividade com as bandas, destacando-se porém as bandas de 54 e 67 kDa, as quais reagiram com anticorpos IgG e/ou IgA de 3% e 95% dos soros desses pacientes, respectivamente.

d) A frequência de reatividade dos soros com o antígeno extracelular foi também heterogênea. Com este antígeno destacaram-se as bandas de 38, 54 e 95 kDa, que reagiram, respectivamente, com 61%, 93% e 63% dos soros desses pacientes.

e) Em relação ao número de bandas com MM distintos que foram reveladas pelos soros desses pacientes, individualmente, independentemente do conjugado utilizado, temos o seguinte: a) nas reações com antígeno celular, obtivemos um número máximo de 21

TABELA III

REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG E/OU IgA DOS SOROS DOS
DIFERENTES GRUPOS, COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR

MM da Banda em kDa	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C (*)	
	No.soros	%	No.soros	%	No.soros	%
14	3	5%	1	1%		
17	3	5%	1	1%		
19	1	2%				
22	17	30%	7	8%		
23	25	45%	12	13%		
28	25	45%	2	2%		
29	3	5%	3	3%		
30	24	43%	18	20%	5	12%
32	20	36%	19	21%		
36	23	41%	8	9%		
38	42	75%	48	53%	11	27%
40	24	43%	21	23%	14	34%
42	11	20%	11	12%		
43	35	63%	21	23%	1	2%
46	40	71%	20	22%	9	22%
48	41	73%	64	70%	15	37%
54	54	96%	33	36%	15	37%
57	35	63%	17	19%	7	17%
60	32	57%	47	52%	6	15%
67	53	95%	29	32%	13	32%
73	12	21%	7	8%		
78	30	54%	15	16%	1	2%
83	17	30%	6	7%		
95	33	59%	2	2%	2	5%
102	40	71%				
104	18	32%				
108	36	64%	1	1%		
110	15	27%				
116	28	50%				
118	11	20%				
125	8	14%				

(*) Grupo C : ausência de anticorpos IgA

FIGURA 2 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG E/OU IgA DOS SOROS DOS DIFERENTES GRUPOS, COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR

TABELA IV

REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG E/OU IgA DOS SOROS DOS
DIFERENTES GRUPOS, COM AS BANDAS DO ANTÍGENO
EXTRACELULAR

MM da Banda em kDa	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C (*)	
	No.soros	%	No.soros	%	No.soros	%
23	6	11%	1	1%	1	2%
28	14	25%			1	2%
32	2	4%	28	31%	1	2%
36	9	16%			1	2%
38	34	61%	17	19%	7	17%
40	24	43%				
42	22	39%	8	9%	12	29%
43	22	39%	48	53%	12	29%
46	26	46%				
48	14	25%	51	56%	6	15%
54	52	93%	16	18%	26	63%
57	28	50%	35	38%	6	15%
60	21	38%	49	54%	6	15%
67	31	55%	70	77%	14	34%
73	3	5%	20	22%	1	2%
78			1	1%		
83	16	29%	6	7%	3	7%
95	35	63%	32	35%	4	10%
104	1	2%				
108	1	2%			1	2%
125	1	2%				

FIGURA 3 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG E/OU IgA DOS SOROS DOS DIFERENTES GRUPOS, COM AS BANDAS DO ANTÍGENO EXTRACELULAR

bandas/soro (2% dos soros), um mínimo de 6 bandas/soro (2% dos soros) e um número médio de bandas/soro reveladas igual a 12,7; b) nas reações com antígeno extracelular a reatividade dos soros foi bem menor, registrando-se individualmente por soro um número máximo de 12 bandas (2% dos soros), um mínimo de 3 bandas (9% dos soros) e uma média de 6,5 bandas.

2) Grupo de Pacientes sem sequelas (Grupo B)

a) Um total de 12 bandas antigênicas específicas (14, 17, 22, 23, 28, 29, 32, 36, 42, 73, 83 e 108 kDa) foram detectadas quando os soros reagiram com o antígeno celular, porém nenhuma exclusiva desse grupo;

b) Com o antígeno extracelular, apenas a banda de 78 kDa foi detectada específica e exclusivamente por apenas 1 soro desse grupo.

c) No total, 24 bandas foram reveladas pelo antígeno celular e 14 pelo extracelular .

d) Da mesma forma que os soros dos pacientes com febre reumática, os soros dos indivíduos deste grupo tiveram frequência heterogênea de reatividade frente aos dois antígenos, destacando-se a banda de 48 kDa para o antígeno celular (70%) e a de 67 kDa para o antígeno extracelular (77%).

e) Em relação ao número de bandas com MM distintas que foram reveladas individualmente pelos soros desses pacientes, independentemente do conjugado utilizado, temos o seguinte: a) nas reações com antígeno celular, obtivemos um número máximo de 12 bandas (2% dos soros), sendo que 3 soros (3%) não reagiram frente a

esse antígeno. O número médio de bandas reveladas foi igual a 4,6/soro; b) nas reações com antígeno extracelular registrou-se um número máximo de 8 bandas (5,5% dos soros), um mínimo de 1 banda (22% dos soros) e uma média de 4,2 bandas/soro.

3) Grupo Controle (Grupo C)

a) 12 bandas antigênicas foram detectadas na reação com o antígeno celular, predominando as de 40, 48, 54 e 67 kDa (em média reconhecidas por 35% dos soros). Nenhuma delas foi exclusiva para esse grupo.

b) Na reação com o antígeno extracelular foram observadas 16 bandas, a maioria reconhecida por um baixo número de soros, destacando-se entre elas a de 54 kDa, revelada por 63% dos soros.

c) Tanto nas reações com o antígeno celular como com o extracelular a heterogeneidade da frequência de reatividade destes soros foi observada com maior intensidade.

d) Em relação aos números de bandas, com MM distintas, que foram reveladas pelos soros desse grupo, temos o seguinte: a) nas reações com antígeno celular foi obtido um número máximo de 6 bandas/soro (2% dos soros), sendo que 13 soros (32%) desse grupo não reagiram com esse antígeno. O número médio de bandas/soro para esse grupo foi de 2,4; b) com o antígeno extracelular foi revelado um número máximo de 8 bandas/soro (2% dos soros), sendo que nenhuma banda foi revelada por 5 soros (12%). O número médio de bandas para esse antígeno foi de 2,5/soro.

Quando os géis de poliacrilamida foram corados para padrão de proteína total, mais bandas foram evidenciadas no antígeno celular,

que não foram antigênicas para os soros testados. O antígeno extracelular não apresentou mais bandas do que as evidenciadas nos "blots" (Figura 4).

4.3.3.2 - Frequência de positividade dos isotipos de imunoglobulinas frente às diversas bandas, nos diferentes grupos estudados

1) Grupo de Pacientes com Febre Reumática (Grupo A)

Considerando-se as reações realizadas com o antígeno celular frente aos isotipos de imunoglobulinas, foram detectadas no total 31 bandas antigênicas, das quais 30 (97%) por anticorpos da classe IgG e 14 bandas (45%) por anticorpos da classe IgA, tendo sido a banda de 42 kDa a única deste antígeno a ser revelada apenas por Ac IgA. Quando utilizamos antígeno extracelular, foram evidenciadas 20 bandas, das quais 19 (95%) foram reconhecidas por anticorpos da classe IgG e 12 (60%) por IgA. Também com esse antígeno foi reconhecida uma banda apenas por Ac IgA (104 kDa) de um único paciente (Tabela V e Figura 5).

Todos os soros desse grupo de pacientes tinham anticorpos da classe IgG que reconheceram bandas tanto na reação com antígeno celular como na reação com antígeno extracelular, destacando-se porém um maior número de bandas frente ao antígeno celular, que para essa classe de imunoglobulina forneceu um máximo de 20 e um mínimo de 6 bandas/soro, com uma média de 12,8 bandas/soro, enquanto que frente ao antígeno extracelular encontramos um máximo de 11 bandas, um mínimo de 3 bandas, com uma média de 6,1 bandas/soro.

FIGURA 4

**ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (10 %), DE
ALGUNS ANTÍGENOS EXTRACELULAR E CELULAR DE
*Streptococcus pyogenes***

1 e 6 - Marcador de Peso Molecular aparente

2,3 e 4 - SDS-PAGE de antígeno extracelular de *S. pyogenes* corado pela prata (20, 40 e 80 µg de antígeno, respectivamnte)

5 - SDS-PAGE de antígeno celular de *S. pyogenes* corado pelo Coomassie-blue (40 µg de antígeno)

TABELA V

REATIVIDADE DOS DIFERENTES ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINA DOS
 PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA, COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS
 CELULAR E EXTRACELULAR

MM da Banda em kDa	Frações do Antígeno Celular reconhecidas por Anticorpos da classe				Frações do Antígeno Extracelular reconhecidas por Anticorpos da classe			
	IgG		IgA		IgG		IgA	
	no.de soros	%	no.de soros	%	no.de soros	%	no.de soros	%
14	3	5%						
17	3	5%						
19	1	2%						
22	17	30%						
23	24	43%	2	4%	6	11%	1	2%
28	25	45%			14	25%		
29	3	5%						
30	24	43%	1	2%				
32	20	36%			2	4%		
36	23	41%			9	16%		
38	39	70%	18	32%	32	57%	3	5%
40	24	43%			24	43%		
42			11	20%	20	36%	3	5%
43	35	63%	1	2%	19	34%	6	11%
46	40	71%			26	46%		
48	32	57%	25	45%	7	13%	11	20%
54	54	96%	31	55%	51	91%	11	20%
57	34	61%	1	2%	26	46%	2	4%
60	22	39%	22	39%	19	34%	17	30%
67	51	91%	15	27%	30	54%	20	36%
73	10	18%	4	7%	3	5%		
78	28	50%	6	11%				
83	16	29%	1	2%	16	29%	1	2%
95	33	59%			33	59%	2	4%
102	40	71%						
104	18	32%					1	2%
108	36	64%			1	2%		
110	22	39%						
116	20	36%	1	2%				
118	11	20%						
125	8	14%			1	2%		

FIGURA 5 - REATIVIDADE DOS DIFERENTES ISÓTIPOS DE IMUNOGLOBULINA DOS PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA, COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

Os anticorpos da classe IgA foram detectados em 95% e 79% dos soros destes pacientes quando reagiram com os antígenos celular e extracelular, respectivamente. O número de bandas/soro reveladas foi baixo, fornecendo: - para o antígeno celular um máximo de 7 bandas/soro, não tendo sido detectada nenhuma banda no soro de 3 pacientes, ocasionando uma média de 2,5 bandas/soro; - para o antígeno extracelular encontramos um número máximo de 5 bandas, tendo-se verificado um número mais elevado de soros não reativos com este antígeno (12 soros) e consequentemente uma média bastante baixa de bandas por soro (1,4) (Tabela XIV do apêndice).

Considerando-se separadamente as reações com os isotipos de imunoglobulinas, foram observadas as seguintes distribuições de frequência de reatividade das bandas: anticorpos da classe IgG dos soros desses pacientes reconheceram 30 bandas antigênicas do antígeno celular, das quais 7 bandas reagiram com 2% a 20% dos soros (média de 9,1%); 13 reagiram com 29% a 50% dos soros (média de 40%), outras 8 bandas, com 57% a 71% (média de 64,5%) e outras 2 bandas, de 67 e 54 kDa, reagiram respectivamente com 91% e 3% desses pacientes. Levando-se em conta apenas as bandas de MM > 100 kDa (102, 104, 108, 110, 116, 118 e 125 kDa), as quais foram reveladas específica e exclusivamente (exceto a de 108 kDa) nos soros de pacientes com febre reumática, observamos que pelo menos 1 delas aparece em 96,4% dos soros desses pacientes, 2 ou mais delas em 87,5%, 3 ou mais em 66%, sendo que em 39% dos pacientes foram reveladas até 4 dessas bandas em seus soros. Do antígeno extracelular foram reconhecidas, por essa classe de anticorpos, 19 bandas antigênicas, das quais 8 reagiram com 2% a 25% dos soros (média de 9,8%), 7 reagiram com 29% a 46% (média de 38,3%), outras 3 com 54 a 59% (média de 56,7%) e uma banda de 54 kDa reagiu com 91% dos soros. Os anticorpos da classe IgA

reconheceram do antígeno celular 14 bandas, sendo que 9 reagiram com 2% a 20% dos soros (média de 5,8%), 4 bandas, com 27 a 45% (média de 36,3%) e a de 54 kDa reagiu com 55% dos soros. Foram reconhecidas, do antígeno extracelular, 12 bandas por esses anticorpos, das quais 10 reagiram com 2% a 20% dos soros (média de 7,5%) e outras 2 com 30% e 36%, respectivamente de 60 e 67 kDa.

2) Grupo de pacientes sem sequelas (Grupo B)

Os soros, desse grupo de pacientes, reconheceram no total 24 bandas do antígeno celular, das quais 23 foram reativas com anticorpos IgG e 15 com anticorpos IgA. À semelhança do grupo A, também neste a banda de 42 kDa foi revelada somente por anticorpos IgA. Quando utilizamos antígeno extracelular, foram evidenciadas 14 bandas, das quais 13 foram reconhecidas por anticorpos da classe IgG e 8 por IgA (Tabela VI e Figura 6).

Nesse grupo de pacientes, não foram detectados anticorpos da classe IgG contra o antígeno celular no soro de 3 pacientes e contra o antígeno extracelular no soro de um paciente apenas. O número máximo de bandas reconhecidas por esse tipo de anticorpo foi: para o antígeno celular 12 e para o extracelular 8 (com uma média de 3,9 bandas/soro para ambos antígenos) (Tabela XV do apêndice).

TABELA VI

REATIVIDADE DOS DIFERENTES ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINA
DOS PACIENTES SEM DIAGNÓSTICO DE SEQUELA, COM AS
BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

PM da Banda em kDa	Frações do Antígeno Celular reconhecidas por Anticorpos				Frações do Antígeno Extracelular reconhecidas por Anticorpos			
	IgG		IgA		IgG		IgA	
	no.de soros	%	no.de soros	%	no.de soros	%	no.de soros	%
14	1	1%						
17	1	1%						
22	7	8%						
23	9	10%	3	3%	1	1%		
28	2	2%						
29	2	2%	1	1%				
30	14	15%	7	8%				
32	17	19%	2	2%	28	31%		
36	8	9%						
38	40	44%	9	10%	14	15%	3	3%
40	21	23%						
42			20	22%	8	9%		
43	19	21%	2	2%	48	53%		
46	20	22%						
48	57	63%	23	25%	49	54%	3	3%
54	24	26%	21	23%	15	16%	1	1%
57	13	14%	6	7%	35	38%		
60	46	51%	12	13%	45	49%	4	4%
67	28	31%	9	10%	56	62%	26	29%
73	4	4%	3	3%	12	13%	8	9%
78	14	15%	4	4%			1	1%
83	5	5%	1	1%	6	7%		
95	2	2%			32	35%	1	1%
108	1	1%						

FIGURA 6 - REATIVIDADE DOS DIFERENTES ISÓTIPOS DE IMUNOGLOBULINA DOS PACIENTES SEM DIAGNÓSTICO DE SEQUELA, COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

Quanto aos anticorpos da classe IgA, os mesmos foram detectados em 65% dos soros desses pacientes, quando da reação com antígeno celular, na qual obtivemos um número máximo de 6 bandas e em 44% dos mesmos quando da reação com antígeno extracelular, onde encontramos um número máximo de 6 bandas.

Considerando-se separadamente as reações com as duas classes de imunoglobulinas, foram observadas as seguintes distribuições de frequência de reatividade das bandas: anticorpos da classe IgG dos soros desses pacientes reconheceram 23 bandas do antígeno celular, das quais a maioria (18 bandas) reagiu com 1% a 23% dos soros (média de 9,7%); 4 bandas reagiram com 26% a 51% dos soros (média de 37,5%) e uma banda, de 48 kDa reagiu com 63% desses soros. Do antígeno extracelular foram reconhecidas, por essa classe de anticorpos, 13 bandas antigênicas, das quais 6 reagiram com 1% a 16% dos soros (média de 10,2%), 4 reagiram com 31% a 49% (média de 38,3%) e finalmente as outras 3 (43, 48 e 67 kDa) com 53 a 62% dos soros (média de 56,4%). Os anticorpos da classe IgA reconheceram, do antígeno celular, 15 bandas, tendo todas elas reagido com 1% a 25% dos soros (média de 8,9%) e do antígeno extracelular apenas 8 bandas, 7 das quais reagiram com apenas 1% a 9% dos soros e uma banda, de 67 kDa com 29% dos mesmos, fornecendo uma média global de reatividade de 6,5%.

3) Grupo Controle (Grupo C)

Nesse grupo de pacientes só foram detectados anticorpos IgG, os quais reconheceram 12 bandas do antígeno celular e 16 do antígeno extracelular. A reatividade dos soros com o último antígeno foi baixa, pois 6 bandas reagiram apenas com um soro. Nenhum soro desse grupo apresentou anticorpos da classe IgA (Tabela VII e Figura 7).

Os soros desse grupo de pacientes foram muito pouco reativos, sendo que 4 deles não reagiram com nenhum antígeno, outros 13 reagiram apenas com o antígeno extracelular (31,7% dos soros) e outros 5, apenas com o antígeno celular. O número máximo de bandas reconhecidas na reação com o antígeno celular foi 6 e no extracelular 8, obtendo-se uma média de 2,4 e 2,5 bandas/soro, respectivamente nas reações com o antígeno celular e com o extracelular (Tabela XVI do apêndice).

A distribuição de frequência de reatividade das bandas nos soros desse grupo foi a seguinte: no antígeno celular 7 bandas reagiram com 2% a 22% dos soros (média de 10,7%) e as 5 bandas restantes, com 27% a 37% dos mesmos (média de 33,4%). No antígeno extracelular 12 bandas reagiram com 2% a 17% dos soros (média de 7,6%), 3 reagiram com 29% a 34% (média de 30,7%) e uma banda de 54 kDa reagiu com 61% dos soros desse grupo.

Para melhor compararmos a reatividade dos isotipos de imunoglobulinas dos diferentes grupos estudados, frente às frações dos antígenos celular e extracelular, apresentamos a Tabela VIII e as figuras 8, 9, 10 e 11.

TABELA VII

REATIVIDADE DOS ANTICORPOS(*) DAS
CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE, COM AS
BANDAS DOS ANTÍGENOS
CELULAR E EXTRACELULAR

MM da Banda em kDa	Frações dos Antígenos			
	Celular		Extracelular	
	no.de soros	%	no.de soros	%
23			1	2%
28			1	2%
30	5	12%		
32			1	2%
36			1	2%
38	11	27%	7	17%
40	14	34%		
42			12	29%
43	1	2%	13	32%
46	9	22%		
48	15	37%	6	15%
54	15	37%	25	61%
57	7	17%	6	15%
60	6	15%	6	15%
67	13	32%	14	34%
73			1	2%
78	1	2%		
83			3	7%
95	2	5%	4	10%
108			1	2%

(*) ausência de anticorpos IgA

FIGURA 7 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS(*) DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR

*Ausência de Anticorpos IgA

TABELA VIII

REATIVIDADE GERAL, ESPECÍFICA E EXCLUSIVA DOS ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINA DOS SOROS DOS
GRUPOS A e B, COM AS BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR DE

Streptococcus pyogenes

ANTÍGENO CELULAR		
Grupo A	Reatividade Geral:	30 (*)
	Reat. Específica:	18 (14, 17, 19, 22, 23, 28, 29, 32, 36, 73, 83, 102, 104, 108, 110, 116, 118, 125)
	Reat. Exclusiva:	7 (19, 102, 104, 110, 116, 118, 125)
	Anticorpos IgG	Anticorpos IgA
Grupo B	Reatividade Geral:	23 (*)
	Reat. Específica:	11 (14, 17, 22, 23, 28, 29, 32, 36, 73, 83, 108)
	Reat. Exclusiva:	0
	Anticorpos IgG	Anticorpos IgA
ANTÍGENO EXTRACELULAR		
Grupo A	Reatividade Geral :	19 (23, 28, 32, 36, 38, 40, 42, 43, 46, 48, 54, 57, 60, 67, 73, 83, 95, 108, 125)
	Reat. Específica	3 (40, 46, 125)
	Reat. Exclusiva	3 (40, 46, 125)
	Anticorpos IgG	Anticorpos IgA
Grupo B	Reatividade Geral :	13 (23, 32, 38, 42, 43, 48, 54, 57, 60, 67, 73, 83, 95)
	Reat. Específica	0
	Reat. Exclusiva	0
	Anticorpos IgG	Anticorpos IgA

* Vide Tabela I

FIGURA 8 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG DOS SOROS DOS DIFERENTES GRUPOS, COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR

FIGURA 9 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgA DOS SOROS DOS DIFERENTES GRUPOS COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR (*)

(*) Grupo C : ausência de anticorpos IgA

FIGURA 10 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG DOS SOROS DOS DIFERENTES GRUPOS COM AS BANDAS DO ANTÍGENO EXTRACELULAR

FIGURA 11 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgA DOS SOROS DOS DIFERENTES GRUPOS COM AS BANDAS DO ANTÍGENO EXTRACELULAR (*)

(*) Grupo C : ausência de anticorpos IgA

4.3.3.3 - Análise das frações antigênicas relevantes para diagnóstico de febre reumática aguda, identificadas pela técnica de "immunoblotting"

Foram analisadas as bandas obtidas com os soros dos diferentes grupos estudados, visando a identificação de frações antigênicas relevantes para o diagnóstico da febre reumática aguda.

Como podemos observar através da Tabela I e Figura 1, nenhuma fração protéica isoladamente foi reativa para todos os soros dos pacientes com febre reumática. Nos dois tipos de antígeno notamos que frações com a mesma MM ~54 kDa foram as mais reativas com os soros desses pacientes, quando considerados os anticorpos da classe IgG, sendo que na reação com antígeno celular 3% das amostras de soro reconheceram essa banda e na reação com antígeno extracelular, a banda respectiva foi reconhecida por 91% das mesmas. Se considerarmos as reações com os dois antígenos, em conjunto, notaremos a presença de uma banda nessa faixa de MM em todos os pacientes.

Na tentativa de encontrarmos um perfil de bandas antigênicas que nos fornecesse alta sensibilidade combinada com alta especificidade no diagnóstico de pacientes com febre reumática aguda, utilizando como referência o diagnóstico clínico-laboratorial, fizemos associações das bandas mais frequentemente reconhecidas pelos diferentes isotipos de anticorpos desses pacientes, posteriormente analisando-as, estatisticamente, quanto ao seu reconhecimento pelos demais grupos estudados (Tabela IX).

TABELA IX

BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR DE *Streptococcus pyogenes* E SUAS
CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS PARA FEBRE REUMÁTICA

Antígeno	Banda MM (kDa)	Isotipo de Anticorpo	Sens. (%)	Esp. (%)	Efic. (%)	VP (+)	VP (-)	X ² (*) obtido
celular	54	IgG	96	63	82	78	93	41,28
celular	67, 54 e/ou 95	IgG	100	63	84	79	100	48,52
celular	102, 104	IgG	96	100	98	100	95	89,19
celular	23, 95, 102	IgG	100	95	98	96	100	89,09
celular	23, 102, 104 ou 29 ≥ MM ≥ 102	IgG	100	100	100	100	100	97
extracelular	54	IgG	91	39	69	67	76	12,64
extracelular	40, 46	IgG	88	100	93	100	85	72,50
extracelular	46, 83, 95	IgG	100	83	93	89	100	71,50
extracelular	28, 40, 42, 46	IgG	100	71	88	82	100	56,50
celular	48, 54, 60, 67	IgA	95	100	97	100	93	85,54
extracelular	48, 54, 60, 67	IgA	78	100	88	100	77	58,96
celular + extracelular	48, 54, 60, 67	IgA	98	100	99	100	98	93

(*) X² crítico(g.l.1;0,01) = 6,64

Analizando as várias frações antigênicas reveladas pelos anticorpos IgG dos soros dos pacientes reumáticos, no antígeno celular, obtivemos 100% de sensibilidade quando consideramos a associação da reatividade com as frações antigênicas de 67, 54 e/ou 95 kDa, porém a especificidade obtida com essa associação foi baixa (63%). Sensibilidade 100% também pôde ser obtida associando-se a reatividade de 3 bandas, tais como: 23, 95, 102 kDa ou 23, 102, 104 kDa, ou ainda bandas com massa molecular ≤ 29 e/ou ≥ 102 kDa com as quais obtivemos 100% também de especificidade. Como podemos notar na Tabela IX, a diferença de reatividade com essas bandas, entre os grupos, foi significativa ao nível de 1% ($X^2_{\text{obtido}} > X^2_{\text{crítico}}(0,01; \text{g.l.1}) = 6,64$).

Com o antígeno extracelular concentrado, obtivemos sensibilidade 100% na associação da reatividade de Ac IgG com as bandas de 46, 83, 95 kDa ou ainda com as de 28, 40, 42, 46 kDa, as quais apresentaram especificidade 83% e 71%, respectivamente. As frações antigênicas reconhecidas com 100% de especificidade foram as de 40, 46 kDa, as quais, associadas, forneceram uma sensibilidade de 88%. A análise estatística do encontro dessas bandas encontra-se também na Tabela IX.

Com os anticorpos IgA, obtivemos a maior sensibilidade na associação da reatividade com as frações antigênicas (em kDa) 48, 54, 60 e 67, tanto no antígeno celular como no antígeno extracelular, cujos valores foram, respectivamente, de 95% e 78%. Uma vez que os soros do grupo controle não apresentaram anticorpos IgA contra nenhuma fração dos antígenos celular ou extracelular, a especificidade dessas associações foi de 100%.

4.3.3.4 - Análise da reatividade dos soros dos grupos A e B, com as diversas frações antigênicas, segundo o seu título de anticorpos ASLO

Em média, o número de bandas reconhecidas pelos soros de ambos os grupos foi diretamente proporcional ao título de anticorpos ASLO.

Nas Tabelas X e XI apresentamos os números absolutos e percentuais de soros dos grupos A e B, separados segundo o título de anticorpos ASLO, (baixo: 15 e 31; médio: 26 e 30; alto: 15 e 30, respectivamente para cada grupo) que reagiram com as diversas frações do antígeno celular e extracelular, respectivamente. Para melhor visualização apresentamos graficamente os dados percentuais das tabelas acima, nas figuras 12, 13, 14 e 15.

É interessante destacar aqueles pacientes reumáticos cujos títulos de Ac ASLO deram resultados inferiores a 250 UT (15), os quais são mais difíceis de serem correta e/ou precocemente diagnosticados, por lhes faltar esse parâmetro laboratorial. Assim, notamos que 87% desses pacientes (13/15) tinham anticorpos da classe IgG que reconheciam pelo menos 1 banda do antígeno celular com massa molecular > 100 kDa e 100% deles reconheciam as bandas 46 e/ou 57 do antígeno extracelular, enquanto que dentre os 31 pacientes do grupo B, com títulos de ASLO não significativos, nenhum apresentou reatividade com tais bandas. Ainda com relação à reatividade dos anticorpos IgG frente ao antígeno celular, podemos destacar a alta frequência com que as bandas de 54 e 67 kDa foram reveladas pelos pacientes do grupo com febre reumática (93% e 87%, respectivamente),

TABELA X

REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG E IgA DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A e B, DE ACORDO COM O SEU TÍTULO DE ACASO (BAIXO, MÉDIO, ALTO) COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR

MM da Banda em kDa	% de soros com Anticorpos IgG			MM da Banda em kDa	% de soros com Anticorpos IgA		
	título baixo GRUPO A (Total = 15)	título médio GRUPO B (Total = 26)	título alto GRUPO A (Total = 15)		título baixo GRUPO A (Total = 15)	título médio GRUPO B (Total = 26)	título alto GRUPO A (Total = 15)
14	13%		7%	14			
17		4%	13%	17			
19			7%	19			
22	20%	38%	27%	22			
23	33%	46%	47%	23		10%	7%
28	33%	50%	47%	28			
29		8%	7%	29		3%	
30	40%	38%	53%	30	7%	20%	3%
32	27%	38%	40%	32		7%	
36	47%	42%	33%	36			
38	67%	73%	67%	38	27%	17%	10%
40	33%	42%	53%	40			
42			0%	42	7%	15%	23%
43	60%	62%	67%	43		4%	
46	60%	77%	73%	46			
48	53%	58%	60%	48	53%	50%	27%
54	93%	96%	100%	54	27%	62%	73%
57	40%	65%	73%	57	10%	7%	3%
60	47%	38%	33%	60	53%	42%	20%
67	87%	92%	93%	67	33%	19%	33%
73	7%	23%	20%	73	10%	12%	7%
78	60%	42%	53%	78	27%	8%	
83	33%	27%	27%	83	7%	3%	
95	67%	58%	53%	95			
102	67%	69%	80%	102			
104	33%	31%	33%	104			
108	60%	65%	67%	108			
110	27%	31%	20%	110		4%	
116	27%	54%	60%	116			
118	7%	23%	27%	118			
125	7%	15%	20%	125			

Tit. baixo . < 250UT; Tit. médio . 320 - 640 UT; Tit. alto . > 833 UT

FIGURA 12 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A e B, DE ACORDO COM O SEU TÍTULO DE AC ASLO (BAIXO, MÉDIO, ALTO), COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR

FIGURA 13 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgA DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A e B, DE ACORDO COM O SEU TÍTULO DE AC ASLO (BAIXO, MÉDIO, ALTO), COM AS BANDAS DO ANTÍGENO CELULAR

TABELA XI

REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG E IgA DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A e B, DE ACORDO COM O SEU
TÍTULO DE AC ASLO (BAIXO, MÉDIO, ALTO) COM AS BANDAS DO ANTÍGENO EXTRACELULAR

MM da Banda em kDa	% de soros com Anticorpos da classe IgG			MM da Banda em kDa	% de soros com Anticorpos da classe IgA		
	GRUPO A (Total = 15)	GRUPO B (Total = 31)	título médio GRUPO A (Total = 26) GRUPO B (Total = 30)		GRUPO A (Total = 15)	GRUPO B (Total = 30)	título alto GRUPO A (Total = 15) GRUPO B (Total = 30)
23		3%	12%	23		4%	
28	13%		31%	28			
32	7%	3%	7%	32			
36	20%		19%	36			
38	60%	23%	58%	38		8%	7%
40	33%		54%	40			3%
42	33%		31%	42		8%	
43	13%	29%	31%	43	7%	12%	20%
46	53%		46%	46			
48		29%	12%	48	27%	19%	13%
54	87%	13%	92%	54	13%	19%	27%
57	53%		46%	57		4%	7%
60	20%	55%	42%	60	20%	38%	27%
67	80%	74%	27%	67	33%	35%	40%
73			8%	73		16%	10%
78				78			3%
83	27%	16%	27%	83			3%
95	53%	29%	62%	95		8%	
104				104		4%	
108				108			
116				116		4%	
125			4%	125			

FIGURA 14 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgG DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A e B, DE ACORDO COM O SEU TÍTULO DE AC ASLO (BAIXO, MÉDIO, ALTO), COM AS BANDAS DO ANTÍGENO EXTRACELULAR

FIGURA 15 - REATIVIDADE DOS ANTICORPOS IgA DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS A e B, DE ACORDO COM O SEU TÍTULO DE AC ASLO (BAIXO, MÉDIO, ALTO), COM AS BANDAS DO ANTÍGENO EXTRACELULAR

enquanto os soros do grupo B reconheceram tais bandas em um número muito pequeno de soros (6% para ambas as bandas). Podemos salientar ainda que 87% (13) dos soros do Grupo A reconheceram as 2 bandas concomitantemente, e os 13% restantes (2 pacientes) reconheceram pelo menos uma dessas duas, além de terem reconhecido simultaneamente pelo menos 1 banda > 100 kDa.

Quanto à reatividade dos anticorpos da classe IgA, podemos também observar que os soros dos pacientes do grupo A foram mais reativos do que os do grupo B.

4.3.3.5 - Análise dos padrões de bandas encontrados nos diferentes grupos estudados

Apesar da variação individual da resposta imune humoral dos pacientes com febre reumática, procuramos traçar perfis básicos, com número mínimo de bandas comuns entre eles.

Na figura 16 (a e b), observam-se 7 perfis básicos de bandas reveladas pelos soros dos 56 pacientes do grupo A, na reação com o antígeno celular e conjugado anti-IgG, cujas massas moleculares encontram-se na Tabela XII. Os perfis 6 e 7 foram encontrados individualmente nos soros dos 2 únicos pacientes (FR45 e FR25, respectivamente) que não revelaram nenhuma banda acima de 102 kDa, os quais reagiram com o menor número de frações antigênicas (6).

Nenhum soro do grupo controle apresentou padrão de bandas semelhante aos encontrados no grupo A, enquanto 7 soros do grupo B (8%) forneceram um padrão de bandas semelhante ao perfil 6 da

FIGURA 16

PERFIS DE BANDAS OBTIDOS NAS REAÇÕES DOS ANTICORPOS IgG
DOS 56 PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA FRENTE AO ANTÍGENO
CELULAR

A

Representação gráfica dos perfis
de bandas obtidos

PM: Marcador de PM

1: Perfil 1 (25 %)

2: Perfil 2 (25 %)

3: Perfil 3 (23 %)

4: Perfil 4 (14 %)

5: Perfil 5 (09 %)

6: Perfil 6 (02 %)

7: Perfil 7 (02 %)

B

Perfis de bandas obtidos na reação
de "immunoblotting"

TABELA XII

**PERFIS DE BANDAS OBTIDOS NAS REAÇÕES DOS ANTICORPOS
IgG DOS SOROS DE 56 PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA
FRENTE AO ANTÍGENO CELULAR**

Perfis	MM das bandas (kDa)	Soros	
		Nº	%
1	116, 110, 104, 95, 67, 57, 48, 38	14	25
2	108, 102, 78, 67, 60, 54, 46, 40, 28	14	25
3	108, 102, 95, 67, 57, 54, 46, 38	13	23
4	125, 118, 116, 102, 78, 67, 54, 48, 43, 38	8	14
5	102, 95, 78, 54, 46, 43, 40, 36, 22	5	9
6	67, 57, 54, 46, 40, 23	1	2
7	67, 60, 54, 48, 43, 38	1	2

figura 16, encontrado no paciente FR45. Os demais perfis do grupo A não foram encontrados entre os soros do grupo B.

Na figura 17 (a e b) pode-se observar 11 perfis mínimos de bandas reveladas pelos soros dos 56 pacientes do grupo A, na reação com o antígeno extracelular e conjugado anti-IgG. O soro do paciente FR45, cujo perfil de bandas obtido na reação dos anticorpos IgG com o antígeno celular foi encontrado em 7 indivíduos do grupo B, apresentou reatividade com as bandas representadas no perfil 1 (fig.17), o qual não foi observado em nenhum soro dos grupos B ou C. Como podemos notar na Tabela XIII, cada um dos perfis de números 9 a 11 foi obtido por apenas um soro, sendo que o perfil 9, correspondente ao padrão de bandas revelado pelo soro do paciente FR25, foi revelado também pelo soro de 22% dos indivíduos do grupo B. Com exceção do perfil 9, nenhum outro perfil obtido com os soros do grupo de pacientes reumáticos foi observado entre os soros dos demais grupos. Não encontramos nenhum perfil de bandas reveladas que pudesse ser destacado entre os demais grupos.

Com relação às frações reveladas pelos anticorpos da classe IgA, não foi possível traçar perfis que representassem a reatividade dos soros de todos os pacientes, para nenhum grupo, nem com o antígeno celular, nem com o extracelular, uma vez que a maioria dos soros ensaiados revelou no máximo 2 bandas antigênicas. Salientamos apenas um perfil, apresentado por um número maior de soros do grupo A (30%), quando da reação com o antígeno celular, composto pelas bandas de 60, 48 e 38 kDa, que coincide com o perfil de bandas do antígeno celular mais comumente revelado pelos anticorpos da classe IgG dos indivíduos do Grupo sem diagnóstico clínico de sequela (Grupo B).

FIGURA 17

**PERFIS DE BANDAS OBTIDOS NAS REAÇÕES DOS ANTICORPOS IgG
DOS 56 PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA FRENTE AO
ANTÍGENO EXTRACELULAR**

A

PM: Marcador de PM

- 1: Perfil 1 (34 %)
- 2: Perfil 2 (12 %)
- 3: Perfil 3 (12 %)
- 4: Perfil 4 (09 %)
- 5: Perfil 5 (09 %)
- 6: Perfil 6 (13 %)
- 7: Perfil 7 (02 %)
- 8: Perfil 8 (04 %)
- 9: Perfil 9 (02 %)
- 10: Perfil 10 (02 %)
- 11: Perfil 11 (02 %)

B

Perfis de bandas obtidos na reação de "immunoblotting"

TABELA XIII

**PERFIS DE BANDAS OBTIDOS NAS REAÇÕES DOS ANTICORPOS
IgG DOS SOROS DE 56 PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA
FRENTE AO ANTÍGENO EXTRACELULAR**

Perfis	MM das bandas (kDa)	Soros	
		Nº	%
1	67, 57, 42, 40, 38	19	34
2	83, 54, 38, 28	7	12
3	60, 54, 46	7	12
4	95, 60, 54, 46, 43	5	9
5	95, 67, 57, 54, 40	5	9
6	95, 60, 54, 46	5	9
7	83, 54, 46, 38	3	5
8	83, 60, 48, 43, 23	2	4
9	95, 67, 57, 43	1	2
10	95, 67, 57, 54, 42, 38, 36, 28	1	2
11	54, 46, 38	1	2

4.3.3.6 - Análise dos padrões de bandas encontrados nos grupos A e B, segundo o seu título de Anticorpos ASLO

De maneira geral, os soros dos pacientes com febre reumática apresentaram maior reatividade do que os soros dos pacientes do grupo B, independentemente de seu título de ASLO.

Porém, devemos destacar que o soro do paciente do grupo A (FR45) que apresentou perfil cruzado com o perfil de alguns pacientes do grupo B, na reação dos anticorpos IgG com o antígeno celular, tinha título de ASLO <100 UT, enquanto os soros daqueles 7 pacientes do grupo B tinham título ≥ 833 UT.

Na reação dos anticorpos IgG com o antígeno extracelular, o soro do paciente do grupo A (FR25) também apresentou perfil semelhante ao revelado por 22% dos pacientes do grupo B, estes últimos com título de ASLO ≥ 833 UT, enquanto aquele do grupo A apresentava título de ASLO = 100 UT.

5 - DISCUSSÃO

Diversos detergentes têm sido empregados na literatura, para extração antigênica a partir de materiais biológicos^{29,54,70,80}. De acordo com LABETA e cols.⁷⁰, detergentes não iônicos, como NP40 e Triton X-100, embora tenham a habilidade de preservar a antigenicidade e as propriedades naturais das proteínas, são ineficientes em impedir a interação protéica inespecífica, enquanto detergentes como DOC e SDS não têm a neutralidade compatível com as técnicas de fracionamento protéico. Por outro lado, segundo aqueles autores, o detergente anfótero CHAPS combina as vantagens dos demais: é neutro, não-denaturante e eficiente na desagregação protéica. No presente trabalho, foram observadas pequenas variações nos antígenos protéicos obtidos do tratamento com os diferentes detergentes, tanto quando corados para proteínas totais, como na reação de "immunoblotting" (dados não apresentados). Porém, se pequenas alterações vantajosas foram notadas, desvantagens também se fizeram presentes. Pequena melhora na nitidez dos "blots" e diminuição de reações inespecíficas, conseguida com alguns detergentes, foi acompanhada de perda de reatividade do soropadrão positivo com algumas frações antigênicas; outros acentuaram ainda mais as reações inespecíficas, fatos esses que fizeram com que abandonássemos o tratamento com tais detergentes. Por outro lado, os resultados obtidos com a adição do detergente Tween-20 (0,05%) na solução de lavagem dos "blots" estão de acordo com SMITH e cols.⁹⁸, os quais observaram que a lavagem de "dots", com detergentes não iônicos, diminuía em até 80% a quantidade de proteína ligada inespecificamente à membrana de nitrocelulose. A escolha deste detergente foi baseada no fato de ser o mesmo preferido pelos pesquisadores, para essa finalidade, nos trabalhos científicos em geral.

Problemas com a variação antigênica nas diferentes partidas de antígenos obtidas e estocadas foram solucionados com o preparo de

grande quantidade de antígenos celular e extracelular, os quais foram imediatamente acrescidos de inibidor de proteases (PMSF) e submetidos à liofilização. Anteriormente à liofilização foi testado o emprego de formalina 4% (v/v) para fixar o antígeno, tentando estabilizá-lo para que mantivesse suas propriedades inalteradas pela estocagem. No entanto, a formolização não forneceu bons resultados, propiciando o aparecimento de bandas bastante difusas, tanto nos géis submetidos à coloração, quanto nos "blots", o qual apresentou um padrão sem nitidez.

A introdução de soro normal de cabra a 3% nas soluções bloqueadora e diluente do soro e do conjugado foi com o intuito de eliminar possíveis reações inespecíficas, uma vez que os conjugados imunoenzimáticos utilizados neste trabalho foram preparados naquele animal. Notamos que, realmente, os "blots" ficaram mais limpos.

Quanto à preservação dos soros durante o período de tempo decorrido para a conclusão do trabalho, foi utilizado o tamponamento, através da adição de um volume de tampão PBS 20 vezes concentrado para 20 volumes do soro, segundo informação pessoal da Dra. Elsa Segura, do Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mário Fatale Chaben"- Argentina. Na nossa experiência, soros não tamponados tornam-se alcalinos durante o período de estocagem, podendo modificar a reatividade. O tampão PBS, impedindo alteração hidrogeniônica dos soros, confere maior estabilidade de suas propriedades imunológicas durante a estocagem no "freezer".

Outro problema enfrentado neste trabalho foi a determinação dos títulos de Ac ASLO em quantidades ínfimas de soro. Para tanto foi feita modificação da microtécnica descrita por CARDOSO²⁸, de modo que fosse possível titular tais Ac até com

volumes de 5 μ L de soro. São indiscutíveis as vantagens de microtécnicas, quando bem padronizadas e reprodutíveis, pois economizam reagentes, tempo e, principalmente, requerem pouco material clínico, o que é vital em alguns casos, em especial quando os pacientes são crianças da primeira infância. Volumes tão pequenos podem ser conseguidos até mesmo por punção digital, em tubos capilares de microcentrifugação. Por outro lado, quanto menores os volumes com os quais se trabalha, maiores os riscos de erro nas determinações. Os principais cuidados a serem tomados nesta super-microtécnica, sem falar nos cuidados óbvios durante as diluições, é quanto ao rigor exigido no equilíbrio das placas de microtitulação, durante o processo de centrifugação. Notamos que, para a centrifugação fornecer resultados claros, de mais fácil visualização, devem ser centrifugadas duas placas exatamente iguais, além de equilibradas quanto ao peso, também rigorosamente equilibradas quanto à distribuição do líquido nas escavações. Movimentos bruscos com as placas devem ser evitados, assim como evitar parada brusca na centrifugação. Antes de adotar a técnica deve-se treinar a acuidade visual para saber determinar com precisão o ponto final da reação, um dos pontos subjetivos da técnica, nem sempre de fácil visualização, e ao nosso ver, um dos pontos mais críticos e passíveis de erro. Após acerto dos detalhes técnicos, esta super-microtécnica mostrou 100% de concordância com a macrotécnica de neutralização de Rantz & Randall⁸⁶.

Na titulação dos Ac ASLO, obtivemos entre os pacientes com febre reumática aguda um valor médio de 553 unidades Todd (UT), com títulos variando desde <100 até 1.600 UT (Tabela XIV do apêndice), resultados esses que estão de acordo com os observados por ARAÚJO e cols.⁸. Dos 56 pacientes desse grupo, 7 (12,5%)

apresentaram títulos ≤ 166 UT e outros 8 (14,3%), títulos de 200 UT. Na nossa população, o maior título de Ac ASLO ainda considerado normal não está bem determinado. Sabe-se, contudo, que esses valores variam principalmente de acordo com a idade e condição sócio-econômica do paciente. Alguns laboratórios adotam como valores normais títulos de até 166 UT, enquanto outros, até 250 UT. Desta forma, se adotássemos como limite de reatividade o título de 166 UT, teríamos 12,5% dos nossos pacientes reumáticos interpretados como sendo normais em relação ao título de Ac ASLO e se adotássemos o segundo valor (250 UT), 27% deles não seriam diagnosticados por esse parâmetro laboratorial. Esses dados no entanto estão dentro dos limites citados na literatura^{5,17,21}.

O estudo imunoquímico constitui a base para o encontro de diferentes marcadores imunológicos na febre reumática, assim como da compreensão dos mecanismos patogênicos dessa doença. Os referidos marcadores encontram-se de um lado no agente infeccioso e do outro no hospedeiro, cuja resposta específica contribui para o desencadeamento de eventos favoráveis ou desfavoráveis, relacionados à patologia.

Vários produtos extracelulares e antígenos celulares do estreptococo têm sido envolvidos na patogênese da febre reumática, encontrando-se anticorpos dirigidos contra os mesmos em indivíduos com a doença e, na maioria das vezes, também em indivíduos infectados sem sequela e até mesmo em indivíduos sadios. Porém, as pesquisas realizadas até o momento empregam frações antigênicas purificadas, para o encontro de anticorpos específicos, ou ainda, mediante Ac monoclonais, pesquisam-se frações antigênicas determinadas, com o intuito de estabelecer correlação com a patogenicidade da bactéria. Uma análise mais abrangente da resposta imunogênica contra toda a gama de

produtos extracelulares, assim como do extrato bacteriano bruto, ainda não havia sido realizada. Os nossos dados mostram que o grupo B, representado por pacientes assintomáticos, revelou uma reatividade menos intensa com ambos os tipos de antígenos em contraste com o grupo A, de pacientes com febre reumática, que apresentou reatividade maior, notadamente contra o antígeno celular. Desta forma, a resposta inicial no hospedeiro infectado dar-se-ia contra alguns determinantes antigênicos, provavelmente aqueles mais imunogênicos, encontrados nos produtos extracelulares. Com a evolução da doença, os hospedeiros ainda infectados, sofrendo estímulo antigênico continuado, teriam suas respostas imune exacerbadas, passando a responder inclusive contra epítomos da bactéria anteriormente menos expostos e consequentemente mais tardiamente revelados, aumentando qualitativa e quantitativamente a resposta imune. Assim, o estudo dos antígenos brutos, celular e extracelular do estreptococo, possibilitou diferenças nos perfis de reatividade total contra a bactéria e seus produtos, entre os grupos.

Analogamente, soros de pacientes com febre reumática aguda e de crianças sadias (controle negativo) revelaram também diferenças qualitativas de reatividade no que diz respeito a isotipos de anticorpos, com bandas dos antígenos celular e/ou extracelular do *Streptococcus pyogenes*. O terceiro grupo, formado de pacientes com suspeita de infecção estreptocócica, mas sem diagnóstico clínico de sequela não-purulenta, foi incluído neste estudo para que pudéssemos avaliar possíveis marcadores imunológicos, encontrados no primeiro grupo, quanto à sua potencialidade no diagnóstico precoce de sequela pós-estreptocócica e/ou no prognóstico da doença.

Dessa forma, a estratégia adotada foi a de analisar os resultados obtidos com o grupo de pacientes com febre reumática (Grupo

A), comparando-os a seguir com os fornecidos pelo grupo controle (Grupo C). Dados tidos como relevantes, originados dessa comparação de reatividade pelo "immunoblotting" foram então aplicados na avaliação dos pacientes do grupo B.

No Grupo A, o número de bandas antigênicas reveladas a partir do antígeno celular, como esperado, foi maior do que o revelado a partir do antígeno extracelular (Tabela I).

O antígeno celular apresentou perfil de reatividade cujo pico encontra-se na faixa de 54 e 67 kDa. O antígeno extracelular, por sua vez, apresentou um pico de reatividade na banda de ~54 kDa. Estas bandas demonstram que são mais imunogênicas e, portanto, promovem produção maior de anticorpos em pacientes com a doença reumática, fato este que explicaria a maior reatividade das mesmas bandas com os soros de pacientes infectados com a bactéria (Grupo B). A presença de Ac contra essas bandas nos soros do grupo controle sugere a natureza ubiquitária das mesmas e sua homologia parcial com antígenos de outros microrganismos. Contudo, a possibilidade da existência de indivíduos com cicatriz sorológica neste grupo devida a infecções passadas, ainda que subclínicas, com o *S. pyogenes*, não pode ser descartada.

A banda de 67 kDa, do antígeno celular, foi reconhecida por 95% dos soros do grupo A, dado esse compatível com os dados de KILL e cols.⁶⁴, que citam essa banda, correspondente a proteína de membrana do estreptococo, como provável antígeno comum com miosina.

Além desta banda de 67 kDa, outras bandas antigênicas da bactéria, reveladas pelos anticorpos dos pacientes reumáticos, também foram demonstradas estarem relacionadas com antígenos cardíacos, como as de 22, 23, 28, 29, 30, 32, 43, 48, 57, 60, 83, 116 e 118 kDa^{13,14,49,55}. A banda de 116 kDa foi citada ainda como tendo

importante papel na inibição da fagocitose, assim como a fração de 125 kDa, também revelada por esses pacientes¹⁶. Nossos dados mostram que cerca de 45% das bandas do antígeno celular reveladas estão associadas com a referida patogenicidade do estreptococo.

Os pacientes com febre reumática apresentaram grande reatividade (93% dos soros) com a banda de 54 kDa do antígeno extracelular. Alta reatividade foi também encontrada no grupo controle (63%). Tal banda parece estar relacionada com NADase, a qual é citada na literatura como tendo uma massa molecular ~de 55 kDa².

Quanto à estreptolisina O, produto extracelular do estreptococo mais amplamente estudado, encontramos na literatura valores muito discrepantes para a sua massa molecular (de 55 a 80 kDa)^{2,3,19} ficando portanto bastante difícil a identificação da banda relativa a essa enzima nos nossos achados.

Anticorpos de 25% dos pacientes reconheceram a banda de 28 kDa, que poderia estar relacionada com o superantígeno descrito na literatura⁷⁸, que estimulam grandes números de células T, CD4⁺, por vias não tradicionais, levando a produção exagerada de citocinas e anormalidades clínico-patológicas severas.

Bandas antigênicas de 23, 32, 60, 67 e 95 kDa foram detectadas nos soros do grupo A e do grupo C do nosso estudo, concordando com os achados de BAHR e cols.¹⁰, os quais encontraram essas bandas como as mais intensamente reveladas por crianças com febre reumática e com menor intensidade também por crianças saudáveis, selecionadas para o estudo por apresentarem em seus soros altos títulos de Ac contra produto extracelular ("Streptococcal Mitogen"- SM), detectados previamente por técnica de ELISA. Por outro lado, a banda de 46 kDa, também citada por aqueles autores como revelada pelos 2

grupos de crianças, foi revelada exclusivamente pelo soro de 46% de nossos pacientes reumáticos. Outras bandas encontradas neste trabalho, próximas de 70 (73) e de 30 (32) kDa podem corresponder às citadas ainda por aqueles autores¹⁰ como proteínas parcialmente purificadas, referidas como componentes de SM, às quais são atribuídas atividades biológicas tais como: mitogenicidade para linfócitos T CD4, ativação policlonal, indução da síntese de interferon e aumento do seu poder adjuvante.

Anticorpos IgG foram predominantemente detectados nas crianças com febre reumática, quando comparados com anticorpos IgA. Aqueles anticorpos foram encontrados em todas as crianças do grupo A, seja contra antígeno celular ou contra antígeno extracelular, ao passo que anticorpos IgA contra antígeno celular falharam em 3 crianças e contra antígeno extracelular, em 12 das mesmas. No presente trabalho, anticorpos IgM não foram encontrados em nenhum soro dos três grupos estudados, nem contra o antígeno celular, nem contra o extracelular, ao contrário de BARRET e cols.¹⁵ que detectaram esse isotipo dirigido contra carboidrato C da parede do estreptococo, utilizando técnica de ELISA. No entanto, os mesmos autores relatam que os títulos desse anticorpo apresentados tanto por pacientes reumáticos como por indivíduos sadios não foram significativamente diferentes. Este isotipo de anticorpo também não foi encontrado no soro de pacientes suspeitos de sequela por BARBOSA e cols.¹², quando empregou antígeno extracelular na técnica de dot-ELISA, enquanto outros autores¹⁰ empregando sobrenadante de cultura de estreptococo, concentrado e parcialmente purificado, encontraram pela técnica de ELISA títulos muito baixos desse isotipo, também sem diferenças significantes entre os grupos estudados.

Sub-classes de anticorpos IgG serão estudados posteriormente pois, dependendo da sub-classe encontrada, haverá possibilidade de discriminar melhor o grupo controle do grupo doente, ademais, com possibilidade de detectar marcador para prognóstico da febre reumática. De acordo com os dados obtidos por TODOME e cols.¹⁰⁶, a maioria dos anticorpos IgG anti-estreptococo encontrados no soro humano normal pertencia à classe IgG2, enquanto na maioria dos pacientes com sequela pós-estreptocócica os anticorpos eram da classe IgG3.

Anticorpos IgA parece-nos ser um marcador imunológico bastante interessante pois, enquanto no grupo controle nenhum soro revelou esse isotipo de anticorpos contra nenhum dos dois antígenos, no grupo A quase todos os pacientes apresentaram esses Ac contra o antígeno celular e, se considerados também os dirigidos contra o antígeno extracelular encontraremos quase a totalidade dos pacientes com esse isotipo (98%). Um paciente, em particular, não apresentou Ac IgA contra nenhum dos dois antígenos. Considerando os perfis imunoquímicos desenvolvidos por esse soro contra os antígenos celular e extracelular, observamos que o mesmo não se enquadra nos padrões imunoquímicos dos demais, tendo apresentado baixa reatividade de maneira geral, inclusive contra a SLO, contra a qual foi detectado um título de 100 UT. Desde que não nos foi possível encontrar esse paciente, as hipóteses por nós levantadas e que são consistentes com as de alguns autores^{8,48} para o encontro de tais dados seriam: medicação precoce do paciente com antibiótico ou imunossupressor, acarretando inibição da produção de anticorpos, ou longo período de latência entre a infecção aguda pelo estreptococo e o aparecimento do sinal clínico da doença, ou ainda o paciente apresentaria em seu soro grandes quantidades de

lipoproteínas alfa-2 e beta, sabidamente bloqueadoras da ação antigênica da SLO (e "quicá" de outros antígenos).

Os anticorpos IgA são bastante interessantes, porque em algumas infecções parasitárias e virais estes anticorpos são encontrados já na fase aguda e parecem compartilhar os mesmos epítomos reconhecidos por anticorpos IgM, marcador este da fase aguda da maioria das infecções. Todavia o encontro de Ac IgA já na fase mais avançada da doença, a exemplo da glomerulonefrite aguda, relaciona-se com a gravidade da doença⁶⁸. Na fase crônica das doenças, parece que esses Ac IgA têm uma reatividade contra epítomos antigênicos diferentes daqueles da fase aguda, à exemplo da forma digestiva da doença de Chagas⁸³.

Outro aspecto a ser estudado posteriormente é a mudança do perfil imunológico em pacientes submetidos ao tratamento, efetuando-se o seguimento de Ac IgG e suas sub-classes, assim como IgA contra antígenos celulares e extracelulares.

Levando-se em conta as bandas antigênicas consideradas relevantes por estarem relacionadas com a patogenia da febre reumática, Ac IgG e IgA foram investigados, a fim de encontrar potenciais marcadores imunológicos que eficientemente efetuem o diagnóstico laboratorial da doença. Além disso, algumas bandas encontradas consistentemente na maioria dos soros dos doentes foram também investigadas para essa finalidade.

Desta forma, notamos que as associações das reatividades dos Ac IgG contra bandas do antígeno celular de 23, 102 ou 104 kDa ou ainda contra aquelas com massa molecular ≤ 29 ou ≥ 102 kDa apresentaram os valores máximos de parâmetros imunodiagnósticos (Tabela IX). É interessante salientar, uma vez mais, que a banda de 23

kDa é citada na literatura como tendo associação com antígenos cardíacos, tendo sido reconhecida por considerável número de soros do grupo reumático (43%) e em nenhum soro do grupo controle, levando-nos a crer que a mesma corresponde a epítopo antigênico menos exposto e portanto reconhecido mais tardiamente pelos anticorpos humorais de indivíduos reumáticos. Da mesma forma acreditamos acontecer com as bandas acima de 102 kDa, as quais não foram também encontradas nas crianças do grupo controle.

Em vista destes dados, é possível propormos que a técnica de "immunoblotting", valorizando a detecção de anticorpos contra essas frações antigênicas, seja considerada como uma técnica confirmatória para resultados de exames convencionais duvidosos. Ademais, a interpretação de resultados de reatividade contra bandas de baixa massa molecular ou ainda de altos valores de kDa, é muito mais fácil do que a análise de um espectro complexo de bandas com kDas intermediários.

Propomos ainda que seja valorizada a detecção combinada de anticorpos IgA contra antígenos celulares e extracelulares, pela mesma técnica, pela aparente possibilidade de sua associação com lesões.

Anticorpos IgG contra antígenos extracelulares não forneceram, aparentemente, discriminação entre os grupos A e C, quando consideradas apenas as frequências de reatividade com as diversas frações antigênicas.

Apesar dessa aparente impossibilidade de discriminação entre os grupos, considerando individualmente a reatividade de cada paciente contra todas as bandas, uma vez que nosso estudo é qualitativo e não quantitativo, podemos traçar perfis básicos de reatividade dos anticorpos IgG de nossos pacientes, tanto para o antígeno celular como

para o extracelular, com os quais nada têm a ver os soros do grupo controle. Consideramos de grande valor também a adoção desses perfis mínimos de bandas, como critério auxiliar no diagnóstico de casos duvidosos. Quanto ao aspecto quantitativo, estudos posteriores se fazem necessários de forma a encontrar o limiar de reatividade para anticorpos IgG, que possibilite uma melhor diferenciação entre os 2 grupos, uma vez que a intensidade das bandas obtidas com os mesmos foi substancialmente diferente.

Analizando agora o grupo B, de pacientes com suspeita de infecção estreptocócica, sem diagnóstico de sequela, notamos que, em relação à reatividade de seus anticorpos IgG contra o antígeno extracelular, os mesmos não poderiam ser discriminados do grupo controle, ainda que apresentem altos títulos de Ac ASLO. Se compararmos a reatividade obtida contra o antígeno extracelular pela reação de "immunoblotting" tomando como "padrão ouro" a reação de neutralização da SLO, apenas qualitativamente, encontramos valores de parâmetros imunodiagnósticos semelhantes aos encontrados por BARBOSA e cols.¹², em relação aos anticorpos IgA, enquanto que em relação à reatividade dos anticorpos IgG, como era esperado, os dados são bastante discordantes principalmente quanto à especificidade (co-negatividade), no nosso caso (13%) muito baixa. Tal discordância é justificável, uma vez que aqueles autores, trabalhando com técnica quantitativa (dot-ELISA), adotaram limiar de reatividade, podendo dessa forma desconsiderar reações inespecíficas do grupo controle.

Quanto aos perfis imunoquímicos desenvolvidos neste grupo de pacientes (grupo B) podemos dizer que aqueles com perfis semelhantes aos do grupo A, certamente têm uma probabilidade maior

de desenvolver a doença sintomática posteriormente, devendo-se monitorá-los como medida de prevenir o desenvolvimento da doença.

O grupo B caracterizou-se por não apresentar anticorpos IgG contra banda do antígeno celular com massa molecular >102 kDa, com exceção de um paciente (banda de 108 kDa). Neste grupo, 97% dos pacientes apresentaram anticorpos IgG contra antígeno celular e 99% contra antígeno extracelular, enquanto anticorpos IgA contra antígeno celular foram demonstrados em 65% dos pacientes e contra o antígeno extracelular em 44% dos mesmos.

Se adotarmos como critério de positividade para o diagnóstico da febre reumática a presença de anticorpos IgG contra as frações do antígeno celular de 23, 102 ou 104 kDa como propusemos acima, teríamos no grupo B 9 (10%) casos positivos para aquela doença, dos quais 1 apresenta título de ASLO de 500 UT, 2 título de 833 UT e os 5 restantes título de 1250 UT. Acrescente-se a isso o fato de 7 desses 9 pacientes terem apresentado perfil básico de bandas reveladas do antígeno celular semelhante ao perfil 6 apresentado pelo grupo A. Desses 7, temos 6 apresentando perfil básico de bandas do antígeno extracelular que também cruza com perfil apresentado pelo grupo doente (perfil 9). E finalmente, como último dado relevante a ser considerado, apenas 1 desses pacientes não apresenta anticorpos IgA contra frações dos antígenos celular, e/ou extracelular. Por apresentarem esses dados, acreditamos que esses pacientes necessitem de mais cuidados do que os demais do mesmo grupo, devendo-se observar se a curto prazo de tempo terão a sintomatologia da FR, em especial aqueles que apresentam Ac IgA.

6 - CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados nos permitem ter uma visão mais ampla e aprofundada sobre a resposta imunológica dos pacientes com febre reumática aguda contra antígenos estreptocócicos, do que a fornecida por dados imunológicos convencionalmente obtidos em laboratórios de diagnóstico.

Foram encontrados anticorpos IgG e IgA estando ausentes anticorpos IgM no grupo de pacientes com febre reumática aguda, sendo necessários estudos posteriores para elucidar alguns aspectos quantitativos da resposta imune e relativos a sub-classes de anticorpos envolvidas nessa resposta.

Os resultados obtidos sugerem que os perfis imunoquímicos desenvolvidos principalmente por antígeno celular e anticorpos IgG, em conjunto com a presença de anticorpos IgA, constituem marcadores precoces da patogênese da febre reumática.

Os dados imunoquímicos mostraram ainda capacidade potencial para discriminar pacientes reumáticos de indivíduos saudáveis, contribuindo para o diagnóstico laboratorial da febre reumática ou para confirmação de casos suspeitos, adotando o critério da presença de anticorpos IgG contra bandas ≥ 102 e/ou ≤ 29 kDa do antígeno celular do *Streptococcus pyogenes* paralelamente ao encontro de anticorpos IgA.

7 - RESUMO

FEBRE REUMÁTICA: Perfis imunoquímicos desenvolvidos por antígenos celulares e extracelulares do *Streptococcus pyogenes* e isotipos de anticorpos de pacientes com a doença.

A febre reumática é uma das sequelas da infecção causada por *Streptococcus pyogenes*, afetando notadamente crianças e jovens, com altas taxas de morbidade e mortalidade em várias regiões do mundo, incluindo Brasil. Perfis imunoquímicos desenvolvidos por antígenos celulares e extracelulares desta bactéria e isotipos de anticorpos presentes em pacientes com febre reumática foram averiguados, em virtude da escassez de informação a este respeito na literatura.

Na primeira fase do trabalho, as condições para o preparo de antígenos, bem como de técnicas, em especial a técnica super-micro de neutralização de anticorpos (Ac) anti-estreptolisina O (ASLO) foram padronizadas. Na segunda etapa, foram identificadas as bandas de antígenos celulares e extracelulares reconhecidas por 56 soros de pacientes com febre reumática (Grupo A), 91 soros de indivíduos sem diagnóstico de sequelas não-supurativas da infecção, mas com títulos baixos, médios e altos de Ac ASLO (Grupo B), e 41 soros de crianças sem infecção (Grupo C).

Em pacientes com febre reumática, Acs IgG e IgA foram detectados, mas Acs IgM não foram encontrados. Anticorpos IgG de pacientes do grupo A reconheceram um total de 30 bandas do antígeno celular, sendo específicas 18 (14, 17, 19, 22, 23, 28, 29, 32, 36, 73, 83, 102, 104, 108, 110, 116, 118 e 125 kDa). O resto das 12 bandas foram consideradas não específicas por serem reconhecidas por soros do grupo C. Um total de 19 bandas do antígeno extracelular foi reconhecido

por Acs IgG do grupo A, sendo apenas 3 bandas (40, 46, 125 kDa) específicas.

No grupo C, Acs IgA não foram detectados. Um total de 14 bandas (23, 30, 38, 42, 43, 46, 48, 54, 57, 60, 67, 73, 78 e 116 kDa) do antígeno celular foram identificadas por Acs IgA do grupo A. No antígeno extracelular, 8 bandas (38, 48, 54, 60, 67, 73, 78 e 95 kDa) foram reconhecidas por Acs IgA do mesmo grupo.

Critério adotado de combinar dados imunoquímicos ou seja, bandas iguais ou maiores que 102 kDa e/ou bandas iguais ou menores que 29 kDa do antígeno celular de *S. pyogenes*, acrescido da presença de Acs IgA, possibilitaram a discriminação de pacientes com febre reumática e de não infectados, fornecendo máxima sensibilidade, especificidade, eficiência, bem como de valores preditivos de resultados positivo e negativo.

Ademais, os achados de Acs IgG contra banda de 28 kDa que está relacionada a antígeno do tecido cardíaco, um dos 6 perfis imunoquímicos fornecidos por antígeno celular e Acs IgG do presente estudo, e a presença de Acs IgA parecem constituir sinais precoces associados à patogênese da febre reumática.

Desta forma no grupo B, 9 pacientes revelaram a banda de 23 kDa do antígeno celular, destes 7 apresentaram perfis compatíveis com os do grupo A, sendo que apenas 1 deles não apresentou Acs IgA. Os dados sugerem que estes pacientes tendem a evoluir para a forma sintomática da febre reumática, requerendo acompanhamento clínico e laboratorial cuidadoso.

8 - SUMMARY

RHEUMATIC FEVER: Immunochemical profiles developed by cellular and extracellular antigens of *Streptococcus pyogenes* and antibody isotypes from patients with the disease.

The rheumatic fever is one of the sequelae from the *Streptococcus pyogenes* infection, affecting mainly children and young persons, with high rates of morbidity and mortality in many regions of the world. Immunological profiles developed by cellular and extracellular antigens from this bacterium and antibody isotypes found in the patients with rheumatic fever were investigated, due to the scarcity of information about this aspect in the literature.

In the first step of this work, conditions to prepare antigens, as well as of techniques, in particular the super-micro technique for the neutralization of antistreptolysin O (ASLO) antibodies (Abs), were standardized. In the second step, bands of cellular and extracellular antigens recognized by 56 serum sera from patients with rheumatic fever (Grupo A), 91 sera from individuals with no diagnosis of suppurative sequelae from the infection, but with low, moderate and high ASLO titers (Group B), and 41 sera from children with no infection (Group C) were identified.

In patients with rheumatic fever, IgG and IgA antibodies were found, but IgM antibodies were absent. IgG antibodies from rheumatic fever patients recognized 30 bands of the cellular antigens, of these 18 were specific (14, 17, 19, 22, 23, 28, 29, 32, 36, 73, 83, 102, 104, 108, 110, 116, 118 e 125 kDa). The remaining 12 bands were considered nonspecific because they were recognized by sera from the group C. A total of 19 bands of the extracellular antigen were recognized

by IgG Abs from the group A and 3 of these (40, 46 and 125 kDa) were specific.

In the group C, no IgA Abs were detected. A total of 14 specific bands (23, 30, 38, 42, 43, 46, 48, 54, 57, 60, 67, 73, 78 and 116 kDa) of the cellular antigen were identified by IgA Abs from the group A. The extracellular antigen had 8 bands (38, 48, 54, 60, 67, 73, 78 and 95 kDa) recognized by IgA Abs from the same group.

A criterion adopted of combining immunochemical data, i.e. bands equal or higher than 102 kDa and/or bands equal or lower than 29 kDa of the cellular antigen of *S. pyogenes* plus the IgA Ab finding, allowed to discriminate rheumatic fever from noninfected individuals, providing maximum sensitivity, specificity, efficiency as well as predictives of positive and negative results.

Moreover, the findings of IgG Abs to 23 kDa of the cellular antigen which is associated to the heart tissue antigen, one of those 6 immunochemical profiles provided by cellular antigen and IgG Abs from this study, and the presence of IgA Abs seem to constitute early immunologic signals related to the pathogenesis of the rheumatic fever.

Thus in the group B, 9 patients revealed a 23 kDa band of cellular antigen, 7 of these showed immunochemical profiles consistent with those from the group A, and lacking IgA Abs in only one of them. The data suggest these patients are prone to develop rheumatic fever, requiring a close clinical and laboratory follow-up.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

01. AGUZZI, F., REZZANI, A., NESPOLI, L., MONAFO, V., BURGIO, G.R. - Antistreptolysin O titer fifty five years after Todd: a reappraisal of its clinical significance. Boll.Ist.Sieroter., Milan, v.67, n.2, p.162-164, 1988.

02. ALOUF, J.E. - Streptococcal toxin (Streptolysin O, Streptolysin S, Erythrogenic Toxin). Pharmacol.Ther., Oxford, v.11, n.3, p.661-717, 1980

03. ALOUF, J.E., RAYNAUD, M. - Purification and some properties of streptolysin O. - Biochimie, Paris, v.55, n.10, p.1187-1193, 1973.

04. ALOUF, J.E., SAINT MARTIN, J., EYQUEM, A., GEOFFREY, C., JACQUEMOT, C., DUPHOT, M. - Titrage des anticorps sériques humains anti-exoprotéines du streptocoque du groupe A par microhémagglutination en plaque: corrélation avec les taux de l'anti-streptolysine O et de divers anti-enzymes. Ann.Microbiol., Paris, v.129A, p.447-472, 1978.

05. AMIGO, M.C., MARTÍNEZ-LAVÍN, M., REYS, P.A. - Acute rheumatic fever. - Rheum. Dis. Clin. North. Am., Philadelphia, v.19, n.2, p.333-350, 1993.

06. APPLETON, R.S., VICTORICA, B.E., TAMES, D., AYOUB, E.M. - Specificity of persistence of antibody to the streptococcal group A carbohydrate in rheumatic valvular heart disease. J.Lab.Clin.Med., St. Louis, v.105, p.114-119, 1985.

07. ARAJ, G.F., MAJEED, H.A., YOUSOF, A.M., AYOUB. - Immunoglobulin isotype response to the group-A streptococcal carbohydrate in humans. APMIS, Copenhagen, v.3, suppl., p.8-12, 1988.

* De acordo com a norma preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) - NBR 6023/89. As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1995

08. ARAÚJO FILHO, R., SCALLA, L., MARANHÃO, E.A.M., CUNHA, M.C.A., LOJA, C., SILVA, J.A.F. - Temas de Cardiologia Pediátrica, J.Bras.Med., Rio de Janeiro, v.40, n.5, p.67-79, 1981.

09. AYOUB, E.M., WANNAMAKER, L.W. - Evaluation of the streptococcal desoxyribonuclease B and diphosphopyridine nucleotidase antibody tests in acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis. Pediatrics, Evanston, v.29, p.527-538, 1962.

10. BAHR, G.M., YOUSOF, A.M., BEHBEHANI, K., MAJEED, H.A., SAKKALAH, S., SOUAN, K., JARRAD, I., GEOFFROY, C., ALOUF, J.E.- Antibody levels and in vitro lymphoproliferative responses to *Streptococcus pyogenes* erythrogenic toxin A and mitogen of patients with rheumatic fever. - J. Clin. Microbiol., Washington, v.29, n.9, p.1789-1794, 1991.

11. BANCHUIN, N., WHEELER, J., SUSSMAN, M. - Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-streptococcal protoplast membrane antibodies. Infection, Munich, v.12, n.6, p. 361-366, 1984.

12. BARBOSA, S.F.C., NAKAMURA, P.M., SHIMIZU, S.H.- Detection of antibody isotypes to streptolysin O by dot Elisa. - Braz. J. Med. Biol. Res., Ribeirão Preto, v.9, n.6, p.763-767, 1996.

13. BARNETT, L.A., CUNNINGHAM, M.W. - A new heart-cross-reactive antigen in *Streptococcus pyogenes* is not M protein. - J.Infect., London, v.162, n.4, p.875-882, 1990.

14. BARNETT, L.A., CUNNINGHAM, M.W. - Evidence for actinlike proteins in an M protein-negative strain of *Streptococcus pyogenes*. Infect.Immun., Washington, v.60, n.9, p.3932-3936, 1992.

15. BARRET, D.I., TRIGGIANI, M., AYOUB, E.M. - Assay of antibody to group A streptococcal carbohydrate by enzyme-linked immunosorbent assay. J.Clin. Microbiol., Washington, v.18, n.3, p.622-627, 1983.

16. BERGE, A., BJORCK, L. - Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins.- J. Biol.Chem., Baltimore, v.270, n.17, p.9862-9867, 1995.
17. BERGNER-RABINOWITZ, S., FLEIDERMAN, S., FERNE, M., RABINOWITZ, K., GINSBURG, I. - The new Streptozyme test for streptococcal antibodies. Studies in the value of this multiple antigen test in glomerulonephritis, acute pharyngitis, and acute rheumatic fever. Clin.Pediatr., Philadelphia, v.14, n.9, p. 804-809, 1975.
18. BERKE, C.M. - Development of rapid strep test technology. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, v.8, n.11, p.825-828,1989.
19. BHAKDI, S., ROTH, M., SZIEGOLEIT, A., TRANUM-JENSEN, J. - Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O. Infect.Immun., Washington, v.46, n.2, p. 394-400, 1984.
20. BHAKDI, S., TRANUM-JANSEN, J. - Complement activation and attack on antologous cell membranes induced by streptolysin-O. Infect.Immun., Washington, v.48, n.3, p.713-719, 1985.
21. BHAVE, S.Y., KINIKAR, A. - Epidemiology of streptococcal infection with reference to rheumatic fever. Indian Pediatr., New Delhi, v.28, n.12, p.1503-1508, 1991.
22. BISNO, A.L. - Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. - N. Engl. J. Med., Boston, v.325, n.11, p. 783-793, 1991.
23. BISNO, A.L., OFEK, I. - Serologic diagnosis of streptococcal infection comparison of a rapid hemagglutination technique with conventional antibody tests. Am.J.Dis.Child., Chicago, v.127, p.676-681, 1974.
24. BIUNDO Jr., J.J., OSTERBERGER Jr.,J.S., HARNISH, M. - Comparison of the Streptozyme test and other streptococcal

antibodies in acute rheumatic fever. Arthritis Rheum., New York, v.18, n.5, p. 527-528, 1975.

25. BRONZE, M.S., DALE, J.B. - The reemergence of serious group A streptococcal infection and acute rheumatic fever. - Am. J. Med. Sci., Thorofare, v.311, n.1, p.41-54, 1996.
26. BUCHTA, R.M. - Use of a rapid streptest (First Response) by parents for detection of streptococcal pharyngitis. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, v.8: p.829-833, 1989.
27. BURNETTE, W.N. - "Western Blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A. Anal.Biochem., Baltimore, v.112, p.195-203, 1981.
28. CARDOSO, J.P. - Sorologia. 2. ed. Belo Horizonte: s.c.p., 1981. p. 142-144.
29. CREMER, N.E., COSSEN, C.K., SHELL, G., DIGGS, J., GALLO, D., SCHMIDT, N.J. - Enzyme Immunoassay versus plaque neutralization and other methods for determination of immune status to measler and Varicella-Zoster viruses and versus complement fixation for serodiagnosis of infection with those viruses. J.Clin.Microbiol., Washington, v.21, p.869-874, 1985.
30. DIXON, J.M., GROCHOLSKI, J.J. - Automated microtitration test for antistreptolysin O. Appl.Microbiol., Washington, v.19, n.4, p.621-623, 1970.
31. EARLE Jr., D.P., LOEB, E.N., SEEGAL, D., LYTTLE, J.D., JOST, E.L. - The serum antistreptolysin titer in chronic glomerulonephritis. J.Clin.Invest., New York, v.21, p. 483-489, 1942.
32. ELEFANT, G.R. - Estreptococias. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.M. eds. - Diagnóstico laboratorial das principais doenças

infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 93-100.

33. EL-KHATEEB, M.S. - Comparison of antibody titres to streptococcal extracellular antigens. J.Trop.Pediatr., London, v.35, n.4, p. 159-162, 1989.

34. EL-KHOLY, A.M., HAFEZ, K., GUIRGUIS, N., FACKLAN, R.R., JOHNSON, D.R., WANNAMAKER, L. - Heterogeneity of group A type-specific antibodies. Infect.Immun., Washington, v.27, n.3, p.953-959, 1980.

35. FABER, V. - Anti-streptococcal-Hyaluronidase IV. Comparison of anti-streptococcal hyaluronidase and anti-streptolysin O in sera from patients with rheumatic fever, glomerulonephritis, tonsillitis and rheumatoid arthritis. Acta Med.Scand., Stockholm, v.147, p.299-310, 1953.

36. FACKLAM, R.R., CAREY, R.B. - Streptococci and Aerococci. In: LENNETTE, E.H., ed., BALOWS, A., ed., HAUSLER Jr., W.J., ed., SHADOMY, H.J., ed. - Manual of clinical microbiology. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p.154-175.

37. FIUMARA, A.S. - A rapid dilution technic for the ASO titer. Am.J.Clin.Pathol., Philadelphia, v.57, p.538-540, 1972.

38. FROUDE, J., GIBOFSKY, A., BUSKIRK, D.R., KHANNA, A., ZABRISKIE, J.B. - Cross-Reactivity between *streptococcus* and human-tissue: a model of molecular mimicry and autoimmunity. Curr.Top.Microbiol.Immunol., Berlin, v.145, p. 5-26, 1989.

39. FUJIKAWA, S., OHKUNI, M. - A new latex agglutination test for rapid diagnosis of group A streptococci. Jpn.Circ.J., Kyoto, v.50, p.1251-1252, 1986.

40. GALEN, R.S., GAMBINO, S.R. - Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York: John Wiley, 1975. 237 p.
41. GERBER, M.A., CAPARAS, L.S., RANDOLPH, M.F. - Evaluation of a new latex agglutination test for detection of streptolysin O antibodies. J.Clin.Microbiol., Washington, v.28, n.3, p. 413-415, 1990.
42. GERBER, M.A., WRIGHT, L.L., RANDOLPH, M.F. - Streptozyme test for antibodies to group A streptococcal antigens. Pediatr.Infect.Dis.J., Baltimore, v.6, n.1, p. 36-40, 1987.
43. GOEDVOLK-DE-GROOT, L.E., BENSINK, N.M., VAN-ES-BOON, M.M., VAN VONNO, A.H., MICHEL, M.F. - Comparison of the titres of ASO, anti-DNase B, and antibodies against the group polysaccharide of group A streptococci in children with streptococcal infections. J.Clin.Pathol., London, v.27, n.11, p.891-896, 1974.
44. GOLDSTEIN, I., CARAVANO, R., LEMAIRE, J. - Action of group A extracellular product(s) on the connective tissue of the human heart valve. Experientia, Basel, v.37, n.7, p. 777-778, 1981.
45. GOLDSTEIN, I., RABEYROTTE, P., PASLEBAS, J., HALPEN, B. - Isolation from heart valves of glycopeptides which share immunological properties with *streptococcus* haemolyticus group A polysaccharides. Nature, London, v.219, p.866-869, 1968.
46. GONÇALVES, E.L., OLIVEIRA, H.L., KIEFFER, J., GERMEK, O.A., PEREIRA, V.G. - Manual de clínica médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. cap.11. p.231-235.
47. GRAY, E.D., WANNAMAKER, L.W., AYOUB, E.M., EL KHOLY, A., ABDIN, Z.H. - Cellular immune responses to extracellular streptococcal products in rheumatic disease. J.Clin.Invest., New York, v.68, n.3, p.665-671, 1981.

48. GUIDELINES for the diagnosis of rheumatic fever - Jones Criteria, 1992 Update. JAMA J.Am.Med.Assoc., v.268, n.15, p.2069-2073, 1992.

49. GULIZIA, J.M., CUNNINGHAM, M.W., McMANUS, B.M. - Immunoreactivity of anti-streptococcal monoclonal antibodies to human heart valves. - Am. J. Pathol., Hagerstown, v.138, n.2, p.285-301, 1991.

50. GUPTA, R., RATTAN, A., PRAKASH, K., TALWAR, G.P., GUPTA, S. K. - Immunodiagnosis of group A streptococci by latex agglutination assays with monoclonal or monoespecific polyvalent antibodies. Indian J. Med. Res., New Delhi, v.97, p.25-31, 1993.

51. HAFJEJEE, I ., - Rheumatic fever and rheumatic heart disease: The current status of its immunology, diagnostic criteria, and prophylaxis. Q.J.Med., Oxford, v.84, n.305, p.641-658, 1992.

52. HARDIE, J.M. - Genus *Streptococcus*. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G., eds. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.v.2, p.1043-1050.

53. HERBERT, D., TODD, E.W. - Purification and properties of a hemolysin produced by group A hemolytic streptococci (Streptolysin O). Biochem.J., London, v.35, p.1124-1139, 1941.

54. HJELMELAND, L.M. - A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, Washington, v.77, p.6368-6370, 1980.

- 55 . HUGHES, E.J., EICHBAUM, Q., BEATTY, D.W. - Human monoclonal antibodies: analysis of two antibodies derived from lymphocytes of a patient with acute rheumatic fever. Med. Lab. Sci., London, v.48, n.4, p.244-255, 1991.

56. INGRAN, G.B.P., HUGHES, J.E.P. - A modified rapid slide test for anti-streptolysin O. J.Clin.Pathol., London, v.25, p.543-544, 1972.
57. JAMES, K. - Immunoserology of infectious diseases. Clin. Microbiol.Rev., Washington, v.3, p.132-152, 1990.
58. JANEFF, J., JANEFF, D., TARANTA, A., COHEN, H. - A screening test for streptococcal exoenzymes. Lab.Med., Philadelphia, v.2, p.38-40. 1971.
59. KAPLAN, E.L., HUWE, B.B. - The sensitivity and specificity of an agglutination test for antibodies to streptococcal extracellular antigens: A quantitative analysis and comparison of the streptozyme test with the anti-deoxyribonuclease B tests. J.Pediatr., St.Louis, v.96, n.3, p. 367-373, 1980.
60. KAPLAN, E.L., KUNDE, C. - Quantitative evaluation of variation in composition of the streptozyme agglutination reagent for detection of antibodies to group A streptococcal extracellular antigens. J.Clin.Microbiol., Washington, v.14, n.6, p.678-680, 1981.
61. KAPLAN, E.L., WANNAMAKER, L.W. - Dynamics of the immune response in rabbits immunized with streptococcal extracellular antigens: comparison of three streptozyme agglutination test with the specific neutralization test. J.Lab.Clin.Med., St. Louis, v.86, n.1, p.91-99, 1975.
62. KAPLAN, M.H., BOLANDE, R., RAKITA, L., BLAIR, J. - Presence of bound immunoglobulins and complement in the myocardium in acute rheumatic fever. N.Engl.J.Med., Boston, v.271, n.13, p.637-645, 1964.
63. KAWAKITA, S. - Rheumatic fever and rheumatic heart disease in Japan. Jpn.Circ.J., Kyoto, v.50, p.241-245, 1986.

64. KILL, K.S., CUNNINGHAM, M.W., BARNETT, L.A. - Cloning and sequence analysis of gene encoding a 67-Kda myosin-cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* reveals its similarity with class II major histocompatibility antigens. - Infect. Immun., Washington, v.62, n.6, p.2440-2449, 1994.
65. KIRBY, W.M.M. - Hemagglutination reaction in streptococcal infections and acute rheumatic fever. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., New York, v.78, p.519-522, 1951.
66. KLEIN, G.C., BAKER, C.C., JONES, W.L. - "Upper limits of normal" antistreptolysin O and antideoxyribonuclease B titers. Appl. Microbiol., Washington, v.21, p.999-1001, 1971.
67. KLEIN, G.C., BAKER, C.N., MOODY, M.D. - Comparison of antistreptolysin O latex screening test with the antistreptolysin O hemolytic test. Appl. Microbiol., Washington, v.19, n.1, p.60-61, 1970.
68. KUKUMINATO, Y., HAMAMOTO, M., KATAURA, A. - Role of serum antibodies to streptococci in patients with IgA nephropathy. Acta Oto-Laryngol, Stockholm, v.508, suppl., p.6-10, 1993.
69. KUSAMA, H., OHASHI, M., KOBAYASHI, S., FUKUMI, H., HABU, T., SONOGUSHI, T., SHIMIZU, T. - Immunological significance of antistreptolysin O (ASL) in streptococcal infections. Sero-epidemiological studies in various age groups. Jpn.J.Med.Sci.Biol., Tokyo, v.15, p.175-187, 1962.
70. LABETA, M.O., FERNANDEZ, N., FESTENSTEIN, H. - Solubilisation effect of Nonidet P40, Triton X-100 and CHAPS in the detection of MHC-like glycoproteins. J.Immunol.Methods, Amsterdam, v.112, p.133-138, 1988.
71. LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, v.227, p. 680-685, 1970.

72. LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER Jr., W.J., SHADOMY, H.J., eds. - Manual of clinical microbiology. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. 1149 p.
73. LIAO, S.J. - A modification of the antistreptolysin test. J.Lab.Clin.Med., St. Louis, v.38, p. 648-659, 1951.
74. LOWRY, H.L., ROSENBROUGH, W.J., FARR, A.L., RAWDALL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
75. MANDELL, G.L., DOUGLAS, R.G., BENNETT, J.E. - Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone, 1990. p.1519-1538.
76. McCARTY, M. - Streptococci. In: DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S., eds. - Microbiology. 4.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1990. p. 525-538.
77. MICEIKA, B.G., VITONS, A.S., THOMPSON, K.D.T. - Detection of group A streptococcal antigen directly from throat swabs with a ten-minute latex agglutination test. J.Clin.Microbiol., Washington, v.21, n.3, p.467-469, 1985.
78. MOLLIK, J.A., MILLER, G.G., MUSSER, J.M., COOK, R.G., RICH, R.R. - Isolation and characterization of a novel streptococcal superantigen. Trans.Assoc.Am.Phys., Philadelphia, v.105, p.110-122, 1992.
79. MOTE, J.R., JONES, T.D. - Studies of hemolytic streptococcal antibodies in control groups, rheumatic fever, and rheumatoid arthritis. J.Immunol., Baltimore, v.41, p.35-60, 1941.
80. PALFREE, R.G.E., ELLIOTT, B.E. - An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detergent solubilized Ia glycoproteins using nitrocellulose membrane discs. J.Immunol.Methods, Amsterdam, v.52, p.395-408, 1982.

81. PAUL, J.R., WHITE, C., eds. - Serological epidemiology. New York: Academic Press, 1973. p.19-32.
82. PAVLOVSKIS, O., LADES, H.D. Adsorption of H-fatty acid esters of streptococcal groups A and E cell wall polysaccharide. Antigens by red blood cells and their effect on hemagglutination. J.Bacteriol., Baltimore, v.100, n.2, p.641-646, 1969.
83. PRIMAVERA, K.S.C., UMEZAWA, E.S., PERES, B.A., CAMARGO, M.E., HOSHINO-SHIMIZU, S. - Chaga's disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms on the disease. Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo, São Paulo, v.32, p.172-180, 1990.
84. QUITMAN, R.W. - Comprehensive review morbidity and mortality trends for rheumatic fever, streptococcal disease, and scarlet fever: The decline of rheumatic fever. Rev.Infect.Dis., Chicago, v.11, n.6, p.928-953, 1989.
85. RANDALL, E., RANTZ, L.A. - Stable, reduced, desiccated streptolysin "O". Proc.Soc.Exp.Biol.Med., New York, v.70, p.414-416, 1949.
86. RANTZ, L.A., RANDALL, E.A. - A modification of the technic for determination of the antistreptolysin titer. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., New York, v.59, p.22-25, 1945.
87. REED, W.P., SELINGER, D.S., ALBRIGHT, E.L., ABDIN, Z.H., WILLIAMS Jr., R.C. - Streptococcal adherence to pharyngeal cells of children with acute rheumatic fever. J.Infect.Dis., Chicago, v.142, n.6, p. 803-810, 1980.
88. REITANO, M., PISANO, M.A., ERIQUEZ, L.A., D'AMATO, R.F. - Enzyme linked immunosorbent assay for detection of streptolysin O antibodies. J.Clin.Microbiol., Washington, v.23, n.1, p.62-65, 1986.

89. RICCI, A., AREZZINI, C., COCOLA, F., MEIATTINI, F. - Automated determination of anti-streptolysin O antibodies by a kinetic hemolytic method. J.Clin.Microbiol., Washington, v.20, n.6, p.1065-1067, 1984.
90. ROBLES, G., ZAVALA, A.N., REYES, P.A. - Anticuerpos contra productos extracelulares del Estreptococo grupo A. Importancia diagnostica en la fiebre reumatica aguda. - Arch. Inst. Cardiol. Mex., México, v.65, n.2, p.115-119, 1995.
91. ROSA, E.C., RIZZO, M.C., GIAVINA-BIANCHI-JR., P.F., FORTE, W.C.N., MIMICA, I.M. -Imunopatologia da febre reumática. Ciênc.Méd., São Paulo, v.16, n.1, p.21-30, 1988.
92. ROTTA, Y., TIKHOMIROV, E. - Streptococcal diseases worldwide: present status and prospects. Bull.WHO, Geneve, v.65, n.6, p.769-777, 1987.
93. RUSSEL, H., FACKLAM, R.R., EDWARDS, L.R. - Enzyme linked immunosorbent assay for streptococcal M protein antibodies. J.Clin.Microbiol., Washington, v.3, n.5, p.501-505, 1976.
94. RYKNER, G. - Titration immunoenzymologique des antistreptolysines (ELISA). Pathol.Biol., Paris, v.28, n.8, p.555-556, 1980.
95. SCHLIEVERT, P.M., ASSIMACOPOULOS, A.P., CLEARY, P.P. - Severe invasive group A streptococcal disease: Clinical description and mechanisms of pathogenesis. - J. Lab. Clin.Med., St. Louis, v.127, p.13-22, 1996.
96. SCHMIDT, W.C., MOORE, D.J. - The determination of antibody to group A streptococcal polysaccharide in human sera by hemagglutination. J.Exp.Med., New York, v.121, n.4, p.793-805, 1965.
97. SHULMAN, S.T., AYOUB, E.M. - Qualitative and quantitative aspects of the human antibody response to streptococcal group

- A carbohydrate. J.Clin.Invest., New York, v.54, p.990-996, 1974.
98. SMITH, E.C., MUSICH, P.R., JOHNSON, D.A. - Sodium dodecyl sulfate enhancement of quantitative immunoenzyme dot-blot assays on nitrocellulose. Anal.Biochem., Baltimore, v.177, p.212-219, 1989.
 99. SMYTHE, C.V., HARRIS, T.N. - Hemolysin produced by group A beta hemolytic streptococci. J.Immunol., Baltimore, v.38, p.283-300, 1940.
 100. STEVENS, D.L. - Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. - Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v.1, n.3, p.69-78, 1995.
 101. STOLLERMAN, G.H. - Streptococcal vaccines and global strategies for prevention of rheumatic fever. Am.J.Med., New York, v.68, n.5, p.636-638, 1980.
 102. STUDIER, F.W. - Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J.Mol.Biol., London, v.79, p.237-248, 1973.
 103. TELLES, W. - Considerações sobre as streptococcias e a febre reumática. Principais aspectos do problema no Brasil. An.Microbiol., Rio de Janeiro, v.9b, p.291-329, 1961.
 104. TODD, E.W. - Antigenic streptococcal hemolysin. J.Exp.Med., New York, v.55, n.1, p.267-280, 1932.
 105. TODD, E.W. - Antihaemolysin titres in haemolytic streptococcal infections and their significance in rheumatic fever. Br.J.Exp.Pathol., London, v.13, p.248-259, 1932.
 106. TODOME, Y., OHKUNI, H., YOKOMURO, K., KIMURA, Y., HAMADA, S., JOHNSTON, K.H., ZABRISKIE, J.B. - Enzyme-linked immunosorbent assay of antibody to group A

streptococcus-specific C carbohydrate with trypsin-pronase-treated whole cells as antigen. J.Clin.Microbiol., Washington, v.26, n.3, p.464-470, 1988.

- 107.TOLLIVER, P.R., ROE, M.H. - Comparison of two slide tests for detection of group A streptococcal antibodies. Am.J.Clin.Pathol., Philadelphia, v.72, n.2, p.218-221, 1979.
- 108.TOWBIN, H., STACHELIN, T., GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.
- 109.TSAI, C.M., FRASCH, C.E. - A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. Anal.Biochem., Baltimore, v.98, p.231-237, 1979.
- 110.WANNAMAKER, L.W. - Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. N.Engl.J.Med., Boston, v.282, p.23-31, 1970.
- 111.WATANABE, N., ARIMURA, A., KOBAYASHI, M., OSHIMA, M. - Changing pattern of rheumatic fever and streptococcal antibodies. Jpn.Circ.J., Kyoto, v.50, p.1246-1248, 1986.
112. WHO CVD Unit and Principal Investigators. WHO programme for the prevention of rheumatic fever/rheumatic heart disease in 16 developing countries: a report from phase I (1986-1990). Bull. WHO, Geneve, v.70, p.213-218, 1992.
- 113.WILLIAMS Jr., R.C. - Rheumatic fever and the *Streptococcus*. Am.J.Med., New York, v.75, n.5, p.727-730, 1983.
- 114.ZIMMERMAN, R.A., MATHEWS, J., WILSON, E. - Microtiter indirect hemagglutination procedure for identification of streptococcal M-protein antibodies. Appl.Microbiol., Washington, v.16, n.11, p.1640-1645, 1968.

APÊNDICE

TABELA XIV

RELAÇÃO DOS PACIENTES COM FEBRE REUMÁTICA AGUDA
(GRUPO A), COM SEUS TÍTULOS DE Ac ASLO (EM UT), BEM
COMO O NÚMERO DE BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E
EXTRACELULAR RECONHECIDAS PELOS ANTICORPOS IgG E IgA
DOS SEUS SOROS, INDIVIDUALMENTE

Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
		IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
FR01	>1600	14	2	14	4	1	4
FR02	320	14	1	14	8	1	8
FR03	400	14	2	14	6	1	6
FR04	400	14	1	14	7	1	7
FR05	800	14	0	14	5	3	6
FR06	160	9	2	9	7	1	8
FR07	640	14	1	14	8	1	8
FR08	>1600	14	1	14	5	0	5
FR09	>1600	11	2	12	8	1	8
FR10	<100	10	2	12	6	0	6
FR11	800	11	3	12	5	0	5
FR12	640	10	3	11	7	2	9
FR13	400	11	1	11	4	2	5
FR14	320	13	1	13	5	2	5
FR15	>1600	13	2	14	8	1	8
FR16	200	11	3	13	6	1	6
FR17	400	12	3	13	6	1	7
FR18	200	11	3	13	7	1	7
FR19	320	11	2	11	3	1	3
FR20	400	17	3	17	7	1	7
FR21	160	15	0	15	4	2	4
FR22	800	13	1	13	7	1	7
FR23	400	17	1	17	7	1	7
FR24	200	14	1	14	5	0	5
FR25	100	6	0	6	4	0	4
FR26	200	14	3	14	6	1	6
FR27	640	11	1	11	5	2	6
FR28	800	13	1	13	5	0	5

		Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
FR28	800	13	1	13	5	0	5
FR29	800	13	2	13	8	0	8
FR30	640	17	1	17	11	1	12
FR31	640	15	5	17	7	3	9
FR32	400	13	2	13	7	0	7
FR33	800	17	4	18	8	5	9
FR34	200	15	3	16	3	1	3
FR35	800	19	5	21	7	4	8
FR36	320	12	3	13	7	0	7
FR37	200	14	4	14	4	1	5
FR38	<100	10	2	11	6	1	7
FR39	200	16	3	16	7	1	7
FR40	320	16	3	16	8	4	10
FR41	640	16	5	18	7	5	9
FR42	320	9	3	11	3	0	3
FR43	1280	9	3	12	8	4	10
FR44	320	9	3	12	7	1	7
FR45	<100	6	3	9	7	1	7
FR46	<100	9	3	11	3	2	5
FR47	200	12	4	13	3	2	3
FR48	1280	12	3	14	8	0	8
FR49	640	14	3	14	4	2	4
FR50	1280	20	3	20	7	1	7
FR51	1280	15	3	15	8	1	8
FR52	400	15	3	15	3	2	3
FR53	400	10	3	12	5	3	5
FR54	400	13	4	14	9	0	9
FR55	400	18	7	20	3	3	4
FR56	320	14	3	14	7	1	7

TABELA XV

RELAÇÃO DOS PACIENTES SEM DIAGNÓSTICO DE SEQUÊLA (GRUPO B), COM SEUS TÍTULOS DE Ac ASLO (EM UT), BEM COMO O NÚMERO DE BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E EXTRACELULAR RECONHECIDAS PELOS ANTICORPOS IgG E IgA DOS SEUS SOROS, INDIVIDUALMENTE

Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
		IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
SD01	<166	3	1	3	3	1	4
SD02	<166	3	1	3	5	0	5
SD03	<166	3	0	3	7	0	7
SD04	<166	3	0	3	4	0	4
SD05	<166	0	0	0	5	0	5
SD06	<166	2	0	2	5	0	5
SD07	<166	3	1	3	5	0	5
SD08	<166	2	0	2	5	0	5
SD09	<166	2	1	2	5	0	5
SD10	166	3	0	3	3	0	3
SD11	166	3	0	3	1	0	1
SD12	166	3	1	4	3	2	4
SD13	250	1	1	2	2	1	3
SD14	250	4	0	4	3	0	3
SD15	250	4	2	5	4	1	5
SD16	250	3	1	3	2	1	3
SD17	250	4	3	5	2	0	2
SD18	250	4	1	4	4	1	5
SD19	250	3	1	3	1	1	1
SD20	250	3	0	3	1	0	1
SD21	250	4	1	4	1	0	1
SD22	250	3	3	3	1	1	1
SD23	250	3	0	3	1	0	1
SD24	250	3	3	3	1	2	3
SD25	250	4	1	4	2	1	3
SD26	250	3	0	3	4	1	4
SD27	250	3	1	3	1	0	1

Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
		IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
SD28	250	3	0	3	1	1	1
SD29	250	3	1	4	1	1	1
SD30	250	4	3	7	1	3	4
SD31	250	3	2	5	1	1	1
SD32	500	7	7	11	3	1	4
SD33	500	6	5	10	5	2	7
SD34	500	6	0	6	4	0	4
SD35	500	5	4	8	4	0	4
SD36	500	5	5	9	1	0	1
SD37	500	5	3	8	1	2	3
SD38	500	5	3	7	1	1	2
SD39	500	4	3	7	1	1	2
SD40	500	5	1	6	1	1	2
SD41	500	2	2	4	0	1	1
SD42	500	4	3	6	1	1	2
SD43	500	4	6	9	2	0	2
SD44	500	4	2	6	1	0	1
SD45	500	3	3	6	1	0	1
SD46	500	4	5	8	1	0	1
SD47	625	3	0	3	1	1	1
SD48	625	3	0	3	1	0	1
SD49	625	3	0	3	1	0	1
SD50	625	3	1	4	1	0	1
SD51	625	4	1	5	3	1	4
SD52	625	3	1	3	5	1	6
SD53	625	4	2	4	3	1	4
SD54	625	3	1	4	3	1	4
SD55	625	5	2	7	5	1	6
SD56	625	3	1	4	5	0	5
SD57	625	3	1	4	3	1	4
SD58	625	3	0	3	3	0	3
SD59	625	3	0	3	3	1	4
SD60	625	3	0	3	1	1	2
SD61	625	2	0	2	2	1	3
SD62	833	0	0	0	7	0	7

Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
		IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
SD63	833	3	1	4	7	0	7
SD64	833	3	1	4	7	0	7
SD65	833	1	1	2	7	0	7
SD66	833	2	0	2	7	0	7
SD67	833	0	0	0	6	0	6
SD68	833	2	0	2	7	0	7
SD69	833	2	1	2	7	0	7
SD70	833	3	0	3	7	0	7
SD71	833	3	0	3	7	0	7
SD72	833	2	0	2	6	0	6
SD73	833	2	0	2	7	0	7
SD74	833	3	0	3	7	0	7
SD75	833	3	0	3	7	0	7
SD76	833	1	1	1	7	0	7
SD77	833	10	3	11	7	2	8
SD78	833	10	1	10	7	0	7
SD79	1250	11	3	12	8	1	8
SD80	1250	9	1	9	7	0	7
SD81	1250	12	1	12	4	0	4
SD82	1250	4	3	5	7	1	7
SD83	1250	8	0	8	7	0	7
SD84	1250	6	3	7	7	1	8
SD85	1250	5	2	6	8	0	8
SD86	2500	7	2	7	7	1	7
SD87	2500	5	2	6	6	0	6
SD88	2500	8	1	8	7	1	8
SD89	2500	7	2	7	5	0	5
SD90	>2500	6	0	6	6	0	6
SD91	>2500	7	3	8	1	1	1

TABELA XVI

RELAÇÃO DAS CRIANÇAS DO GRUPO CONTROLE (GRUPO C),
COM SEUS TÍTULOS DE Ac ASLO (EM UT), BEM COMO O
NÚMERO DE BANDAS DOS ANTÍGENOS CELULAR E
EXTRACELULAR RECONHECIDAS PELOS ANTICORPOS IgG E IgA
DOS SEUS SOROS, INDIVIDUALMENTE

Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
		IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
CO01	<100	4	0	4	2	0	2
CO02	200	4	0	4	1	0	1
CO03	320	5	0	5	2	0	2
CO04	<100	0	0	0	8	0	8
CO05	400	0	0	0	2	0	2
CO06	200	2	0	2	2	0	2
CO07	<100	2	0	2	3	0	3
CO08	320	2	0	2	2	0	2
CO09	<100	3	0	3	4	0	4
CO10	200	3	0	3	4	0	4
CO11	<100	1	0	1	0	0	0
CO12	100	3	0	3	3	0	3
CO13	<100	4	0	4	1	0	1
CO14	160	4	0	4	5	0	5
CO15	200	3	0	3	3	0	3
CO16	200	6	0	6	3	0	3
CO17	200	3	0	3	3	0	3
CO18	<100	0	0	0	3	0	3
CO19	<100	4	0	4	3	0	3
CO20	<100	0	0	0	0	0	0
CO21	<100	0	0	0	0	0	0
CO22	<100	0	0	0	2	0	2
CO23	200	4	0	4	4	0	4
CO24	<100	0	0	0	0	0	0
CO25	<100	2	0	2	1	0	1
CO26	<100	0	0	0	2	0	2
CO27	<100	4	0	4	6	0	6

Nº.soro	Título de Ac ASLO(UT)	Antígeno Celular no. de bandas reconhecidas por Ac			Antígeno Extracelular no. de bandas reconhecidas por Ac		
		IgG	IgA	IgG e/ou IgA	IgG	IgA	IgG e/ou IgA
CO28	100	4	0	4	1	0	1
CO29	100	4	0	4	2	0	2
CO30	160	5	0	5	1	0	1
CO31	<100	5	0	5	2	0	2
CO32	<100	0	0	0	1	0	1
CO33	100	0	0	0	5	0	5
CO34	<100	5	0	5	4	0	4
CO35	<100	4	0	4	5	0	5
CO36	<100	2	0	2	1	0	1
CO37	<100	0	0	0	1	0	1
CO38	160	3	0	3	4	0	4
CO39	<100	4	0	4	3	0	3
CO40	<100	0	0	0	0	0	0
CO41	<100	0	0	0	3	0	3