

# LA MICROTECNICA DE HEMAGLUTINACION PARA EL DIAGNOSTICO RETROSPECTIVO DE LA PESTE HUMANA EN ZONAS RURALES DEL BRASIL

Dres. Milton Thiago de Mello,<sup>1</sup> Angela M. de Mello<sup>2</sup> y Hélio Paracampo<sup>3</sup>

*La prueba de hemaglutinación permitió confirmar el diagnóstico clínico y epidemiológico de la peste bubónica humana en la mayoría de los pacientes estudiados en zonas rurales endémicas del Brasil en 1965 y 1966.*

El diagnóstico de la peste se verifica en la actualidad mediante un examen clínico, junto con el estudio de la epidemiología de los casos sospechosos acompañado de pruebas de laboratorio. Las pruebas más importantes que se emplean hoy son: a) aislamiento de *Pasteurella pestis* por cultivo directo o por inoculación de animales con material sospechoso (líquidos de bubones, esputo, sangre, médula ósea, etc.); b) técnicas de anticuerpos fluorescentes, y c) reacciones serológicas, principalmente la de fijación del complemento y la de hemaglutinación. Hasta hace poco, la única prueba de diagnóstico definitivo era el aislamiento del agente causante.

Algunas de esas pruebas—la técnica de anticuerpos fluorescentes y la del cultivo del microorganismo—no son fidedignas en ciertas zonas. Otras veces es difícil realizar el examen clínico y el estudio de la epidemiología, como ocurre en determinados sectores de países en vías de desarrollo.

La reciente modificación de las reacciones serológicas, concebidas inicialmente por Chen y Meyer (1), adaptada a la microtécnica descrita por Sever (2), ha dado buenos resultados no sólo con sueros de casos recientes sino también con los de pacientes restablecidos desde hacía varios

meses (3,4). Las pruebas pueden aplicarse también a los sueros de roedores y otros animales pequeños, en estudios ecológicos de la peste selvática (3,4,5,6).

La reactivación de numerosos focos de peste en zonas endémicas del Brasil, durante 1964-1966, indujo a comprobar la utilidad de la prueba de hemaglutinación para hacer un diagnóstico retrospectivo de la peste bubónica humana en zonas rurales de dos Estados del Brasil, para lo cual se utilizó la microtécnica.

## Material y métodos

### *Pacientes*

Durante el primer semestre de 1966, los sueros fueron obtenidos de tres grupos de pacientes restablecidos de la peste, que había sido diagnosticada, clínica o bacteriológicamente, durante 1965 y 1966, en los Estados de Bahía y Minas Gerais (figura 1).

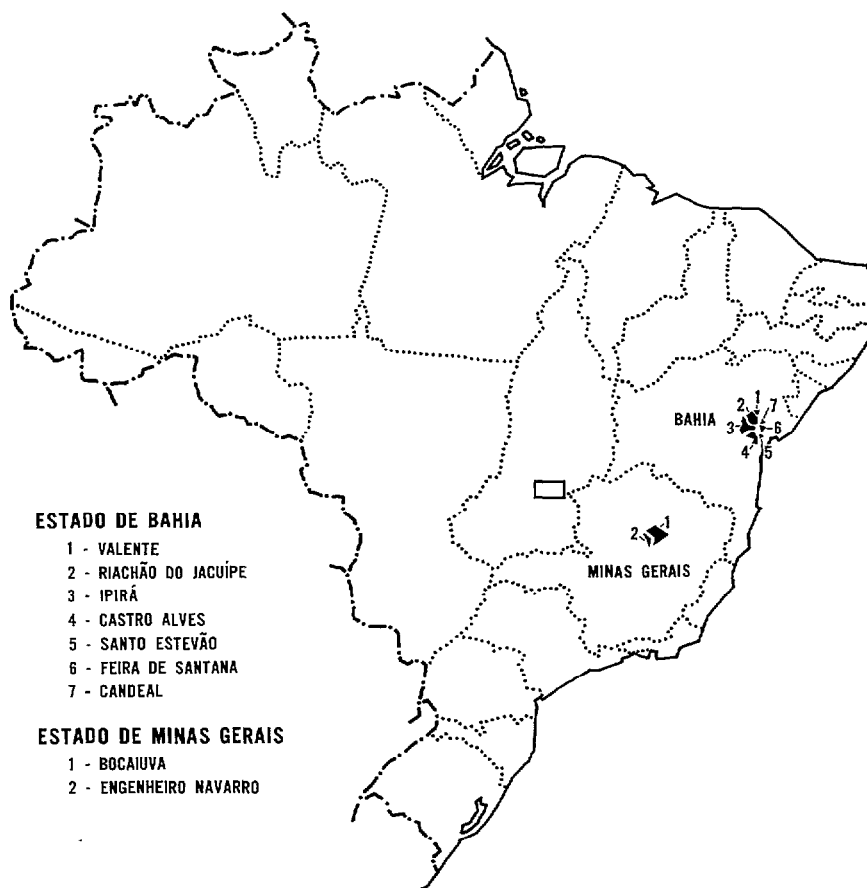
*Grupo A.* El primer grupo de pacientes fue observado por uno de los colaboradores (M. T. de Mello) en febrero de 1966, en la hacienda Maciel, municipio de Candéal, en el Estado de Bahía (cuadro 1). Se trataba de 10 pacientes que vivían hacinados en tres pequeñas habitaciones de una casa de adobe en malas condiciones, ubicada en una finca donde se cultivaba el henequén (*Agave sisalana*). El 8 de septiembre de 1965, una muchacha de 18 años enfermó de fiebre con escalofríos, cefalalgia, vértigo, vómitos, adinamia, síntomas neuropsíquicos y dos bu-

<sup>1</sup> Profesor de Bacteriología, Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Gb., Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Río de Janeiro, Río de Janeiro, Gb., Brasil.

<sup>3</sup> División de Profilaxis, Departamento Nacional de Endemias Rurales, Río de Janeiro, Gb., Brasil.

FIGURA 1—Situación de los municipios de los Estados de Bahía y Minas Gerais, Brasil, de los que se obtuvieron muestras de suero para las pruebas de hemaglutinación.



bones (inguinal y axilar). Al cabo de una semana la paciente falleció. Al día siguiente del fallecimiento, un guarda sanitario visitó la casa y administró sulfonamidas a todos los residentes, roció la vivienda con insecticidas (DDT y BHC) y aplicó rodenticidas. Se envió un espécimen de médula ósea de la fallecida al laboratorio regional y al mes se supo que el resultado había sido negativo. En la misma casa, desde que se manifestaron los síntomas en la primera paciente, ocurrieron varios otros casos, todos los cuales se restablecieron, probablemente debido al tratamiento inmediato con sulfonamidas. En esa ocasión no se notificó el caso de un niño de 6 años, pese a que presentaba ya un

bubón axilar; sin embargo, debido a su mal estado, fue trasladado a un hospital estatal donde se le diagnosticó la enfermedad mediante el aislamiento de *P. pestis*. Dado que durante los meses de agosto y septiembre de 1965 se notificaron epizootias en ratas en las inmediaciones de la casa, todos los pacientes con síntomas se clasificaron como "sospechosos de peste" aunque el agente causante no se aisló de los casos, salvo el del niño.

Quando se visitó la casa nuevamente, el 8 de febrero de 1966, todas las personas resultaron asintomáticas, aunque algunas mostraban todavía vestigios de bubones drenados; las ratas y las pulgas habían desaparecido.

CUADRO 1—Pruebas de hemaglutinación con sueros de pacientes restablecidos sospechosos de peste, en el municipio de Candeal, Estado de Bahía, Brasil, 8 de febrero de 1966.

Caso n.º	Nombre	Sexo	Edad (años)	Iniciación de la enfermedad	Cultivo de líquido del bubón	Hemaglutinación	Días entre el comienzo de la enfermedad y la toma de muestras	Localización del bubón
1	AMM	M	18	8.9.65	0	>1:192	154	Inguinal izquierda
2	RP	F	10	10.9.65	0	>1:192	156	Axilar e inguinal (bilateral)
3	LM	M	23	10.9.65	—	>1:192	156	Inguinal derecha; Axilar izquierda.
4	AOA	M	4	10.9.65	—	>1:192	156	Cervical (bilateral)
5	MM	F	14	11.9.65	0	1:24	157	Inguinal izquierda
6	AP	F	16	11.9.65	—	>1:192	157	Inguinal derecha
7	MMN	F	65	15.9.65	0	1:96	161	Inguinal derecha
8	F	M	6	Sin antecedentes	+	1:96	—	—
9	AM	M	32	Sin síntomas	—	0	—	—
10	MM	F	23	Sin síntomas	—	>1:192	—	—
11	MDFJ	F	17	18.9.65	—	0	164	Axilar derecha

\* Los casos Nos. 1 al 10 vivían en la misma casa, en la hacienda Maciel; el No. 11 habitaba en la hacienda Nova Vida, situada en las cercanías.

Dos personas que no habían manifestado síntomas en septiembre de 1965, se clasificaron como contactos. Se obtuvieron muestras de sangre de todos los pacientes restablecidos y de los contactos hallados en la casa durante la visita. En el cuadro 1 se incluye también a una persona sospechosa de peste que vivía en la hacienda Nova Vida, cerca de la casa ocupada por los otros casos del primer grupo.

**Grupo B.** El segundo grupo de sueros examinados correspondía a pacientes sospechosos y a sus contactos, en una zona pestosa, al parecer nueva, del Estado de Minas Gerais (cuadro 2). En fechas recientes se habían notificado epizootias en ratas de ese sector. Algunas personas presentaron los primeros síntomas en marzo de 1966, y hubo una defunción; otras los manifestaron alrededor de un mes después. Un colaborador (Hélio Paracampo) examinó a los pacientes el 21 de abril de 1966, algunos de los cuales tenían aún lesiones típicas de peste bubónica. En esa ocasión se obtuvieron muestras de sangre de los enfermos y de sus contactos.

Como no se intentó cultivar el material, todos los casos fueron registrados como "sos-

pechosos de peste". En cuanto se recibió la notificación del fallecimiento, se aplicaron en el sector las tradicionales medidas de control (rociamiento con insecticidas, aplicación de rodenticidas y tratamiento de todos los pacientes y contactos con sulfonamidas).

**Grupo C.** Después de examinar los sueros correspondientes a los grupos A y B mediante la técnica de hemaglutinación—que se describirá más adelante—y debido a los buenos resultados obtenidos en el diagnóstico de casos, incluso a los 5 meses de haberse restablecido el paciente, se decidió obtener suero de personas que en 1965 habían presentado bacilo de peste en cultivo.

En junio de 1966 se tomaron muestras de sangre a ocho personas de una zona conocida de peste endémica en el Estado de Bahía (cuadro 3). Todas habían presentado síntomas típicos de peste bubónica varios meses antes de obtenerse la muestra.

#### Pruebas de hemaglutinación

Para realizar las pruebas de hemaglutinación con los sueros del grupo A se empleó la técnica descrita por Cavanaugh *et al.* (5); se sensibilizaron hematíes ovinos tanados

CUADRO 2—Pruebas de hemaglutinación con sueros de pacientes sospechosos de peste y sus contactos, en los municipios de Engenheiro Navarro (EN) y Bocaúva (B), Estado de Minas Gerais, Brasil, 21 de abril de 1966.

Caso (Número original)	Municipio	Localidad	Nombre	Sexo	Edad (años)	Clasificación *	Iniciación de la enfermedad	Hemaglutinación	Días entre el comienzo de la enfermedad y la toma de muestras	Localización del bubón
—	EN	Carne seca	IGC	F	56	SP. fallecida	7.3.66	—	—	Inguinal derecha
7	EN	Salitre	LPS	F	30	SP. Contacto	15.3.66	0	37	Inguinal derecha
15	EN	Salitre	MG	F	30	SP. Contacto	10.3.66	1:2048	42	Inguinal derecha
17	EN	Salitre	CS	F	23	SP. Contacto	12.3.66	1:4096	40	Inguinal izquierda
20	EN	Salitre	AMS	F	15	SP. Contacto	11.3.66	0	41	Inguinal derecha
21	EN	Salitre	JMS	M	13	SP. Contacto	—	0	—	—
2	EN	Carne seca	MP	F	16	SP.	—	0	—	—
24	B	Olho D'água	TBR	F	18	SP.	14.4.66	0	7	Inguinal izquierda
4	EN	Carne seca	MLAS	F	14	Contacto	—	0	—	—
5	EN	Carne seca	AM	M	23	Contacto	—	0	—	—
6	EN	Carne seca	MMJ	F	14	Contacto	—	1:16	—	—
9	EN	Salitre	MLA	F	27	Contacto	—	0	—	—
10	EN	Salitre	FPS	F	28	Contacto	—	0	—	—
11	EN	Salitre	MCA	F	18	Contacto	—	0	—	—
12	EN	Salitre	MRAA	F	21	Contacto	—	0	—	—
13	EN	Salitre	VAS	M	66	Contacto	—	1:128	—	—
16	EN	Salitre	MJA	F	22	Contacto	—	0	—	—
8	EN	Carne seca	VNS	M	30	Contacto con 17	—	1:4	—	—
18	EN	Salitre	HS	F	20	Idem	—	1:4	—	—
19	EN	Salitre	AS	F	45	Idem	—	1:4	—	—
14	EN	Salitre	NB	F	6	Contacto con 15	—	0	—	—
22	EN	Salitre	AAS	F	40	Contacto con 20	—	0	—	—
23	B	Olho D'água	JMR	M	25	Idem	—	0	—	—
25	B	Olho D'água	JR	F	13	Contacto con 24	—	0	—	—
26	B	Olho D'água	HBR	F	14	Idem	—	0	—	—
27	B	Olho D'água	JBC	M	53	Idem	—	0	—	—
28	B	Olho D'água	APO	M	29	Idem	—	1:8	—	—
29	B	Olho D'água	ABC	F	60	Idem	—	0	—	—
30	B	Olho D'água	GFB	F	11	Idem	—	0	—	—
1	EN	Carne seca	DPS	M	8	Contacto con 7	—	0	—	—
3	EN	Carne seca	LBC	F	68	Idem	—	0	—	—

\* SP = Sospechoso de peste. Contacto = Contacto con IGC (fallecida).

CUADRO 3—Pruebas de hemaglutinación con sueros de pacientes restablecidos de peste en el Estado de Bahía, Brasil, 30 de junio de 1966.

Caso No.	Municipio	Nombre	Sexo	Edad (años)	Iniciación de la enfermedad	Hemaglutinación	Días entre el comienzo de la enfermedad y la toma de muestras	Localización del bubón
1	Valente	DAS	M	26	28.2.66	1:32	122	Clavícula y axilar izquierda
2	Ipirá	PMR	F	66	70.1.65	1:512	266	Inguinal izquierda
3	Castro Alves	AB	M	5	40.1.65	1:128	269	Inguinal derecha
4	Feira de Santana	MSQ	M	6	19.8.65	1:64	315	Inguinal derecha
5	Santo Estevão	VG	F	12	13.7.65	1:152	352	Inguinal (bilateral)
6	Ipirá	AG	F	40	5.7.65	1:16	360	Inguinal izquierda
7	Riachão do Jacuipe	EAS	F	27	30.6.65	1:64	365	Inguinal derecha
8	Riachão do Jacuipe	ADO	M	18	4.3.65	1:8	453	Inguinal (bilateral)

con la fracción antigénica 1 ( $F_1$ ) de *P. pestis*; las diluciones iniciales de 1:4 con solución salina de los sueros inactivados fueron adsorbidas en hematíes ovinos y diluidas de tal manera que las primeras depresiones de las placas de plástico contenían una dilución final de 1:24 después de añadir las células sensibilizadas. Las diluciones no excedieron de 1:192. En ese grupo, el suero con un título de 1:24 o mayor se consideró positivo.

Las pruebas con los sueros de los grupos B y C se hicieron con hematíes ovinos formolados y tanados, sensibilizados con la fracción  $F_1$  de *P. pestis*, según la técnica descrita por Chen y Meyer (3), y Mello (7). La dilución final en las primeras depresiones de las placas era de 1:4 después de añadir las células sensibilizadas; se hicieron diluciones para obtener el título final. Las aglutinaciones a las diluciones de 1:4 y 1:8 se consideraron sospechosas; las observadas a una dilución de 1:16 o más, se registraron como positivas.

En todas las pruebas, el líquido de dilución para los sueros era solución salina fisiológica más suero normal de conejo al 5%, inactivado y adsorbido en hematíes ovinos.

### Resultados

*Grupo A.* En el cuadro 1 se dan detalles sobre cada persona de este grupo y los re-

sultados de la hemaglutinación efectuada con su suero. Se incluye también el caso de una muchacha de 17 años que vivía cerca de la hacienda y que tenía un bubón axilar; su suero dio resultado negativo en la prueba de hemaglutinación (menos de 1:24). Como se puede observar en el cuadro 1, la prueba de hemaglutinación resultó positiva en todos los casos que tenían bubones en septiembre de 1965, lo que revela una persistencia de anticuerpos perceptibles (1:24 o más) por un período mayor de 5 meses.

*Grupo B.* Las 30 personas de este grupo figuran en el cuadro 2 de acuerdo con su clasificación provisional y su contacto con la fallecida o con individuos que manifestaron síntomas sospechosos de peste. Al parecer, la fallecida había contraído la peste bubónica, por cuanto 4 de sus 13 contactos manifestaron síntomas (casos 7, 15, 17 y 20); unos pocos resultaron positivos en las pruebas de hemaglutinación (dos sintomáticos—casos 15 y 17—y dos asintomáticos—casos 6 y 13). Cuatro personas (casos 8, 18, 19 y 28) que habían estado en contacto con casos clínicamente sospechosos, con resultado negativo en las pruebas de hemaglutinación (casos 20 y 24), presentaron títulos considerados sospechosos (1:4 y 1:8) aunque eran asintomáticos.

*Grupo C.* En el cuadro 3 se indica que los sueros de las 8 personas de este grupo

continuaban siendo positivos en las pruebas de hemaglutinación al transcurrir un período de 4 a 18 meses después del comienzo de la enfermedad. Sólo el caso más antiguo mostraba un título bajo que podría considerarse como sospechoso (1:8), si bien se produjo aglutinación parcial a una dilución de 1:16.

### Conclusiones

La utilidad de la prueba de hemaglutinación para determinar la presencia de anticuerpos en personas de las zonas investigadas parece haberse confirmado. Esto concuerda con los experimentos realizados por distintos grupos de investigadores, en los que se empleó la prueba de hemaglutinación tradicional en tubos. Por ejemplo, Payne *et al.* (8) obtuvieron pruebas positivas en pacientes de Madagascar a los 3 años de haberse presentado la peste bubónica.

En el grupo A, la mayoría de las personas que habitaban en la casa en que se obtuvieron los sueros, habían manifestado bubones y otros síntomas comunes de peste; la edad de estas personas oscilaba entre los 4 y 65 años. Sólo se aisló *P. pestis* de un niño de 6 años (caso 8); la prueba de hemaglutinación efectuada con el suero de este era todavía positiva a los cinco meses de haberse presentado la enfermedad (título de 1:96). El suero de una de dos personas que habitaban en aquella misma casa, y que no manifestaron síntomas de peste durante el brote de la enfermedad (caso 10), resultó positivo en la prueba de hemaglutinación (más de 1:192), mientras que el de la otra (caso 9) no reaccionó a la dilución de 1:24. El foco de los casos comprendidos en el grupo A estaba bien aislado y alejado de otros donde ocurría la enfermedad. Por consiguiente, se decidió obtener suero de otras personas de ese foco (un círculo de unos 12 km de diámetro). En la mayoría de los 230 sueros examinados, la prueba de hemaglutinación resultó negativa a la dilución de 1:24, si bien en algunos la reacción en esta dilución fue dudosa. Puesto que en aquella ocasión los

sueros eran diluidos para obtener un título final de 1:24 en las primeras depresiones de las placas de plástico, pudo existir la posibilidad de que algunos de los sueros de título inferior a 1:24 hayan pasado inadvertidos, lo cual concuerda con la opinión de Chen y Meyer (3). Además, en el trabajo aquí descrito se utilizó solución salina fisiológica más suero normal de conejo al 5%, como sugirieron Cavanaugh *et al.* (5), mientras que Chen y Meyer (1, 3) emplearon suero normal de conejo al 1 por ciento. En trabajos posteriores se utilizó la concentración de 1% y ahora se cree que la concentración de suero de conejo empleada anteriormente era elevada y tal vez haya sido la causa de algunos resultados difíciles de interpretar en las diluciones menores de sueros sospechosos.

En el grupo B sólo dos personas con síntomas sospechosos de peste mostraron un elevado título en los sueros al efectuar la prueba de hemaglutinación. Por otro lado, no se ha logrado una explicación completa de las pruebas de hemaglutinación negativas en los sueros de dos mujeres clínicamente sospechosas (casos 7 y 20). Ambas eran contactos de la fallecida y se les tomaron muestras de sangre a los 37 y 41 días, respectivamente, a partir del comienzo de la enfermedad. Estas mujeres manifestaron que, al aparecer los primeros síntomas (fiebre, escalofríos, cefalalgia, vómitos, adinamia, vértigo y bubón inguinal derecho, del tamaño de un huevo y muy doloroso) fueron tratadas con medicamentos caseros y penicilina (caso 7) o sulfonamidas (caso 20). Al cabo de una semana el médico las encontró totalmente restablecidas y las bubas habían desaparecido. Aunque las viviendas de estas pacientes estaban infestadas de ratas y pulgas, es difícil determinar si estos contactos, clínicamente calificados de casos de "peste bubónica de gravedad moderada", padecieron realmente la enfermedad, no sólo porque la paciente del caso 7 se restableció con un tratamiento inadecuado, sino también porque todos los contactos sucesivos de am-

bas eran asintomáticos y mostraron resultado negativo en las pruebas de hemaglutinación.

En ese mismo grupo B, una tercera paciente sintomática, y con prueba de hemaglutinación negativa (caso 24), presentó síntomas que la obligaron a guardar cama, similares a los manifestados por los casos 7 y 20, el 14 de abril. Esta paciente fue también tratada con medicamentos caseros y sulfonamida. Cuando uno de los colaboradores (Hélio Paracampo) la examinó, una semana después del comienzo de la enfermedad, ya se había restablecido; la fiebre había desaparecido y el bubón se iba reduciendo y ya no causaba dolor. En este caso parece que no hubo tiempo para que se produjeran anticuerpos perceptibles con la prueba de hemaglutinación. Esta observación no difiere de las notificadas por McCrumb *et al.* (9), quienes se encontraron con pruebas de hemaglutinación negativas en uno de 15 pacientes; esta persona había sido tratada con cloramfenicol a las pocas horas de manifestarse la enfermedad.

Por otro lado, Payne *et al.* (8) obtuvieron resultados positivos en las pruebas de hemaglutinación con sueros de personas que vivían en zonas endémicas y que nunca manifestaron síntomas de peste ni habían sido vacunadas contra la enfermedad. Algunos de nuestros pacientes presentaron también pruebas de hemaglutinación positivas y, al parecer, nunca padecieron la enfermedad.

En todos los casos del grupo C, los sueros resultaron positivos en las pruebas de hemaglutinación; los pacientes habían sido tratados con sulfonamida más estreptomina (6 casos) o terramicina (2 casos) en la primera semana siguiente al comienzo de la enfermedad, y se restablecieron fácilmente.

Es interesante señalar que de los 49 casos enumerados en los cuadros 1, 2 y 3, sólo 4, de 22 que manifestaron síntomas de peste, no mostraron anticuerpos perceptibles en el suero.

Por último, se desea advertir que existe la posibilidad de que las cepas de *P. pestis* en esos casos fueran de virulencia distinta o que la producción de anticuerpos en ellos fuera también diferente (edad, quimioterapia precoz, etc.).

#### Resumen

La reactivación de focos de peste bubónica humana en zonas endémicas del Brasil durante 1964-1966, indujo a comprobar la utilidad de la prueba de hemaglutinación, adaptada a la microtécnica, para el diagnóstico de esta enfermedad en zonas rurales de los Estados de Bahía y Minas Gerais en el Brasil. La enfermedad se diagnosticó clínica y bacteriológicamente en 1965 y 1966. Para la prueba se obtuvieron muestras de sangre de pacientes restablecidos.

Los sujetos examinados integraban tres grupos. En el primer grupo, que incluía 11 personas, los sueros con un título de 1:24 o mayor se consideraron positivos. En el segundo y tercer grupos, que incluían respectivamente 30 personas y 8 personas, las aglutinaciones observadas a las diluciones de 1:4 y 1:8 se consideraron sospechosas, y las observadas a una dilución de 1:16, o más, se registraron como positivas. Las pruebas serológicas de los tres grupos se hicieron con hematies ovinos tanados (grupo A), formolados y tanados (grupos B y C), y sensibilizados con fracción 1 ( $F_1$ ) de *Pasteurella pestis*. Como líquido de dilución de los sueros se utilizó, en todas las pruebas, una solución salina fisiológica más suero normal de conejo al 5%, inactivado y adsorbido en hematies ovinos.

Los resultados de la investigación indican que se logró obtener el diagnóstico retrospectivo de la peste bubónica humana mediante la prueba de hemaglutinación, empleando el método de microtécnica. Esta prueba permitió confirmar el diagnóstico clínico y epidemiológico en la mayoría de los pacientes que se restablecieron de la peste. Se observaron resultados positivos incluso en pa-

cientes cuyas muestras de sangre se obtuvieron más de un año después de la manifestación de los síntomas de la enfermedad. □

### Agradecimiento

Se agradece a los doctores Karl F. Meyer y T. H. Chen, Fundación George Williams Hooper; Alfredo N. Bica, Organización Panamericana de la Salud; Raúl Cuadrado, Banco de Suero de la Organización Mundial de la Salud, Universidad de Yale, y Paulo de Góes,

Agregado Científico, Embajada del Brasil en Washington, D. C. (Ex Director del Instituto de Microbiología, Río de Janeiro) por todas las sugerencias, ayuda y consejos recibidos. Se desea asimismo dar las gracias a las innumerables personas del Departamento Nacional de Endemias Rurales del Brasil que nos prestaron ayuda en distintas fases de la labor en el campo o en el laboratorio, principalmente a los doctores Francisco Gualberto Dantas Fontes, Renato Araújo, Rubem Bacelar, Raymundo Siebra de Brito, a la Sra. Rosa María Brígido y al Sr. Edivaldo Alves de Araújo.

### REFERENCIAS

- (1) Chen, T. H. y Meyer, K. F. "Studies on Immunization against Plague. VII: A Hemagglutination Test with the Protein Fraction of *Pasteurella pestis*: A Serologic Comparison of Virulent and Avirulent Strains with Observations on the Structure of the Bacterial Cells and its Relationship to Infection and Immunity." *J Immunol* 72(4):282-298, 1954.
- (2) Sever, J. L. "Application of a Microtechnique to Viral Serological Investigations." *J Immunol* 88(3):320-329, 1962.
- (3) Chen, T. H. y Meyer, K. F. "An Evaluation of *Pasteurella pestis* Fraction I Specific Antibody for the Confirmation of the Plague Infections." *Bull Wild Hlth Org* 34(6):911-918, 1966.
- (4) Meyer, K. F. "Serological Tests for the Confirmation of Plague Infections: A Preliminary Communication." *Bull Wild Hlth Org* 30(5):750-751, 1964.
- (5) Cavanaugh, D. C., Thorpe, B. D., Bushman, J. B., Nicholas, P. S. y Rust, J. H., Jr. "Detection of an Enzootic Plague Focus by Serological Methods." *Bull Wild Hlth Org* 32(2):197-203, 1965.
- (6) Meyer, K. F., McNeill, D. y Wheeler, C. M. "Results of a Preliminary Serological Survey of Small Mammal Populations for Plague on the Island of Hawaii." *Bull Wild Hlth Org* 33(6): 809-815, 1965.
- (7) Mello, M. T. "La prueba de hemoaglutinación para el diagnóstico de la peste." *Bol Ofic Sanit Panamer* 62(2):151-156, 1967.
- (8) Payne, F. E., Smadel, J. E. y Courdurier, J. "Immunologic Studies on Persons Residing in a Plague Endemic Area." *J Immunol* 77(1):24-33, 1956.
- (9) McCrumb Jr., F. R., Mercier, S., Chen, T. H., Meyer, K. F. y Goodner, K. "Studies on the Antibody Patterns in Pneumonic Plague Patients." *J Inf Dis* 96(1):88-94, 1955.

### Hemagglutination Microtechnique for a Retrospective Diagnosis of Human Plague in Rural Areas of Brazil (Summary)

The reactivation of foci of human bubonic plague in the endemic areas of Brazil during the period 1964-1966 led to checking the usefulness of the hemagglutination microtechnique test in diagnosing the disease in rural areas of the States of Bahia and Minas Gerais. Both the clinical and the bacteriological diagnoses were made in 1965 and 1966, and the blood samples used for the test came from patients who had recovered from the disease.

Three different groups were tested. The first consisted of 11 persons, among whom those who had a serum titer of 1:24 or over were considered positive; the second and third groups consisted of 30 and 8 persons, respectively, among whom agglutinations observed

at 1:4 and 1:8 dilutions were considered suspect, and agglutinations observed at dilutions of 1:16 or over were recorded as positive. The serological tests in all three groups were made with tanned red blood cells of sheep (Group A), formalized and tanned (Groups B and C), and sensitized with fraction 1 ( $F_1$ ) of *Pasteurella pestis*. To dilute the sera in all cases, a saline solution plus normal 5% rabbit serum, inactivated and adsorbed in red blood cell of sheep, were used.

Survey results indicated that retrospective diagnoses of human bubonic plague could be obtained through the hemagglutination test, using the microtechnique method. The test



made it possible to confirm the clinical and epidemiological diagnosis in most patients who had recovered from plague. Positive results

could be observed even in those patients whose blood samples were obtained one year after they had manifested the disease.

### **A Microtécnica da Hemaglutinação para o Diagnóstico Retrospectivo da Peste Humana em Zonas Rurais do Brasil (Resumo)**

A reativação dos focos de peste bubônica humana em zonas endêmicas do Brasil durante 1964-1966 deu ensejo a que se comprovasse a utilidade da prova de hemaglutinação, adaptada à microtécnica, para o diagnóstico da doença em zonas rurais dos Estados da Bahia e de Minas Gerais, no Brasil. A doença foi diagnosticada por exame clínico e bacteriológico em 1965 e 1966. As provas foram feitas com amostras de sangue de pacientes restabelecidos.

As pessoas examinadas compunham três grupos. No primeiro, integrado por 11 pessoas, os sêros com um título de 1:24 ou mais foram considerados positivos. No segundo e terceiro grupos, que abrangiam, respectivamente, 30 e 8 pessoas, as aglutinações observadas nas diluições de 1:4 e 1:8 foram consideradas suspeitas e as observações na diluição de 1:16 ou mais foram registradas como positivas. As provas sorológicas dos três grupos

foram feitas com hemácias de ovinos tratadas em ácido tânico (grupo A), em formol e ácido tânico (grupos B e C), e sensibilizadas com fração 1 (F<sub>1</sub>) de *Pasteurella pestis*. Como líquido para a diluição dos sêros foi empregada, em tôdas as provas, uma solução salina fisiológica com sêro normal de coelho a 5%, inativado e adsorvido em hemácias de ovinos.

Os resultados da pesquisa indicam que foi possível obter o diagnóstico retrospectivo da peste bubônica humana mediante a prova de hemaglutinação, empregando-se o método de microtécnica. Referida prova permitiu confirmar o diagnóstico clínico e epidemiológico na maioria dos pacientes que se restabeleceram do ataque da doença. Foram observados resultados positivos inclusive entre pacientes cujas amostras de sangue foram obtidas mais de um ano depois da manifestação dos sintomas da enfermidade.

### **La microtechnique de l'hémagglutination dans le diagnostic rétrospectif de la peste humaine dans les zones rurales du Brésil (Résumé)**

La réactivation de foyers de peste bubonique humaine dans les zones endémiques du Brésil en 1964-1966 a amené à vérifier l'utilité de l'épreuve d'hémagglutination, adaptée à la microtechnique, lors du diagnostic de cette maladie dans les zones rurales des Etats brésiliens de Bahia et de Minas Gerais. La maladie a été diagnostiquée cliniquement et bactériologiquement en 1965 et en 1966. Pour procéder à l'épreuve, des échantillons de sang ont été prélevés sur des malades rétablis.

Les sujets examinés ont été répartis en trois groupes. Dans le premier groupe qui comprenait 11 personnes, les sérums ayant un titre de 1:24 ou plus ont été trouvés positifs. Dans les deuxième et troisième groupes, comprenant respectivement 30 et 8 personnes, les agglutinations observées dans les dilutions de 1:4 et 1:8 ont été considérées suspectes, et celles observées dans les dilutions de 1:16 ou plus se sont révélées positives. Les épreuves

sérologiques des trois groupes ont été effectuées avec des hématies ovines traitées au tanin (groupe A), au formol et au tanin (groupes B et C), et sensibilisées à l'aide d'une fraction 1 (F<sub>1</sub>) de *Pasteurella pestis*. Comme liquide de dilution des sérums, on a utilisé, dans toutes les épreuves, une solution saline physiologique plus le sérum normal de lapin à 5%, inactivé et adsorbé dans des hématies ovines.

Les résultats de l'enquête indiquent que l'on est parvenu à obtenir le diagnostic rétrospectif de la peste bubonique humaine au moyen de l'épreuve d'hémagglutination en employant la méthode de microtechnique. Cette épreuve a permis de confirmer le diagnostic clinique et épidémiologique chez la plupart des malades rétablis de la peste. On a constaté des résultats positifs, même chez les malades dont les échantillons de sang ont été prélevés plus d'un an après la manifestation des symptômes de la maladie.