## O EXAME DE WIDAL

A reação de Widal, ou teste de GruberWidal, é um teste serológico presuntivo que permite detectar a infecção por bactérias do género Salmonella, em geral aplicado em indivíduos que apresentam sintomas de Febre Tifoide ou de Brucelose (9).

A Febre Tifoide é uma doença bacteriana aguda de distribuição mundial. É causada pela Salmonella enterica sorotipo Typhi. Deve-se conhecer a Febre Tifoide como uma doença infecciosa de alta prevalência em todo mundo. Devido a sua evolução gradual apesar de ser uma doença aguda, o quadro clínico geralmente não se apresenta claro e a doença deixa de ser diagnosticada precocemente (32) (8).

O nome do teste Widal, resulta de ter sido inventado pelo médico francês Fernand Widal (1862 – 1929), com base no trabalho do higienista alemão Max von Gruber (7).

A Reação de Widal, embora muito utilizada em nosso meio, é passível de inúmeras críticas quanto à sua padronização, devido aos diferentes resultados que podem ser encontrados dependendo das cepas de Salmonella envolvidas e possível interferência de vacinação prévia. Atualmente, não é indicada para fins de vigilância epidemiológica, já que não é suficiente para confirmar ou descartar um caso, pelo risco de ocorrerem resultados falsos-positivos ou falsos-negativos (8) (33).

Os antígenos de interesse para o Exame de Widal são:

* Antígeno O: para a Salmonella enterica sorotipo Typhi, é o antígeno somático específico, de natureza glicidolipídica, altamente tóxico, identificando-se com a endotoxina do tipo O. É termo estável.
* Antígeno H: flagelar, é de natureza proteica; a composição e ordem dos aminoácidos da flagelina determinam a especificidade flagelar. É termolábil.
* Antígeno Vi: é um antígeno de superfície que parece recobrir o antígeno O, não permitindo a sua aglutinação. É termolábil.

Esses três antígenos determinam anticorpos aglutinadores específicos: anti-O, anti-H e anti-Vi.

Geralmente o teste de reação de Widal consiste em veriﬁcar qualitativamente e quantitativamente a aglutinação de anticorpos numa amostra de sangue após a adição de uma pequena quantidade dos antigénios O-somático e H-ﬂagelar. Ou seja, ela mede os níveis de anticorpos aglutinantes produzidos contra os antígenos “O” e “H” da Salmonella Typhi (34).

Existem, no entanto, dois (2) métodos disponíveis para a realização do Exame de reação Widal: Exame de aglutinação em placa (Qualitativo e Quantitativo) e Exame em Tubo.

A reação em Placa ou em Lâminas é de realização prática e fácil de modos a nos dar uma resposta rápida. No entanto, apresenta maior índice de resultados falsos-positivos, comprometendo a qualidade e a confiabilidade do teste. Por isso não deve ser praticado, principalmente nas áreas endémicas. Por outro lado, a reação em Tubos é um teste mais sensível e mais específico (36).

Sendo apenas presuntiva e sujeita a frequentes falsos positivos, caiu em desuso na prática clínica, substituída por métodos de detecção directa em hemocultura e coprocultura e por testes de diagnóstico rápido como o Dip-S-Ticks (IgG), TyphiDot (IgG,IgM) e TUBEX (IgM) (7).

### **Procedimentos Analíticos na Realização do Exame de Widal**

**Materiais e equipamentos necessários**

* Algodão hidrófilo
* Garrote
* Suporte de tubos de ensaio
* Livro para registo de dados
* Macro centrífuga
* Agitador de 100 r.p.m (rotação por minutos)
* Tubos BD Vacutainer sem anticoagulante de 7 ml
* Tubos de ensaio
* Seringa com agulha ou agulha de vacutainer com o seu cabo
* Placa serológica
* Pipeta
* Caneta de filtro ou lápis demográficos
* Pontas amarelas de 100 ul
* Álcool a 70%

#### Execução do exame qualitativo e quantitativo (placa)

Procedimentos Gerais:

1. Deixar o reagente e a amostra na temperatura do meio ambiente.
2. Colocar 50 µL da amostra a examinar e uma gota de 50 µL de cada controlo em placas separadas.
3. Homogeneizar o reagente suavemente antes de examinar. Adicionar logo de seguida uma gota de antigénios que estiver próximo da gota a examinar.
4. Misturar com ajuda de um palito, procurando estender a mistura em toda a superfície do circulo.
5. Colocar a placa (plástica) sobre um agitador a 80-100 r.p.m durante um minuto.
6. Para leitura, examinar macroscopicamente a presença ou ausência de aglutinação.
7. Tirar imediatamente a placa do agitador e comparar os resultados obtidos com os dos controlos.

O soro em análise é diluído e as diluições colocadas em contato com reagentes que contém antígenos somático (grupo D) e flagelares (a, b e d) de Salmonella. Após 1 minuto de agitação o material é analisado pesquisando-se a ocorrência de aglutinação (prova positiva) ou não. Caso a prova em lâmina apresente-se positiva, deve-se obrigatoriamente haver confirmação do resultado com a prova em tubo (17).

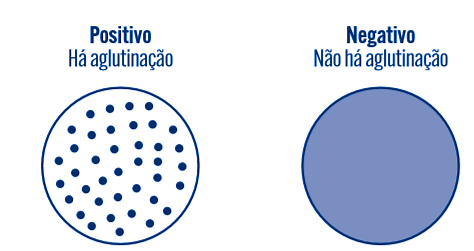
Empregam-se na reação de Widal, também os antígenos “O” somático e “H” flagelar que lhe aumentam o valor diagnóstico. O soro dos doentes de febre tifoide contém anticorpos dirigidos contra os antígenos “O” e “H” de *S. Typhi* ou de outras salmonelas envolvidas no processo infeccioso (37) (8).

**Procedimentos para o Método Qualitativo**

No método qualitativo, para se fazer os procedimentos primeiramente devemos deixar todos os reagentes e as amostras atingirem a temperatura ambiente e agitar o reagente gentilmente antes do uso (37):

Para a interpretação dos resultados no método qualitativo, examina-se macroscopicamente a presença ou ausência de aglutinação logo após 1 minuto (37).

FIGURA 1 – PRESÊNÇA OU AUSÊNCIA DE AGLUTINAÇÃO



FONTE: BIÓLOGOS OD. (37).

Para as amostras que apresentarem aglutinação no teste qualitativo (amostra pura) deve-se proceder com o teste semi-quantitativo para confirmação.

O teste semi quantitativo no exame de widal geralmente se refere à técnica de diluição em série, na qual são feitas diluições progressivas do soro do paciente para identificar os títulos de anticorpos contra os antígenos da salmonela.

No método semi-quantitativo a leitura dos resultados faz observando cada tubo macroscopicamente comparando com os tubos de controles. Controle positivo deverá apresentar aglutinação parcial ou completa e controle negativo não deverá apresentar aglutinação (37).

Para os valores esperados, as amostras com título entre 1/40 e 1/80 são suspeitos de doença. Amostras com títulos maiores que 1/80 (antígenos somáticos) e 1/160 (antígeno flagelar) juntamente com a sintomatologia clínica do paciente são considerados provas concluintes para o diagnóstico da doença (37).

#### Execução do exame em Tubo

1. Separar o soro por centrifugação e transferi-lo com pipeta para o tubo de ensaio muito seco.
2. Em suporte de tubo, com três fileiras de orifícios, dispor 7 tubos de ensaio, em cada fila. Desta maneira faz-se simultaneamente prova de aglutinação com as três suspeições: tífica, paratífica A e paratífica B, cada qual em uma fila.
3. Ao primeiro tubo de cada fila adicionar 0,9 ml de solução fisiológica e em todos os tubos 0,5 ml da mesma solução.
4. Colocar no primeiro tubo somente 0,1 ml do soro em exame, nas três séries de tubos, usando-se, portanto, o total de 0,3 ml de soro. Agitar o segundo tubo e transferir 0,5 ml para o terceiro. Agitar esse tubo e qual 0,5 ml não deve ser posto no sétimo, mas deitado fora.
5. O sétimo tubo conterá apenas a solução salina, sem soro, e servirá de testemunho da reacção.
6. Obtém-se, deste modo, série de diluições do soro, como se segue: 1/10,1/20, 1/40, 1/80,1/160 e 1/320.
7. Acrescentar a cada tubo 0,5 ml de suspensão bacteriana na primeira fileira, a suspensão de bacilos B, assinalando com T, A e B. Esta última adição duplica a diluição do soro em cada um dos tubos, de modo que as diluições finais são; 1/20, 1/40, 1/80,1/160,1/320 e 1/640.
8. Em alguns casos, é aconselhável usar mais de um tubo, com diluição 1/280.
9. Agitar bem, misturando completamente o conteúdo de todos os tubos, e deixar repousar em lugar moderadamente quente, ou nas esrufas a 37C pelo espaço de 8-12 horas, as vezes menos tempo, 5 horas.

**Reagentes Utilizados**

* Reagente Antígeno Bacteriano – frascos com 3ml (A, B, O e H) Suspensão de Salmonela em Buffer Glicina pH 8,2 e Azida Sódica 0.5 g/L;
* A – Antígenos Paratyphoid A (salmonela, antígeno flagelar a), suspensas em solução salina. Contém 0,1% de formol como preservativo.
* B – Antígenos Paratyphoid B (salmonela, antígeno flagelar b), suspensas em solução salina. Contém 0,1% de formol como preservativo.
* C – Antígenos Typhoid O (salmonela, antígeno somático O).
* H – Antígenos Typhoid H (salmonela, antígeno flagelar d), suspensas em solução salina. Contém 0,1% de formol como preservativo.
* Controle Positivo – frasco com 0, 5 mL. Matriz soro animal, anticorpos Salmonela > 50 UI/mL, azida sódica 0.95 g/L
* Placa de PVC para leitura.

**Quanto ao Armazenamento e Estabilidade, p**ara fins de transporte o conjunto pode ser mantido em temperatura ambiente no máximo 72 h. A metodologia utilizada para a realização do teste de Widal é a de Aglutinação Bacteriana, sendo que a temperatura da análise deve ser de 18 – 25ºC, e a temperatura de armazenamento da análise em geladeira de 2 – 8ºC aonde permanece estável até a data de validade expressa em rótulo desde que isento de contaminação química ou microbiana (37) (8).

Os soros das amostras devem durar 7 dias se conservada à uma temperatura de 2-8ºC. Deverão durar 3 meses se conservadas à uma temperatura de -20ºC (37).

**Precauções e Cuidados Especiais**

* Os reagentes destinam-se ao uso de diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas (8);
* Devem-se manipular os reagentes com cautela no sentido de evitar sua contaminação química ou biológica (8);
* Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (8).
* Amostras contendo fibrina devem ser centrifugadas;
* Não usar amostras contaminadas, hemolisadas ou amostras lipémicas;
* Não necessita de ativação

Quanto ao controle de qualidade, para monitorar o desempenho do procedimento são recomendados os controles positivos e negativos (usando solução fisiológica), assim como um teste padrão comparativo para uma melhor interpretação do resultado (37).

A limitação neste procedimento, consiste em que o diagnóstico clínico não deve ser feito em preenchimento de um único resultado de teste, mas deve integrar dados clínicos e do laboratório (37).

No entanto, algumas precauções a serem tomadas são:

* Usado para diagnóstico *In Vitro* (37);
* Todos os componentes de origem humana apresentaram resultados negativos para o antígeno HBs e para o anti-VIH. No entanto, devem ser tratados com precaução como potencialmente infecciosos (37);
* Os antígenos devem estar homogêneos antes do uso. Isto pode ser realizado por inversão cuidadosa dos frascos de reagentes antes do uso. Não agitar vigorosamente (37);
* O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente (37);
* Seguir exatamente a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos (37);
* Ler imediatamente após um minuto, pois a demora para a leitura poderá apresentar resultado falso-positivo (37);
* Contaminação bacteriana nos reagentes, nas amostras ou solução salina, congelamento dos antígenos e resíduos de detergente nos tubos geralmente saõ causas de resultados falso-positivos (37).

### **Procedimentos de Amostras para o Exame de Widal**

1. **Preparo do Paciente:** Apesar do jejum prévio não ser necessário, recomenda-se sempre que possível que o paciente seja instruído a manter jejum de 8 a 12h antes da coleta, para evitar uma possível ocorrência de fenômenos interferentes tais como a lipemia (17);
2. **Tipos de Amostra:** A amostra para a prova é o soro (não usar plasma) recém-obtido, separado o mais rapidamente possível do coágulo após a colecta, isento de hemólise ou lipemia (17);
3. **Armazenamento e Estabilidade:** Entre a coleta e a execução da análise, a amostra deve ser mantida em geladeira (2-8 ºC) (17);
4. **Critérios para Rejeição:** As amostras que se apresentarem hemolisadas, lipémicas, com indícios de contaminação microbiana ou de congelamento deverão ser rejeitadas (17);
5. **Precauções e cuidados especiais:** Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infecto-contagiosas (hepatite, SIDA etc.). Seu descarte deve ser feito preferencialmente após sua auto clavação devendo-se evitar sua eliminação diretamente no meio ambiente. Igual cuidado se recomenda no descarte de outros materiais como ponteiras plásticas, agulhas e seringas (17).