

CONFERENCIAS

«**DA SECÇÃO DE SOROLOGIA DO INSTITUTO BIOLOGICO, S. PAULO**»
DIRECTOR: PROF. H. DA ROCHA LIMA

SÔROLOGIA DA LEPRO

OTTO BIER

Numerosas reacções têm os sôrologistas posto á disposição dos clinicos com o objectivo de elucidar ou de confirmar o diagnostico de lepra. Todavia, quando se faz um balanço de todas essas reacções, chega-se á conclusão de que em geral ellas não satisfazem o objectivo a que deveriam attingir, isto é, o de fornecerem indicações menos discutíveis do que as obtidas pelo exame dermatologico (incluidas pesquisas accessorias de laboratorio de simples execução, como a pesquisa directa de bacillos nas máculas, no mucó nasal, etc.)

Não se argumente que e a impossibilidade de cultivar o bacillo de Hansen, o facto retardador do progresso nesses estudos pois que, na tuberculose, apesar da descoberta de *R. Koch* se ter feito em 1884, os estudos sôrologicos só progrediram lentamente desde o antígeno de *Wassermann*, através dos antígenos de *Besredka*, de *Boquet e Nègre*, de *Klopstock* e *Neuberg*, até o recente extracto de *Witebsky, Klingenstein e Kuhn* (1931) que, em razão de sua alta sensibilidade e especificidade representa effectivamente um progresso real na sôrologia da tuberculose.

Quaes as difficuldades que se antepõem ao sôrologista, mesmo quando possui a cultura pura do germe, no objectivo de encontrar uma *reacção sôrologica especifica*?

O sôro leproso exemplifica melhor do que qualquer outro as origens destas difficuldades.

1.º — Ausencia de cultura do bacillo de *Hansen*. Falta, pois, a *materia prima especifica* para o preparo do antígeno. Nestas circunstancias, deve o sôrologista contentar-se em trabalhar com antígenos de bacterias affins do b. de *Hansen*, como por exemplo, o *Streptothrix leproides* de *Deicke*, ou então, adoptar o ponto de vista que me parece mais razoavel, o de ensaiar antígenos preparados com o germe parente mais proximo do bacillo de *Hansen*, o bacillo de *Koch*.

2.º — Occurencia no sôro leproso de anti-corpos contra lipoides ubiquitarios.

Como é sabido, a reacção de *Wassermann* é hoje interpretada em Immunidade como uma reacção entre lipoides ubiquitarios dos tecidos (extracto alcoolico de coração bovino) e anticorpos contra esses lipoides, que existem no sôro syphilitico.

Em consequencia de destruições tissulares provocadas pelo espiroqueta, os lipoides dos tecidos são libertados, entram em complexos proteicos (*activação do hapteno*), provavelmente com substancias provenientes do proprio corpo do espirocheta e geram deste modo, auto-anti-corpos contra os lipoides ubiquitarios. (*Sachs* e colaboradores).

Ora, em certas molestias, como na malaria, e, em particular, na lepra (sobretudo na lepra tuberosa) ha intensa destruição de tecidos, com a resultante formação de reaginas anti-lipoides que produzem uma reacção de *Wassermann* positiva.

Witebsky propôs para estes resultados a designação "uncharakteristisch"; impropriamente seriam ditos "inespecificos", visto que occorrem no sôro malarico, bem como no sôro leproso as mesmas alterações humoraes (anti-corpos contra os lipoides ubiquitarios) presentes no sôro syphilitico.

Seja como fôr, a occorencia de taes reaginas no sôro leproso levanta duas questões de grande interesse para quem estuda a sôrologia da lepra:

a) Possibilidade de uma reacção positiva em presença de antigeno tuberculoso, de *Streptothrix* (*Deicke, Gomes*), de *Actinomyces* (*Jordan*) etc, devida, porém, não aos lipoides bacterianos especificos, mas aos lipoides ubiquitarios que porventura impurifiquem o antigeno.

b) Diagnostico sôrologico diferencial entre lepra e syphilis. Como interpretar uma reacção de *Wassermann* positiva em um sôro leproso?

Voltaremos mais tarde a estas questões; devemos, porém, falar agora de um terceiro factor que complica o estudo da sôrologia da lepra: a chamada *labilidade* do sôro.

3.º) "Labilidade" do sôro leproso.

E' sabido que numa serie de estados pathologicos, as proteínas do sôro se apresentam num estado particular de "labilidade", em virtude do que ellas flocculam em presença de reactivos que não precipitam as proteínas dos sôros normaes.

E' o que acontece, por exemplo, na tuberculose, no cancer, na gravidez, leishmaniose, etc. e Lambem na lepra. Esta "labilidade" se exterioriza por um augmento da velocidade de sedimentação, bem

como por uma serie de reacções que consistem na flocculação do sôro por meio de reactivos diversos e que obviamente não merecem figurar ao lado das reacções sôrologicas especificas, como, por exemplo, as reacções de *Daranyi*, de *Matefy*, reacção á resorcina de *Vernes*, a sôrocoagulação de *Weltmann* na tuberculose; a reacção de *Botelho*, a lecithino-flocculação de *Sachs*, no cancer; a formol-gelificação ou a flocculação pela agua distillada, na leishmaniose, etc.

Igual consideração merecem uma série de reacções que se têm proposto para o diagnostico da lepra e que não passam de reacções de labilidade, com n'a margem de inespecificidade mais ou menos larga.

Ao sôrologista, entretanto, o conhecimento da "labilidade" das sôroproteinas é de grande interesse porque pôde interferir com a "especificidade" das reacções sôrologicas.

Assim, por exemplo, é conhecido que o sôro de grávida produz uma reacção de *Wassermann* positiva: isto é devido a que as proteínas do sôro na gravidez são "labeis" (augmento da velocidade de sedimentação!) e flocculam em presença de lipoides, adsorvendo inespecificamente o complemento ou um de seus componentes.

Um *antígeno específico* para reacções de fixação do complemento ou de flocculação não deve, pois, precipitar em presença de sôros labeis, maximé quando se destinam ao diagnostico de doenças nas quaes o sôro apresenta o estado de "labilidade", corno é o caso na tuberculose e na lepra.

Feitas estas considerações, passaremos a referir o estado actual das pesquisas sobre anticorpos contidos no sôro leproso e da sua utilização para o diagnostico da lepra, (reacção de *Eitner*). Trataremos em primeiro lugar dos anticorpos fixadores do complemento e, depois, da chamada agglutinina leprosa (reacção de *Rabino*).

(1) ANTICORPOS FIXADORES DO COMPLEMENTO.

O sôro leproso é capaz de fixar o complemento em presença de duas ordens de antigenos lipoides:

b) lipoides ubiqüitarios (WaR.)

a) Lipoides bacterianos extrahidos do b. *Hansen* ou de bacterias proximas (reacção de *Eitner*).

Analysemos successivamente cada uma destas reacções.

(a) Dentre os innumerados antigenos que se têm usado para a fixação do complemento pelo sôro leproso em presença de extractos do bacillo de *Hansen*, desde as pesquisas iniciaes de *Eitner* com extracto de lepromas, destacaremos os antigenos preparados com o *Streptothrix leproides* (antigeno de *Gomes*) e o antigeno tuberculoso de *Witebsky*, *Kllngenstein* e *Kuhn*.

Antígeno de Gomes — *Gomes* (1927) applicou ao *Streptothrix leproides de Deicke*, o processo recommendado por *Mc. Junkin* para o desengorduramento de bacillos acido-resistentes e que consiste em tratar os germes por acetona e oleo de olivas. Com os *Streptothrix* assim desengordurados (condição essencial é o desaparecimento das fôrmas acido-resistentes: não pôde haver mais de 6 a 10 bacillos acido-resistentes por campo), *Gomes* preparou um antígeno, que teria grande especificidade a sensibilidade para a fixação do complemento na lepra.

Recentemente, *Assumpção* e *Fleury da Silveira* submetteram este antígeno a cuidadoso controle e obtiveram os seguintes resultados:

TABELLA 1

Fixação do complemento com antígeno de Gomes.
(segundo *Assumpção* e *Fleury da Silveira*, 1935)

<i>Diagnostico</i>	<i>Reacções positivas</i>
Lepra cutanea	90,4 %
" mixta	85 %
" nervosa	70 %
Syphilis	0 %
Tuberculose	30 %
Leishmaniose	70 %
Individuos sãos	0 %

Ressalta na tabella acima a grande margem de inespecificidade deste antígeno na *leishmaniose*. Como veremos a seguir, o mesmo phenomeno se observa cem o antígeno tuberculoso de *Witebsky*.

Antígeno de Witebsky — *Witebsky*, *Klingenstein* e *Kuhn* se preocupam em obter um extracto de lipoides do bacilo de *Koch*, que revelasse especificamente o anticorpo tuberculoso, mas que fosse insensivel á labilidade das proteínas de sôro tuberculoso e, ao mesmo tempo, isento dos lipoides fixadores do complemento em presença do sôro syphilitico.

Conseguiram obter um antígeno dotado destas qualidades, extrahindo dos b. de *Koch* os lipoides insoluveis no alcool e na acetona, soluveis na piridina e no benzol.

Verificaram também que a adição de lecithina reforça sensivelmente o extracto, sem torná-lo inespecífico.

Os resultados do emprego deste antígeno na tuberculose são excellentes e de ordem a fornecer ao clinico: 1. Elementos para o diagnostico. (alta sensibilidade do antígeno para o diagnostico da tuberculose pulmonar do adulto).

2. Elementos para controle do tratamento. — A reacção desaparece á medida que se processa a cura clinica, após um tratamento effcaz, pneumothorax, por exemplo.

Já em seu trabalho original (1931), *Witebsky* e col. se referem ao emprego deste antígeno em doenças produzidas por germes parentes do bacillo de *Koch*, como a diphtheria e a lepra e communicam ter obtido resultados positivos na maioria dos sôros examinados (material proveniente do leproario de Riga; não ha referencia á forma clinica de lepra).

Logo a seguir (1932). *Brants*, em Riga, confirma a grande sensibilidade do antígeno de *Witebsky* na lepra *tuberosa* e na lepra *mixta* (100% de 54 sôros examinados), porém obtêm apenas 6 reacções positivas em 26 sôros de lepra nervosa.

Resultados analogos foram publicados em 1933 por *Kornel* e *Kitoshi* e, em 1935, por *Bier* e *Arnold* (São Paulo) e por *Costa Cruz* e *Machado* (Rio de Janeiro).

Os resultados que obtive, de collaboração com *Arnold*, no exame de 272 sôros leprosos, por meio da technica de *Witebsky* e col. ligeiramente modificada, foram os seguintes:

TABELLA 2

Fixação do complemento na lepra com o antígeno tuberculoso de *Witebsky*, *Klingenstein* e *Kuhn* (segdo. *Bier* e *Arnold*, 1935).

<i>Forma clinica de lepra</i>	<i>N.º de casos</i>	<i>N.º de reacções total</i>	<i>positivas %</i>
Nervosa	14	8	57,1%
Cutanea	31	29	93,5%
Mixta	155	146	94,2%
Casos incipientes .	72	32	44,4%
Total	272	215	79 ,%

No que concerne á *especificidade*, no exame de cerca de 500 sôros de controle não tivemos qualquer reacção positiva; nos sôros Wassermann positivos, a reacção de Witebsky é tambem positiva em cerca de 7% dos casos.

Notavel é porém o facto observado por *Ficker* e confirmado recentemente em uma serie grande de sôros por *Bier* e *Planet* (1936), que o antigeno de *Witebsky* produz intensas fixações em presença dos sôros de individuos atacados de molestias cutaneas, em particular o *pemphigo* e a *leishmaniose*.

APLICAÇÃO DO PROCESSO DE WITEBSKY AO PREPARO DE ANTIGENOS LEPROSOS

Em virtude da grande sensibilidade exhibida pelo antigeno tuberculoso para a fixação do complemento na lepra, procurou-se naturalmente applicar o mesmo principio ao preparo de antigenos feitos com material leproso.

Aoki e *Murao* (1933) applicaram o processo de *Witebsky* a lepromas ricos em bacillos de *Hansen* porém além de obter fixações na lepra muito mais fracas que as obtidas com o antigeno tuberculoso, tiveram tambem cofixações em presença de sôros syphiliticos.

Bier e *Planet* (1935) estudaram as propriedades de um antigeno preparado segundo a technica de *Witebsky* com o *Streptotrix* e *leproides* de *Deicke* e mostraram que o antigeno assim obtido se comporta em relação á especificidade e á sensibilidade de modo paralelo ao antigeno tuberculoso de *Witebsky*, *Klingenstein* e *Kuhn*, embóra as fixações não atinjam a tão altas diluições e, por esse motivo, deixam em duvida certos resultados de sôros fracamente positivos.

O fraccionamento clinico do antigeno de *Streptothrix* se dá, entretanto, de modo perfeitamente analogo ao do B. de *Koch* e os lipoides especificos são aquelles insolueis no alcool e na acetona soluveis na piridina e no benzol.

Não ha pois razão de referir-se a *Streptothrix* *desengordurados*, como sendo o antigeno especifico da lepra (antigeno de *Gomes*), pois, na realidade, os *Streptothrix* esgotados pelo alcool e pela piridina perdem quasi completamente a capacidade de fixar o complemento em presença de sôros que dão intensas fixações com a fracção soluvel na piridina.

A unica vantagem do extracto estreptothrico, caso o aperfeiçoamento da technica tornem a sua sensibilidade tão alta como a do antigeno de *Witebsky* será a possibilidade de se obter rapidamente grandes massas de cultura de um germe innocuo, facilitando assim o preparo do antigeno.

A REACÇÃO DO SORO COM O ANTIGENO TUBERCULOSO E' UMA VERDADEIRA REACÇÃO ANTIGENO-ANTICORPO

Alguns autores têm attribuido pouco valor de especificidade ás reacções de fixação exhibidas pelo soro leproso em presença de antigenos constituídos por lipoides tuberculosos ou affins. *Rubino*, por exemplo, refere-se ao poder "poly-fixador" do soro leproso.

Podia-se pensar, pois, que a fixação do complemento com o antigeno tuberculoso fosse consequencia de uma especial lalibização dos sôros proteínas leprosas.

Para esclarecer este facto, *Bier* e *Arnold* fizeram experiencias de absorpção: o soro leproso previamente absorvido pelo antigeno de *Witebsky* ou pelo antigeno de *Gomes*, perde a capacidade de reagir com estes extractos, embôra conserve integralmente a capacidade de fixar o complemento em presença do antigeno syphilitico (tab. 4).

TABELLA 3

Absorpção dos anticorpos do soro leproso pelo antigeno tuberculoso ou pelo antigeno estreptothrico.

Quantidade decrescente de antigeno.	Hemolyse de globulos sensibilizados por complemento após contacto prèvio com antigeno de <i>Witebsky</i> , <i>Gomes</i> ou <i>Bordet</i> mais soro leproso:		
	a) nativo	b) abs. com ant. <i>Witebsky</i> .	c) abs. com ant. <i>Gomes</i> .
A) Antigeno de <i>Witebsky</i>			
1 27	++++	++++	++++
1 81	++++	+	+
1 243	++++	—	—
1 279	++++	—	—
0	—	—	—
B) Antigeno de <i>Gomes</i>			
1 40	++++	+	+++
1 120	++++	—	—
1 360	+++	—	—
0	—	—	—
C) Antigeno de <i>Kolmer</i> (lues)			
1 50	++++	++++	++++
1 150	++++	++++	++++
1 450	—	+	—
0	—	—	—

Particularmente apropriada para estas experiencias de absorção é a technica empregada por *D'Alessandro e Sofia*, em pesquisas sobre o soro tuberculoso e que repetimos com successo para o soro leproso: impregnar kaolin pelo antigeno de *Witebsky*, lavar por centrifugação e adsorver, então, os anticorpos pelo kaolin assim "activado".

MECHANISMO DA REACÇÃO DE WASSERMANN NA LEPROSA

A fixação do complemento pelo soro leproso em presença do antigeno syphilitico representa tambem uma verdadeira reacção antigeno-anticorpo no sentido de uma reacção lipoide ubiqutarios com anticorpos lipoides, ou é apenas a consequencia de um estado de labilidade?

Esta é uma questão para a qual o sórologista não póde dar ainda urna resposta definitiva.

Tudo parece indicar que a reacção de *Wassermann* na lepra seja devida ao concurso dos dois factores: labilidade e anticorpos lipoides.

Todavia, a solução definitiva desta questão deve ser procurada em pesquisas com a chamada "Bestatigungsreaktion" de *Witebsky*.

E' possivel eluir o anticorpo do precipitado que se forma pela mistura de antigeno mais soro syphilitico, submettendo a mistura a acção de uma temperatura elevada (55.º) e, centrifugando rapidamente. No caso de urna verdadeira reacção anticorpo lipoide (reacção de *Wassermann* especifica), o liquido sobrenadante ainda é capaz de fixar o complemento em presença do antigeno syphilitico, ao passo que, em se tratando do flocculado de uma reacção de labilidade, o sobrenadante não reproduz nova reacção positiva.

Pesquisas deste typo estão sendo feitas por nós não só com o soro leproso e antigeno syphilitico, mas tambem com soro de leishmaniose e antigeno tuberculoso, afim de esclarecer a inespecificidade de taes reacções.

Os resultados destas experiencias com o soro leproso talvez possam resolver definitivamente a questão ainda obscura do diagnostico sórologico differencial entre lepra e lues.

b) A *agglutinina leprosa*: reacção de *Rubino*.

Rubino verificou que o soro leproso tem a capacidade de augmentar a velocidade de sedimentação dos globulos formolados de carneiro e attribuiu este effeito a uma "agglutinina leprosa".

A reacção de *Rubino* é absolutamente especifica da lepra, porém infelizmente a sua sensibilidade é pequena, sobretudo na forma nervosa.

TABELLA 4

*Sensibilidade e especificidade da reacção de Rubino (technica 1929)
segundo diversos auctores*

Autor	N.º de séros leprosos examinados	N.º de séros controlles examinados	Positividade %				Inspecificidade 0/0
			nervosa	cutanea	mixta	Total	
Rubino (1. ^a Série) (1)	36	304	37,5	88,8	80,0	75,0	0,3
Rubino (2. ^a Serie)	126	39	—	—	—	61,9	0
Pinto de Figueiredo	65	43	26,6	44,0	74,0	58,2	0
Cerqueira Luz	79	96	33,3	50,0	50,0	44,0	0
Lépine, Markianos e Papayoanou	59	18	12,5	65,0	35,3	50,0	0
Fleury da Silveira e Mesquita	113	45	44,0	80,8	75,3	68,0	0
Bier e Arnold	327	945	35,5	66,6	56,5	53,0	0,1

Como verifiquei, de collaboração com *Arnold*, a positividade da reacção de *Rubino* varia em relação com a intensidade dos symptomas cutaneos como se pôde ver na tabella abaixo (tab. 5).

TABELLA 5

<i>Classificação de Manilla</i>	<i>Reacção de Rubino Total</i>
C1 N1	42
C1 N2	30
C1 N3	20
C2 N1	57
C2 N2	60
C2 N3	55
C2 N1	65
C3 N2	50
C3 N3	67

A meu vêr, o interesse da reacção de Rubino é menos pratico do que theorico: qual o motivo pelo qual a sedimentação acelerada dos globulos formulados de carneiro é uma reacção especifica do sarô leproso?

Nenhum sôro labil produz este phenomeno; trata-se de uma caracteristica do sôro leproso, na realidade bastante extranha e para a qual não ha ainda explicação.

Bier e Arnold mostraram que a "agglutinina leprosa" de *Rubino* nada tem a vêr com as reagentas que fixam o anticorpo com o antigeno tuberculoso, pois o sobrenadante dos globulos formulados conserva integralmente a capacidade de fixar o complemento em presença do antigeno de *Witebsky*.

Rubino estabelece uma certa relação entre a agglutinino-sedimentação dos globulos formulados e a reacção de Wassermann na lepra. Comparando os resultados obtidos com essas 2 reacções, verificaram *Rubino e Miravent* que os sôros leprosos *Rubino +* são tambem com muita frequencia Wassermann +. Por isso, diz *Rubino*, quando um sôro leproso é *Rubino —* e Wassermann +, deve esta reacção de Wassermann ser attribuida á lues e não á lepra.

Estas pesquisas são de grande interesse e merecem ser ampliadas, pois talvez tragam esclarecimentos sobre o mecanismo da reacção de *Rubino*.

Resumindo as considerações que fizemos sobre a sôrologia da lepra, podemos concluir que, no estado actual da questão, a fixação do complemento em presença do antígeno tuberculoso ou de bactérias affins (*Streptothrix*) é o melhor recurso que pôde offerecer o sôrologista para auxiliar o diagnostico de lepra.

O antígeno tuberculoso de *Witebsky*, *Klingenstein* e *Kuhn*, em razão da sua alta sensibilidade e especificidade (excluidos os casos particulares da leishmaniose, do pemphigo, etc.) deve ser o preferido para essa reacção.

O facto do antígeno de *Witebsky* dar reacções inespecificas em certas doenças cutaneas deve ser estudado cuidadosamente com o objectivo de eliminar (por exemplo pela inactivação do sôro leproso a 56° 30 min. e mais 15 min. a 60°) ou de differençar (pela reacção de confirmação de *Witebsky*) taes reacções inespecificas.

Quanto á estrutura sôrologica do sôro leproso, si quizermos schematizar, podemos dizer que misturando-se sôro tuberculoso + sôro syphilitico teremos quasi que synthetizado o sôro leproso, isto é, teremos um sôro que apresenta WaR+, *Witebsky* + e labilidade: a esta mistura teriamos ainda que adicionar aquelle factor enigmatico que produz a sedimentação accelerada dos globulos de carneiro: a agglutinina leprosa de *Rubino*.

BIBLIOGRAPHIA

Aoki, Y. & *Murao*, K. — Zur Brauchbarkeit des *Witebskyschen* Prinzips der Tuberkulos e Komplementbindungsreaktion fur die Lepra. Zeitschr. f. Immunitätsf. 79, 365-371 (1933).

Bier, O. & *Arnold*, K. — Ueber die Serologie der Lepra.

- I. — Die Spezifität and Sensibilität der *Rubino*-Reaktion. Untersuchungen fiber den Mechanismus der Reaktion. Arch. f. Schiffs u. Tropen Hyg. 39, 231-236 (1935)
- II. — Komplementbindung bei Lepra mit dem Tuberkulose. —Antigen von *Witebsky*, *Klingenstein* & *Kuhn*. Idem, 39, 237-238 (1935).
- III. — Die Serologische Differential Diagnose swischen Syphilis and Lepra. Idem, 39, 239-241 (1935).

Bier, O. Ueber die Serologie der Lepra

- IV. — Einfluss der Temperatur auf die Reaktions-fähigkeit des lepra serums mit Tuberkulose and Lues-Antigen. Idem, 39, 516-519 (1935).

V. Die Phenolausflockung unter hypotonischen Bedingungen als Labilitäts-äusserung des Lepraserums. *Idem*, 39, 40, 25-28 (1936)

Bier, O. & Planet, N. — Resultados da fixação do complemento na lepra com um antígeno preparado com o *Streptothrix leproides* (Deicke), segundo a technica de Witebsky, Klingenstein & Kuhn. *Compt. rend. Soc. Biol.* em publicação.

Costa Cruz, J. da & Cleomenes Machado, J. — Comunicação pessoal.

Ficker, M. — Comunicação pessoal.