

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA REAÇÃO DE RUBINO*

GUILHERME V. CURBAN**

INTRODUÇÃO

A sedimentação rápida das hemácias formoladas de carneiro pelo soro de doentes de lepra foi descoberta em 1926 por Rubino, que a utilizou como base de uma reação sorológica para diagnóstico da lepra. Estudos do Autor e da quase totalidade dos pesquisadores que se lhe seguiram demonstraram o caráter específico da reação, uma vez que se revelava positiva apenas em soros de doentes de lepra. Sua positividade, entretanto, se mostrava inconstante, variando de 22,2% a 98% nos resultados dos diversos Autores.

Circunscrita a apreciação do método aos limites estritos do campo diagnóstico, em que — em vista das citadas discrepâncias — as suas possibilidades se mostravam tão incertas e reduzidas, foi a reação de Rubino julgada pouco sensível e relegada ao esquecimento de leprólogos e sorologistas, em que pesasse a sua especificidade, de relevante importância imunológica.

A evolução dos conhecimentos da patologia da lepra, modificando fundamentalmente os conceitos outrora dominantes, notadamente no referente as relações entre o organismo e o bacilo de Hansen, veio propiciar critério mais amplo para a apreciação do fenômeno de Rubino. Assim, com base nos conhecimentos atuais, a indagação — em lugar de limitar-se à questão clássica do valor diagnóstico — deve ser estendida as possíveis relações entre o fator imunológico responsável pela reação e os diferentes modos de comportamento do organismo frente ao germe. Tal o objetivo pretendido no presente estudo.

HISTÓRICO

Em 1926, o pesquisador uruguaio Miguel C. Rubino (1926a), trabalhando em reações de fixação do complemento e desejando impedir a ação hemolítica natural dos soros humanos sobre as hemácias de carneiro, resolveu usá-las fixadas pelo formol. No curso de suas investigações observou certa vez que, de modo contrário ao habitual, em um dentre 713 soros examinados, os glóbulos formolados não se mantinham em suspensão mas, ao fim de poucos minutos, depositavam-se no fundo do tubo, ficando o soro sobrenadante quase clarificado. Procurando a origem do soro, verificou que provinha de um doente de lepra. Em investigações sucessivas, pôde demonstrar que o fato se repetia com muita freqüência em soros de doentes dessa moléstia.

Em soros não leprosos a suspensão não se depositava antes de 1 hora; durante esse tempo mantinha a sua estabilidade, apresentando-se a mistura opaca e homogênea. Em soros leprosos, em menos de 1 hora já se operava a deposição total ou parcial das hemácias formoladas, formando-se no fundo

* Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para concurso de Docência-livre de Clínica Dermatológica e Sifiligráfica.

** Docente-livre da Clínica Dermatológica e Sifiligráfica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Médico do D. P. L.

do tubo depósito escuro de limite superior nítido, com o líquido sobrenadante inteiramente clarificado ou apenas turvo, conforme a maior ou menor sedimentação das hemácias.

Nas primeiras pesquisas, em 12 soros de doentes de tuberculose, escarlatina e de 10 pacientes de moléstias neurológicas, hemiplecias, paraplegias e doenças de Parkinson, o fenômeno não ocorreu.

Em 100 soros não discriminados, em que havia 18 com positividade na reação de Wassermann, pôde observá-lo apenas em 2, com reação de Wassermann positiva, em doentes sem diagnóstico clínico suspeito de lepra. Portanto, o fenômeno não apresentava paralelismo com a reação de Wassermann. Em 25 soros de tuberculose e sífilis ativa nenhum se mostrou positivo, o mesmo acontecendo no soro de pacientes com pleurite, peritonite, ascite, anemias graves, uremia, com a exceção única de um caso de tuberculose caseosa.

Diferente foi o comportamento do soro de doentes de lepra, nos quais dentre 32 casos verificou a sedimentação rápida das hemácias formoladas em 25, equivalente a 78,13%. Ulteriormente, 3 dos 7 soros que não apresentavam capacidade sedimentadora passaram a demonstrá-la, o que elevou para 80% a porcentagem.

As hemácias formoladas de carneiro mostravam-se mais favoráveis que as humanas para a evidencição do fenômeno de Rubino.

A fixação da hemácia pelo formol constituía elemento de importância primordial, pois os soros leproso não sedimentavam hemácias de carneiro em estado natural. Portanto, a ação do soro leproso sobre a hemácia formolada, era eletiva. Em outras moléstias, o soro parece ter capacidade de aglutinar e sedimentar hemácias não formoladas e, menos intensamente, as formoladas. Rubino verificou que tal ação é exercida sobre a hemácia fixada pelo formol e não decorre da simples presença do formol, pois o acréscimo ulterior deste a mistura de suspensão globular e soro, ainda que em concentração superior a calculada para a formulação dos glóbulos, não produziu o fenômeno. Identificou-o Rubino como independente e distinto do simples aumento de velocidade de sedimentação das hemácias. Este ocorre não só na lepra mas em numerosos estados patológicos de origem diversa. Além disso, na lepra a sedimentação rápida das hemácias de carneiro formoladas muitas vezes não é acompanhada de aumento do índice de sedimentação e vice-versa, o que mostra a dissociação entre ambos. Contra a possibilidade de tratar-se de processo comum de hemoaglutinação opunha-se a diversidade de condições favoráveis ao desenvolvimento dos dois processos (temperatura).

A inativação do soro a 55-56°C, por 20 a 30 minutos, favorece a sedimentação dos glóbulos formolados, fazendo-a ocorrer em soros não capazes de a produzir quando ensaiados sem inativar. Todavia, a temperatura de 55 a 56°C tem ação inibidora sobre o processo, sem entretanto, suprimir a propriedade aglutino-sedimentadora. Assim, em tubo com a mistura de soro e suspensão de hemácias formoladas posta na estufa a 56°C não se ela a aglutino-sedimentação, que passa a se processar após remoção para estufa a 37°C. Rubino verificou redução de atividade do soro com o envelhecimento, a ponto de negativamente-se soros positivos com o correr do tempo. Com base nesses fatos, idealizou reação sorológica para diagnóstico de lepra, cuja técnica consistia na mistura de 1 cm³ de soro suspeito com 1 cm³ de hemácias formoladas de carneiro, mantida em estufa a 37°C durante uma hora. A reação era considerada positiva ou negativa conforme ocorresse ou não a sedimentação globular traduzindo-se pelo aspecto já descrito.

O soro deve ser utilizado dentro de 48 horas após a colheita, inativado a 55-56°C durante 30 minutos. Para preparar a suspensão globular, o sangue desfibrinado é lavado 4 vezes em solução fisiológica. Após lavagem, o volume original é levado ao dobro, adicionando-se formol na proporção de 10%, à temperatura ambiente, para uso após 24 horas. Antes do seu emprego, a sus-

pensão é lavada 4 vezes em solução fisiológica para retirada do excesso de formol.

Prosseguindo os estudos, Rubino (1926b) investigou as proporções relativas entre os reagentes, procurando estabelecer as relações ótimas. Verificou que a concentração de hemácias pode influenciar a reação e que a concentração globular de 3.000.000 a 3.500.000 por milímetro cúbico deve ser utilizada a fim de evitar impedimento da reação por excesso de glóbulos. Para obter essa concentração, recomendava elevar a três vezes o volume original do sangue com solução fisiológica. Estudando as relações quantitativas entre soro e suspensão globular, demonstrou que, mantendo fixa a quantidade de soro (0,5 cm) e fazendo variar a de glóbulos (0,35 cm³, 0,25 cm³ e 0,15 cm³), a reação se tornava mais sensível com maior frequência de positividade. Reciprocamente, mantendo fixa a quantidade da suspensão globular em 0,25 cm³ e fazendo variar a de soro, nas doses respectivas de 0,50 cm³, 0,25 cm³, 0,125 cm³, a reação era muito freqüente nos três tubos e ocorria sempre nos dois primeiros.

Baseado nesses fatos, entreviu a possibilidade de pôr em evidência as variações de comportamento sorológico condicionadas pela evolução da moléstia. Admitia que "utilizando uma ampla escala de proporções e operando em condições muito precisas de temperatura inicial e durante a experiência, pode-se obter para cada soro um valor especial, que seria o índice de aglutino-sedimentação, elemento muito interessante para estudar a possibilidade de oscilações humorais em moléstia como a lepra, de evolução tão prolongada".

Procurou verificar se a reação ocorria também com glóbulos não formolados e se com estes não seria até mais sensível, pois o formol, determinando modificações profundas na hemácia, poderia afetar a intensidade do fenômeno, tal como sucede com a hemólise. Concluiu que, de modo geral, a aglutino-sedimentação dos glóbulos naturais pelo soro leproso é excepcional. Ao contrário, em sôros não leprosos, a aglutinação dos glóbulos naturais é mais precoce e intensa que a dos formolados, podendo ocorrer isoladamente. Essa diferença de comportamento frente aos glóbulos formolados e aos naturais, caracteriza fundamentalmente o soro leproso. Prosseguindo, observou variações de comportamento das hemácias conforme a espécie: hemácias humanas, de cobaio, de coelho fixam mal o formol, enquanto as de cabra, boi, lhama e pomba o fixam bem. Na mesma espécie animal, em ovinos, observou variações individuais.

Experimentou antígenos microbianos obtidos de uma cepa de *Proteus X 19* e de bacilos álcool-ácidos resistentes isolados de lepra e antígeno preparados com órgãos de boi finamente pulverizados, formolados a 10%. Os resultados foram nulos.

Ampliando o número de observações em soros de leprosos, atingiu o total de 121, com 88 reações positivas (72,7%). Examinou mais 300 soros não leprosos, compreendendo casos de sífilis, tuberculose, anemia e outras afecções. Obteve apenas 7 reações positivas: em 2 casos de fratura, 1 de tuberculose, 1 de anemia e 3 não esclarecidos, tendo em todos assinalado aglutinação com hemácias naturais mais precoce e intensa que com as formoladas.

Castro Paullier e Errecart (1926) empregaram a reação de Rubino, na sua técnica original, em 60 soros de pacientes reconhecidamente não leprosos e em 17 de lepra. Nos primeiros, a reação foi negativa em 55 e positiva em 5. Destes 5, que não apresentavam qualquer sintoma de lepra, 1 sofria de amebiose, 1 tinha fratura exposta, 1 tétano, 1 hipertrofia prostática e 1 meningite. Dos 17 doentes de lepra, 15 eram de lepra mista, 1 de "lepra tuberculóide sem bacilos" e 1 de lepra anestésica. A reação de Rubino foi positiva em 11 e negativa, em 6.

Esses Autores afirmaram que o estudo macro e microscópico do fenômeno de aglutino-sedimentação das hemácias mostrou idênticas características em

soros leprosos e não leprosos. Os mesmos Autores, paralelamente a Rubino, utilizaram suspensão de hemácias não formoladas de carneiro como testemunho e verificaram que os soros leprosos, na sua maioria (12), deram resultado negativo e em 5, positivo. Nos 5 soros de doentes não leprosos que produziram sedimentação de hemácias formoladas, também se processou sedimentação das não formoladas. Por esses resultados, concluíram que a suspensão de glóbulos naturais não tinha valor como testemunho, por não diferenciar soros leprosos e não leprosos, que indistintamente a sedimentaram. Afirmaram que a capacidade de sedimentar glóbulos formolados é transitória, podendo resultar de diferentes estados patológicos e cessa quando deixa de atuar o estímulo provocador do aparecimento de aglutininas. Referem que a formação de aglutininas pode ser provocada experimentalmente pela injeção de soros de animais diversos, concluindo que na reação de Rubino não atua qualquer substância específica de lepra, mas sim, aglutininas comumente observadas nos soros humanos. Terminam por afirmar que a reação de Rubino não constitui prova diagnóstica de lepra nem de qualquer outra moléstia.

Castro Paullier e Errecart (1927) trazem novos argumentos contra a especificidade da reação de Rubino, que atribuem a fenômeno banal de aglutinação. Basearam-se na observação de 6 pacientes com afecções neurológicas e de 2 doentes de lepra com reação de Rubino anteriormente negativa, os quais, após injeção de soro de lhama, passaram a apresentar reação positiva. Esta consistia, nesses casos, na aglutino-sedimentação, tanto de glóbulos naturais quanto de glóbulos formolados. Assim, como mais tarde se pôde demonstrar, esses Autores, por erro de interpretação, negaram a especificidade do fenômeno de aglutino-sedimentação.

Marchoux e Caro (1928) estudaram a reação de Rubino, ocupando-se pela primeira vez em pesquisar as suas possíveis relações com as formas clínicas e as fases evolutivas da lepra. Além da especificidade e da sensibilidade, investigaram a natureza e o mecanismo da reação. Usando a técnica original de Rubino em soros de 10 doentes de lepra, compreendendo casos de lepra mista sem surto evolutivo, lepra mista em evolução, lepra mista em atividade e lepra mista incipiente, obtiveram resultado positivo em 5 casos e negativo, em 5. Daí concluíram que o tipo evolutivo não influi sobre o sentido nem sobre a intensidade da reação. Examinando soros de doentes de impaludismo, filariose, tuberculose, câncer, nunca obtiveram sedimentação rápida das hemácias formoladas. O mesmo sucedeu com soros animais, de cavalo, vaca, coelho ou com salina, pelo que afirmaram ser a reação de Rubino negativa em todo soro não leproso. Fazendo submeter a exame clínico e a provas laboratoriais os 5 doentes de lepra cuja reação fora negativa, não se encontrou afecção superajuntada, o que os levou a concluir que a ausência de sedimentação em certos soros leprosos não era devida à doença associada. Com hemácias de carneiro tratadas com formol em proporção inferior a 10% limitando a 24 horas o tempo de formolação — não se obtém sedimentação pelo soro leproso. Todavia, prolongando a ação do formol por tempo inversamente proporcional à quantidade usada, a reação se processava. Suspensões globulares tratadas pelo formol a 10%, durante 24 horas, a 5% durante 48 horas, ou a 2% durante 5 dias, à temperatura ambiente, apresentavam resultados idênticos. Estudando as relações de proporcionalidade entre soro e suspensão globular formolada, verificaram que aumento da quantidade de giro pode fazer aparecer ação precipitante em soros negativos. Trabalhando não mais com mistura em partes iguais, mas com 3 a 5 partes de soro para 1 de suspensão globular, soros leprosos, antes negativos, passavam a sedimentar ao fim de meia hora em estufa de maneira nítida, embora menos perfeita que os anteriormente positivos. De interesse fundamental para o conhecimento do mecanismo da reação de Rubino, são as verificações seguintes.

A sedimentação não é devida à floculação do soro; tratando soro de leprosos, de doentes de lúpus, sífilis e tuberculose pelo aldeído fórmico, as alterações físico-químicas são idênticas.

A reação é devida à presença de uma substância específica. Ao obterem reações positivas em soros anteriormente negativos pelo aumento da proporção de soro, mostraram a presença provável de uma substância ativa em proporção variável. Tal substância fixa-se nos glóbulos formolados. Decantado um tubo de reação positiva, a massa globular sedimentada resuspensa em salina e acrescida de soro normal, nas condições da reação, continua a ser sedimentada. Usando como testemunhos mistura, em partes iguais, de suspensão globular formolada e soro normal e de suspensão formolada e salina, em condições de tempo e temperatura iguais aos da experiência anterior, os glóbulos não sedimentavam. Pelo que ficava evidente que a sedimentação das hemácias formoladas de carneiro é devida a união de duas substâncias: uma, específica, do giro leproso, fixa-se nos glóbulos formolados; outra, não específica, do soro normal do homem e dos animais. Marchoux e Caro verificaram que os glóbulos formolados fixam, na totalidade, a substância específica contida no soro. Ao resíduo obtido por centrifugação do sobrenadante de uma mistura de suspensão globular formolada e soro leproso quando acrescentavam parte iguais de suspensão globular formolada e soro normal, mantendo-se a mistura em estufa a 37°C, a sedimentação não se produzia. Portanto, as hemácias formoladas privam inteiramente o soro leproso da substância ativa.

Demonstraram ainda que o fixador e o complemento são alterados pelo calor. Soro normal aquecido a 56°C uma hora, pristo em contato com hemácias formoladas sensibilizadas, não determina sedimentação ainda que mantida a mistura por uma hora a 37°C. Por outro lado, soro leproso inativado a 56°C uma hora, é parcialmente reativado pelo acréscimo de giro normal não aquecido. Verificaram também que o aquecimento de soro leproso até 58°C por meia hora, não altera a capacidade de sedimentação. Entretanto, glóbulos formolados sensibilizados sujeitos à temperatura de 56°C uma hora, perdem parte da sensibilidade. O aquecimento da suspensão globular formolada sensibilizada a 50°C, 55° e 58°C por meia hora, não impede a sedimentação quando a suspensão é posta em presença de giro normal. Marchoux e Caro observaram que a substância específica se altera pelo envelhecimento do soro, tanto mais rapidamente quanto mais elevada a temperatura e menor o seu teor no soro. Demonstraram que o éter destrói o princípio específico quando age sobre os glóbulos formolados sensibilizados.

Monacelli (1928) confirma a diferença entre a formolgelificação e o fenômeno da sedimentação específica das hemácias formoladas. Examinou 13 soros leproso com resultado positivo em 12, isto é, 92%. Em 45 soros controles, provenientes de indivíduos sãos, de sífilíticos e de doentes de várias afecções, entre estes maleitosos e tuberculosos, obteve resultados sempre negativos. Dos doentes de lepra, 8 apresentavam forma mista, 4 tuberosa e 1 nervosa pura, o único com reação de Rubino negativa. Conclui pelo alto valor da reação, dada a especificidade, sugerindo a possibilidade do seu emprego em triagem nas regiões de endemia leprosa.

Peltier (1928) fez estudo comparativo entre as técnicas de Rubino e de Marchoux e Caro, usando-as no exame sorológico de 18 doentes de lepra e 75 pacientes não suspeitos de lepra. Com a técnica de Rubino, obteve nos soros leproso, 4 reações positivas (22,2%) e nos soros não leproso, nenhuma reação positiva (0%). Com a técnica de Marchoux e Caro, encontrou 6 reações positivas (33,3%) em 18 doentes de lepra e 13 reações positivas (17,3%) nos 75 pacientes não suspeitos de lepra. A pouca sensibilidade da reação se evidenciava pelo fato de ter sido positiva apenas em leproso tuberosos com baciloscopia de muco positiva. Quanto à técnica de Marchoux e Caro, verificou que era mais sensível, porém menos específica que a original de Rubino, tendo sido positiva em 4 sífilíticos, 2 biliazóticos, 1 doente de filariase, 1 de ancilostomose, 1 de escabiose, 1 de tuberculose e 1 de doença febril indeterminada. Não usou o testemunho de suspensão de glóbulos naturais.

Travassos (1928) estudou a reação de Rubino, na técnica original e na modificação de Marchoux e Caro. Procedendo ao exame sorológico de 30

doentes de lepra, obteve com a técnica de Rubino reação positiva em 13 soros (43,33%) e com a de Marchoux e Caro, 17 positivos (56,66%). Considerando as formas clínicas, tuberosa, mista e frusta e dividindo, segundo Muir, as fases evolutivas em inflamatória, em repouso e em resolução, procura interpretar os resultados da reação referindo-se as mesmas. Conclui: "nem as formas clínicas de lepra nem o seu estado evolutivo têm influência sobre a reação. Os resultados positivos são, entretanto, mais freqüentes nas formas tuberosas. Do mesmo modo, as reações positivas mostram-se mais freqüentes no período de franca evolução. A lepra em resolução deu-nos sempre resultados negativos". Tendo examinado soros normais, soros de doentes de sífilis primária, secundária e terciária, de febre do grupo tífico, meningite cérebrospinal epidêmica, câncer, tuberculose e infecções estafilocócicas, não encontrou reação positiva. As reações de Wassermann e de Meinicke não mostraram relação com a de Rubino e, com base nos resultados em doentes de sífilis e de lepra, conclui: "a sífilis associada à lepra não teria influência direta sobre o fenômeno de sedimentação das hemácias formoladas".

Markianos (1929) examinou o soro de 104 indivíduos não leproso e de 6 doentes de lepra mista, empregando a reação de Rubino pela técnica original e pela de Marchoux e Caro. No grupo não leproso, encontrou apenas 1 caso positivo, não podendo esclarecer o achado por não ter sido encontrado o paciente. Em 6 doentes de lepra mista, não obteve resultado francamente positivo com a técnica de Rubino, ao passo que com a de Marchoux e Caro, 3 soros acusaram resultados positivos francos. Concluindo pela especificidade da reação, afirma ser a técnica de Marchoux e Caro preferível pela maior sensibilidade.

Luz (1929) submeteu a exame sorológico 76 casos de Millis e 20 de tuberculose. Todos foram negativos na reação de Rubino. Em 76 soros de doentes de lepra, obteve positividade em 21 de 45 de forma cutânea; em 6 de 18 de forma nervosa; em 8 de 16 de forma mista.

Rubino (1929) apresenta os resultados de novas pesquisas. Para revelar a presença de hétero-aglutininas capazes de sedimentar os glóbulos formolados, falseando o resultado da reação, introduziu uma série de tubos com a mesma distribuição de reagentes, usando, porém, suspensão de hemácias não formoladas, sobre as quais as aglutininas agem de modo mais intenso. Recomenda a inativação do soro a 55-56°C, de 20 a 25 minutos, o uso de suspensão globular e 4.000.000 por mm³ e, em vez de um único volume de soro emprega 3 volumes diferentes. Com tais modificações, tornou a reação mais sensível, permitindo, também, o reconhecimento dos soros hétero-aglutinantes. Levando em conta essas modificações, apresenta novo critério de leitura, considerando positiva a reação em que a sedimentação ocorre na série de tubos de glóbulos formolados ou, além destes, apenas no primeiro tubo da série de glóbulos naturais; negativa, a reação com sedimentação na série de glóbulos naturais antes ou ao mesmo tempo que na série de tubos de glóbulos formolados.

Para haver formolação satisfatória, são necessários a extração recente dos glóbulos e sua lavagem com solução fisiológica antes do acréscimo do formol.

O teor globular tem influência muito acentuada na sensibilidade da reação, pelo que o Autor recomenda a mesma concentração de hemácias nas suspensões globulares naturais e formoladas.

Estudando a influência da temperatura na fixação da substância específica pelas hemácias formoladas, demonstrou, por provas de absorção, que, temperatura de 37°C ela é total, a 9°C parcial e a 56°C nula. Demonstrou ainda que a reação exige a presença de eletrólitos, não se processando sem eles. Por esse conjunto de características, identificou o seu método a um processo de floculação em que a sedimentação é sempre precedida da atividade aglutinadora ou floculadora de aglutininas específicas sobre os glóbulos

formolados. Exclui a possibilidade de confundir auto-aglutinação e aglutino-sedimentação dos glóbulos formolados pelas características objetivas e biológicas; na auto-aglutinação observamos disposição dos glóbulos em pilha e independência das leis de iso e hétero-aglutinação quanto à temperatura e absorção. Chama a atenção para a coexistência da hétero-aglutinação e da aglutinação específica. Quanto aos caracteres físico-químicos do soro leproso, não observou relação entre o índice refractométrico e a positividade da reação, pois o índice refractométrico estava em geral aumentado no soro leproso, sem paralelismo com a positividade ou a negatividade de reação. Verificou não existir dependência entre a taxa de colesterol do sangue e reatividade do soro. Relata os resultados de novas provas em soros de 38 doentes de lepra, tendo obtido reação positiva em 22 (84,2%), negativa em 5 e duvidosa em 1. Em 800 soros de indivíduos não leproso, afetados de diversas doenças, sífilis, anemias graves, moléstia da pele, intoxicações, etc., a reação foi negativa. Até então, em cerca de 2.000 soros não observara reação positiva a não ser em soros leproso.

Amies (1930), tendo praticado a reação de Rubino com ligeira modificação de técnica, em soros de 353 doentes de lepra tuberosa, mista e anestésica, encontrou positividade apenas em 89, e Anicamente nos que apresentavam lesões ativas. Em 287 indivíduos não leproso, acometidos de doenças diversas, a reação foi positiva em cerca de 5%.

Ambrogio (1930) examinou sorollogicamente 11 doentes de lepra, sendo 10 de lepra mista e 1 de lepra nervosa e 2 indivíduos suspeitos, usando como testemunhos 600 soros oriundos de indivíduos são ou afetados de várias moléstias. Empregou as técnicas de Rubino e de Marchoux e Caro e procedeu a outras modificações pessoais, fazendo variar a proporção dos reagentes, usando soros diluídos e não diluídos. Em um mesmo giro ocorriam resultados discrepantes, conforme a técnica utilizada. Em 11 soros leproso, 10 deram sedimentação rápida, 1 menos rápida, porem mais precoce que nos soros testemunhos. Nos 600 soros do grupo testemunho, apenas em 5 observou positividade da reação (0,8%) e dos 2 soros suspeitos 1 foi negativo e o outro positivo. Afirma que os soros leproso têm capacidade de precipitar rapidamente as hemácias formoladas. Chama a atenção, entretanto, para o fato de esta propriedade não ser estável, visto que dois soros positivos deram resposta negativa 20 dias depois, voltando a reagir positivamente algumas se-manas após. Tendo praticado a reação de Rubino com frações albumínicas e globulínicas separadamente, Ambrogio relacionou o fenômeno da aglutino-sedimentação As globulinas do soro.

Figueiredo (1931) estudou a reação em 35 doentes de lepra, empregando a técnica de Rubino modificada e, quando possível, a de Marchoux e Caro. Obteve em doentes de forma tuberosa e mista reação positiva em 26 (74%) e negativa em 9; nos casos de lepra nervosa, em número de 30, obteve reação positiva em 8 (26%) e negativa em 22. Em 108 doentes afetados de doenças diversas: blastomicose, leishmaniose, epiteliomatose, sífilis, tuberculose pulmonar, granulomatose e em mulheres grávidas, a reação de Rubino foi sempre negativa. Concluiu que a reação de Rubino é específica e patognomônica da lepra, sendo mais freqüente nas formas mista e tuberosa.

Rubino (1931a) aplicou sua nova técnica a soros de 36 doentes de lepra, relacionando os resultados à forma clínica da moléstia. No conjunto obteve 27 reações positivas e 9 negativas. Na forma tuberosa, em 18 doentes, 16 tiveram reação positiva e 2 negativa; na forma mista, em 10 doentes, 8 tiveram reação positiva e 2 negativa; em 8 de lepra nervosa, 3 tiveram reação positiva e 5 negativa. Em 304 soros testemunhos, nos quais se incluíam 33 de doentes de moléstias tropicais (leishmaniose, tripanossomiase, filariose) 24 de doentes de sífilis com reações sorológicas positivas, 18 de tuberculose e 236 soros de doentes não discriminados, apenas em 1 a reação foi positiva. Tratava-se de individuo vindo das colônias e que apresentava cubitais volu-

mosos, sensação de formigamento e distúrbios de sensibilidade nos dedos das mãos.

Rubino (1931b) apresenta resultados de suas pesquisas sobre alterações determinadas pelo formol na capacidade de produção e de absorção das imunoglutinininas e imuno-hemolisinas pelas hemácias. Numa série de experiências, demonstrou que a produção de hemolisinas era quantitativamente igual quer se usassem como antígeno glóbulos normais ou formolados, ao passo que na produção de imuno-aglutinininas, as hemácias não formoladas revelaram capacidade imunizante três vezes superior à das formoladas. Quanto à aglutinabilidade dos glóbulos formolados pelo soro imune preparado quer com glóbulos formolados, quer com naturais, encontrou-a sempre inferior, raramente igual e em caso algum superior à dos glóbulos naturais pelos mesmos soros. No referente aos fenômenos imuno-hemolíticos, demonstrou que, se a capacidade de produção de imuno-hemolisinas pelos glóbulos formolados e naturais era praticamente igual, o mesmo não acontecia com a capacidade de absorção, três a quatro vezes mais elevada nos glóbulos naturais. Dêsse modo, a capacidade de produção de aglutinininas e a aglutinabilidade eram as duas propriedades mais modificadas pelo processo de formulação. No mesmo trabalho, Rubino estudou a ocorrência simultânea de aglutinininas específicas e de hetero-aglutinininas no giro leproso, podendo a presença destas determinar a sedimentação das hemácias formoladas a ponto de tornar ilegível a reação.

Baseado nas pesquisas de Marchoux e Caro, pôde confirmar, em novas experiências, a absorção eletiva das aglutinininas específicas pelos glóbulos formolados e a absorção indiferente das hetero-aglutinininas pelos glóbulos formolados e naturais. Com isto se tornava possível o afastamento das hetero-aglutinininas por meio de absorção prévia do soro com glóbulos naturais, removendo esse sério inconveniente, capaz de falsear ou tornar impraticável a leitura da reação. Verificou também que as hetero-aglutinininas de um giro fortemente aglutinante podem não ser totalmente fixadas a 37°C e que a temperatura ótima para sua absorção é a de 0°C.

Apoiado nesses fatos, Rubino explica a natureza da reação, definindo-a do seguinte modo: "a aglutino-sedimentação dos glóbulos formolados na lepra é uma reação da mesma natureza que as aglutinações microbianas e as soro-floculações; é regida pelas mesmas leis, responde às mesmas exigências e necessita da presença de um elemento específico que produz primeiramente aglutinação, seguida de queda mais ou menos rápida dos glóbulos, que leva à clarificação mais ou menos completa das suspensões".

Analisando os resultados até então obtidos pelos diversos Autores, atribui as discrepâncias observadas à insuficiência de técnica. Julgando satisfatória a sensibilidade e absoluta a especificidade da reação, concluiu por dizer: "estas duas propriedades também não se encontram nitidamente na maioria das reações sorológicas, sobretudo se se lhes pede para responder a todas as formas clínicas da doença".

Chama a atenção para o fato de a intensidade da reação não estar ligada ao tempo da moléstia, relacionando-se antes com a forma clínica e o caráter evolutivo da afecção.

Prossequindo suas pesquisas, Rubino (1931c) verificou que as hemácias formoladas têm maior capacidade de absorção da hemolisina no soro normal que no imune, atribuindo-a à existência no soro humano ativo de uma propriedade que mantém a capacidade de absorção, comprovada pelo fato de o acréscimo de giro humano ativo elevar consideravelmente a absorção da hemolisina. Demonstrou também que o poder de absorção do complemento de cobaio pelas hemácias formoladas é muito restrito e que apenas suspensões globulares muito concentradas (no mínimo 20%) podem absorver pequena parte do complemento. Entretanto, pareceu-lhe que a presença da imuno-hemolisina pode elevar esse poder.

Quanto à absorção da hemolisina natural e do complemento do soro humano ativo, mostrou sua dependência às proporções relativas de concentração do soro e de suspensão das hemácias formoladas. Observou que, mantido o mesmo volume de uma suspensão globular, a concentração necessária para produzir absorção total é proporcional à diluição do soro. Ademais, verificou que a absorção do complemento se relaciona com a presença de hemolisina natural. Embora a absorção do complemento não dependa estritamente da presença de hemolisina, é mais completa se obtida simultaneamente com a absorção desta. Nessa mesma ordem de fatos, observou que hemácias formoladas e sensibilizadas têm maior capacidade de absorção do complemento que os glóbulos não sensibilizados.

Adant (1931) apresenta os resultados de confronto realizado com a reação de Rubino executada pela técnica original e pela de Marchoux e Caro. Em 14 doentes de lepra, a reação pela técnica de Rubino foi positiva em 9 casos (64,2%) e pela técnica de Marchoux e Caro, em 13 (92,8%). Em 126 indivíduos não doentes de lepra (tuberculosos, sífilíticos, framboéticos, maleitosos, tricofitóticos, filarióticos, 1 doente de febre tifóide, 1 de tripanossomiose, 1 de febre recorrente e indivíduos normais) a reação foi positiva em 2 soros.

Pela técnica de Rubino e a de Marchoux e Caro, a reação foi positiva em 2 casos de sífilis. Entretanto, ela foi positiva com a de Marchoux e Caro em 6 outros casos, totalizando 8 (6,3%). Desses 8 soros, 3 eram de sífilíticos, 2 de filarióticos e 3 de pessoas aparentemente normais. Nesses casos não atribui a positividade à sífilis ou à filariose, desde que em outros sífilíticos e filarióticos a reação, quer pela técnica de Rubino quer pela de Marchoux e Caro, foi negativa.

Ambrogio (1932) procurou explicar o fenômeno da sedimentação das hemácias formoladas como de ordem físico-química, resultante de uma alteração do equilíbrio das forças eletrostáticas dos glóbulos suspensos e do meio líquido. A ação sinérgica de um princípio existente no soro leproso e dos eletrólitos seria responsável pela mudança de potencial fazendo com que, nos glóbulos suspensos, a força de coesão superasse a de repulsão, com conseqüente perda de estabilidade. Examinou soros de indivíduos suspeitos de lepra e de indivíduos não doentes, nem suspeitos de lepra. Usou a técnica de Rubino modificada, a de Marchoux e Caro e modificações pessoais, com doses graduais de giro e fixas de glóbulos formolados e vice-versa, assim como soros diluídos em doses fixas ou gradativas e doses fixas e gradativas de hemácias formoladas. Com esse proceder, obteve no mesmo soro resultados discrepantes: soros leproso negativos na reação executada com as técnicas de Rubino e de Marchoux e Caro passaram a positivos com as modificações por ele feitas. A intensidade da reação variava com a proporção dos reagentes. Como já haviam observado Marchoux e Caro, pôde constatar, porém em sentido inverso, aumento de sensibilidade da reação, pelo emprêgo de maior proporção da suspensão globular. Como resultados, relata os seguintes: em 17 soros leproso, obteve reação positiva em 14 (82,3%), negativa em 2 (11,7%) e parcial em 1 (5,8%). Nos soros testemunhos, em número de 600, a reação foi negativa em 595 (99,2%) e positiva em 5 (0,8%). Em 5 suspeitos de lepra, um apresentou resultado positivo. Não havia relação entre atividade biológica do soro e forma da moléstia. Observou também oscilação de reatividade em 2 soros que de positivos, se tornaram negativos 15 dias depois, voltando a apresentar positividade algumas semanas após.

Adant (1932) que, em trabalho anterior, observara positividade da reação de Rubino em 2 dentre 126 indivíduos não doentes de lepra, usando a técnica original do Autor e em 8 com a técnica de Marchoux e Caro, voltou a examinar 105 indivíduos não doentes de lepra, sãos ou afetados de doenças tropicais. Quatro soros sedimentaram fortemente as hemácias formoladas de carneiro: entretanto, após absorção por hemácias naturais, isso não mais sucedeu. Soros leproso, que sedimentavam hemácias formoladas, conservavam essa propriedade após absorção prolongada com hemácias naturais.

Lépine, Markianos, Papayoannou (1932) indagando, do ponto de vista pratico, que contribuição poderia a reação de Rubino trazer para o diagnóstico da lepra precoce, examinaram o soro de 18 indivíduos normais ou doentes não leproso. Todos tiveram resultado negativo, segundo a técnica modificada de Rubino. Em 118 casos de lepra, com a mesma técnica, 59 tiveram resultado positivo e 59, negativo ou seja, 50% de sensibilidade.

Referindo os resultados as formas de lepra, encontraram maior freqüência na forma tuberosa, seguida da mista, nervosa e maculosa. Investigando as relações entre resultado da reação de Rubino e fase evolutiva das diversas formas de lepra, verificaram o seguinte: na lepra nervosa, em 24 doentes, apenas 3 (12,5%) apresentaram resultado positivo. Nem tempo de doença nem fase evolutiva pareceram influir nos resultados sorológicos. Na lepra mista, isto é, lepra nervosa associada à tuberosa, dentre 17 doentes, 6 tiveram reação positiva (35,5%). Positividade ocorreu em maior número em doentes em que predominava o elemento tuberoso. Na lepra tuberosa, dentre 70 doentes em diferentes estádios de evolução, 49 acusaram reação positiva (70%). A freqüência de positividade pelos diferentes estádios evolutivos, mostrou maior porcentagem nos mais avançados ou médios. Frizam, entretanto, que mesmo nas fases mais avançadas, quase um terço dos doentes teve reação negativa. Destacam que dentre 7 doentes de lepra maculosa pura, a reação foi positiva apenas em 1 (14,2%). Concluem que a reação de Rubino é específica, o que lhe dá valor apreciável. Não obstante, sua aplicação pratica é restrita, porque os resultados positivos são freqüentes só na lepra tuberosa e assim mesmo em certo número de doentes (mais ou menos 30%) e por não ser precoce, tornando-se positiva em estádios da moléstia em que os sintomas clínicos impõem o diagnóstico.

Spanned (1932) contesta a especificidade da reação de Rubino, baseado no resultado de observações em 13 doentes de lepra das várias formas, anestésica, tuberosa e mista, dos quais apenas 1 acusou reação positiva (5,8%). Além do que, em 76 soros de indivíduos não leproso, são ou afetados de diversas moléstias, a reação foi positiva em 9 (12,3%). Das reações positivas em indivíduos não leproso, 2 ocorreram em doentes de sífilis nervosa, 2 em casos de blenorragia em mulher, 1 em caso de septicemia estafilocócica, 1 em caso de ictericia hemolítica e 2 em tuberculosos. Atribui essa baixa positividade na lepra a possível efeito terapêutico do óleo de chalmougra e de vacinas anti-lepráticas, usadas na Clinica do Professor Serra.

Furtado e Leite (1932) examinaram 18 soros de leproso pela técnica modificada por Rubino em 1931, encontrando 16 reações positivas e 1 negativa. Paralelamente a reação de Wassermann apresentou resultados positivos em 15 soros, tendo sido negativa em 1 dos que deram resultado positivo na reação de Rubino. Entretanto, em sífilíticos com reação de Wassermann fortemente positiva, a de Rubino foi sempre negativa. Concluem pela especificidade da reação de Rubino, recomendando-a como o melhor dos métodos sorológicos conhecidos para o diagnóstico de lepra.

Zevallos (1932), empregando a técnica de Marchoux e Caro, examinou 39 soros de lepra com os seguintes resultados. Na lepra tuberosa, em 6 casos teve 6 resultados positivos; na lepra mista, em 10 casos, 9 positivos; na lepra nervosa, em 13 casos, 7 positivos. Ressalta a negatividade constante em certos casos de formas avançadas ou durante o aparecimento de novas lesões. Atribui o fato de doentes de lepra com reações negativas apresentarem-nas positivas depois de algum tempo, a uma reativação por efeito terapêutico.

Montafies (1932a, 1932b) estudou a reação de Rubino em 105 casos de lepra, obtendo 95 reações positivas (90,47%) e 10 negativas (9,53%). Para testemunhos, usou soros de 54 indivíduos não doentes de lepra, portadores de diversas moléstias da pele, tendo a reação de Rubino sido positiva em 3 (5,55%) e negativa, em 51 (94,45%). Classificando os doentes segundo a nomenclatura recomendada pela Conferência Internacional de Manila em 1931,

põe em evidência os contrastes entre o comportamento sorológico dos doentes da mesma forma clínica e estágio evolutivo. Estudando as relações entre intensidade da reação e tempo de moléstia (acrescentando ao tempo de doença informado pelo paciente 3 a 5 anos, em média, para obter o tempo de doença aproximado), verificou que a reação de Rubino é tanto menos intensa e menos freqüente quanto mais recente a infecção. Entre as diferentes formas clínicas, observou o seguinte: nas formas nervosa pura e incipiente, o número de reações positivas e sua intensidade são menores nas mistas e avançadas.

Pesquisando a relação entre a reação e a existência demonstrável de bacilos, verificou não haver concordância entre positividade ou negatividade da reação e presença de bacilos no muco nasal.

A reação de Rubino era mais freqüentemente positiva nos casos em evolução que nos estacionários, podendo ser positiva em 80% dos casos "clínica e bacteriológicamente curados".

Hombria (1932) realizou pesquisa comparativa entre a reação de Was-sermann em diferentes modalidades técnicas, a reação de Kahn, de Meinicke, de Mueller, de Botelho, de Eitner e a reação de Rubino, não especificando a técnica usada na execução desta.

Em 18 soros leprosos, a reação de Rubino foi positiva em 10, a de Eitner, em 11 e a de Botelho, em 18. Em 23 soros de indivíduos não doentes de lepra, a reação de Rubino foi negativa em todos, a de Eitner, positiva em 5 e a de Botelho, em 17. Nos soros leprosos, a reação de Kahn foi positiva em 11, as de fixação de complemento, em 12, a reação de Mueller (M. B. R. II) em 8 e a de Meinicke (M.T.R.), em 5. Conclui que a reação de Rubino parece de sensibilidade menor que as demais, entretanto sua negatividade constante em soros não leprosos faz considerá-la de grande utilidade no diagnóstico biológico da lepra.

Mc Kenzie (1933) examinou o soro de 41 doentes de lepra pela reação de Rubino. Tão grandes foram as modificações por ele feitas na técnica da reação que não é possível confrontar seus resultados com os dos demais Autores. Fazendo a ressalva de que investigou a reação de Rubino em condições que não correspondiam as estabelecidas pelo autor do método, diz que a reação lhe parecia sem valor para o diagnóstico da lepra.

Fleury da Silveira e Mesquita (1933), estudando a reação de Rubino, fizeram observações sobre as condições do soro, demonstrando que o mesmo, conservado em geladeira, mantinha o poder de aglutino-sedimentação, apresentando reações perfeitas pelo espaço de 15 dias. Fizeram estudo comparativo entre a reação de Rubino e a reação de fixação de complemento de Gomes, apreciando os resultados de confronto em relação às diversas formas clínicas de lepra. Dentre 103 soros examinados, observaram positividade em 70 (67,9%) e negatividade em 33 (32,03%) com a reação de Rubino. Na lepra nervosa pura, em 29 casos, obtiveram 13 reações positivas (44,82%); na lepra cutânea, de 9 casos, 8 foram positivos (88,88%) e em 65 casos de lepra mista, foram positivos 49 (75,38%). Como testemunhos, usaram soro de 38 doentes não leprosos: 9 de leishmaniose tegumentar americana, 3 de pêfigo, 2 de paludismo crônico, 9 de tuberculose pulmonar, 9 de sífilis, 1 de úlcera tropical, 1 de blenorragia, 1 de disenteria bacilar, 1 de diabete, 1 de arteriosclerose e 1 de xeroderma pigmentoso. Examinaram também o soro de 3 indivíduos sãos e de 5 gestantes. O confronto dos resultados obtidos em doentes de lepra revelou positividade de 67,9% com a reação de Rubino e de 83,4% com a de Gomes. Entretanto, a reação de Gomes apresenta muito menor especificidade. Nos 38 casos testemunhos, a reação de Rubino foi negativa em todos, enquanto a de Gomes foi positiva em 60,6%.

Concluem Fleury da Silveira e Mesquita pela especificidade da reação de Rubino, conquanto sua sensibilidade não seja muito elevada, mormente na forma nervosa.

Benetazzo (1933), admitindo a natureza físico-química da reação de Rubino comum à do aumento de velocidade de sedimentação, procurou estudar as relações entre ambas. Em 20 soros de doentes de lepra, procedeu à reação de Rubino pela técnica de Marchoux e Caro e à medida do índice de Sedimentação pela técnica de Linzenmeyer, obtendo em 11 (55%) positividade da reação de Rubino e aumento do índice de Sedimentação. Confrontando-os As reações de Wassermann e de Meinicke, verificou positividade das reações sorológicas de sífilis em 12 soros (60%), enquanto a reação de Rubino foi positiva em 11 e o índice de Sedimentação estava aumentado também nestes.

Explicando o mecanismo da reação de Rubino, atribuiu-o à alteração das condições coloidais do plasma conseqüente a aumento absoluto das globulinas, coloides muito mais instáveis que as albuminas, levando à chamada labilidade plasmática. Corroboraria nessa concepção o fato de na lepra a relação entre albuminas e globulinas no soro alterar-se em favor destas.

Com liquido de bôlhas produzidas com cerato de cantáridas, realizou a reação de Rubino pela técnica de Marchoux e Caro em 10 casos de lepra, obtendo número de reações positivas igual ao encontrado no giro dos mesmos doentes, isto é, 6. Considera este fato um argumento a mais em favor do papel do desequilíbrio protéico no mecanismo da reação de Rubino, uma vez que, como demonstrado por Cerruti e Meineri, o índice protéico do liquido de bôlhas é idêntico ao do soro.

Conclui, afirmando que a reação de Rubino tem valor diagnóstico quando positiva, e o índice de Sedimentação não, por ser observado em outras doenças.

Landeiro (1934), examinando 55 soros de doentes de lepra pela reação de Rubino, técnica de Marchoux e Caro, obteve resultado positivo em 54 (98,18%) e negativo, em 1 (1,82%). Estudando a influência do tratamento químico no comportamento das hemácias, submetendo-as à ação do álcool 950 a 10%, do sublimado a 1 e a 10% do aldeido fórmico a 10% durante 24 horas em geladeira, verificou que os glóbulos assim tratados não tinham a propriedade de fixar a substância específica responsável pela reação de Rubino.

Rubino (1934) faz revisão dos diversos métodos sorológicos empregados no diagnóstico de lepra, analisando-lhes o valor pratico, historia a sua reação e os resultados com ela obtidos pelos vários pesquisadores, reconhece sua maior sensibilidade na lepra tuberosa e mista e nas fases evolutivas avançadas, ressaltando, porém, sua possibilidade diagnóstica em alguns casos incipientes.

Roca de Viñals (1934), usando a técnica de Rubino modificada, examinau 27 soros de leprosus, obtendo resultado positivo em 25 (92%) e negativo, em 2. Para testemunhos, usou soros de 18 doentes de câncer, 2 de sífilis, 7 de diversas afecções que não discrimina e 1 de comunicante de lepra, tendo sido todos negativos.

Bier e Arnold (1935 a, 1935 b) reconhecem que "a reação de Rubino merece especial destaque porque, embora relativamente pouco sensível, tem o valor de uma reação absolutamente específica. As porcentagens de reação Rubino-positivas obtidas na lepra por vários Autores variam, porém ha acôrdo relativamente A ausência de reações inespecíficas".

O material de pesquisa constituiu-se de 367 soros de doentes de lepra; casos avançados e graves de lepra nervosa, cutânea, mista, tuberosa e casos incipientes. Usaram a técnica recomendada por Rubino em 1931, adotando critério pessoal de expressão dos resultados. Para permitir melhor interpretação, esclarecem o sentido em que foram usadas as designações das diversas formas clinicas de lepra: lepra nervosa pura quando havia somente comprometimento dos nervos e alterações tróficas; forma maculo-anestésica, aquela em que só aparecem máculas e alteração da sensibilidade; lepra incipiente, os casos em início, qualquer que fôsse a forma clinica.

Os resultados foram os seguintes. Na lepra nervosa pura, reação positiva +++ em 3 casos (8,8%), reação positiva ++ em 3 casos (8,8%), reação positiva + em 4 (11,7%) num total de 10 casos positivos (29,3%) sobre 34. Na lepra máculo-anestésica: reação positiva +++ em 10 casos (16,6%), reação positiva ++ em 5 (8,3%), reação positiva + em 18 (16,6%) num total de 5 positivos, constituindo 41,7% a positividade nos 60. Na lepra mista, obtiveram: reação positiva +++ em 61 (29,6%), reação positiva ++ em 25 (12,1%) e reação positiva + em 30 (14,5%), observando-se 116 casos de positividade (56,5%) sobre 206. Na lepra tuberosa, tiveram reação positiva +++ em 11 (40,7%), reação positiva ++ em 5 (18,5%) e reação positiva + em 2 (7,4%) num total de 18 casos positivos (66,6%) dentre 27. Na lepra incipiente, a reação positiva +++ em 4 (155%), positiva ++ em 3 (4,1%), positiva + em 3 (4,1%), totalizando 10 casos positivos (13,8%) nesse grupo de 72 doentes. Em 33 soros de tuberculosos a reação de Rubino foi negativa e em 912 soros de doentes de outras afecções, 1 apenas foi positivo (+), dando um porcentual de 0,1 de positividade em soros de indivíduos não leprosos.

Bier e Arnold chamam a atenção para a maior freqüência de positividade da reação de Rubino na forma tuberosa que na forma nervosa, pondo em relêvo também a menor freqüência de positividade nos casos incipientes.

Relacionando os resultados da reação à forma clínica, designada segundo a nomenclatura recomendada pela Conferência de Manila (1931), verificaram que a sensibilidade da reação de Rubino variava apenas com o componente cutâneo, não parecendo influenciada pela intensidade dos fenômenos nervosos. Confrontando seus resultados aos dos Autores que anteriormente se ocuparam do assunto, atribuem as discrepâncias à sensibilidade desigual das várias partidas do antígeno. Investigando o mecanismo da reação, realizaram uma serie de experiências, confirmando integralmente as verificações de Rubino e de Marchoux e Caro sobre as propriedades da aglutinina leprosa. Estudando o papel dos eletrólitos, verificaram a influência de diferentes concentrações de NaCl, demonstrando a inibição da reação pelas concentrações fortes e seu desenvolvimento com as concentrações mínimas, estabelecendo como ótimas as de $n/4$ a $n/8$, isto é, a da solução fisiológica.

Pesquisando relação entre aglutinina leprosa e o anticorpo fixador do complemento na reação de Witebsky, por meio de provas de absorção com hemácias formoladas de carneiro e naturais, demonstraram que o soro leproso absorvido mantinha inalterada a capacidade de fixar o complemento em presença dos lipóides específicos do bacilo da tuberculose usados como antígeno, não havendo qualquer relação entre os dois fatores: o responsável pela reação de Rubino e o que produz a reação de Witebsky.

Ambrogio (1935), fazendo revisão das pesquisas de Rubino sobre o mecanismo da reação, realiza uma série de experiências, concluindo o seguinte: os soros hétero-aglutinantes não leproso se distinguem por fazerem sedimentar rapidamente as hemácias naturais, não parecendo, entretanto, que a sedimentação seja mais intensa nestas que nas formoladas. Com referência ao comportamento dos soros leproso positivos na reação de Rubino frente as suspensões de hemácias naturais e formoladas, confirmou seu maior poder aglutinante face as formoladas.

Confirmou, igualmente, as pesquisas de Rubino e de Marchoux e Caro sobre a coexistência de aglutininas específicas e de héteroaglutininas no soro leproso e a possibilidade de as diferenciar pelas provas de absorção do soro com hemácias naturais e formoladas. Confirmou ainda o observado por Rubino quanto a diversidade de temperaturas ótimas para absorção de aglutininas específicas e de hétero-aglutininas tendo-as, entretanto, encontrado diferentes das determinadas por aquele Autor. Estudando a influência dos eletrólitos, verificou a necessidade da presença do NaCl para o andamento da reação.

Pimentel Imbert (1936) examinou soros de 47 doentes de lepra, de 214 doentes de diversas moléstias e de 17 indivíduos sãos, usando a reação de Rubino pela técnica modificada em 1931. Dos 47 soros leprosos, 19 provinham de doentes de lepra tuberosa, dos quais 16 (84,2%) apresentaram resultado positivo; 10 eram de doentes de lepra mista, com 7 resultados positivos (70,0%); 16 de doentes de lepra nervosa, com 6 resultados positivos (62,5%); 2 de doentes de lepra maculosa, com resultado negativo. Nesses 47 soros leprosos, a porcentagem de positividade foi de 70,21%. Dos 231 soros testemunhos, 214 provinham de doentes: 55 casos de tuberculose, 88 de sífilis, 8 de câncer, 11 de uncinariose, 4 de esquistossomose, 2 de cromomicose, 6 de eczema, 4 de lúpus eritematoso, 7 de dermatomicrososes, 3 de esprú e 26 de outras moléstias. Examinou 17 soros de indivíduos sãos. Todos os soros testemunhos foram negativos.

Besta e Mariani (1936) empregaram a técnica modificada de Rubino no estudo de 46 soros de doentes de lepra e de 400 soros de indivíduos não leprosos. Quanto à forma clínica, os casos de lepra distribuíam-se da seguinte maneira: 14 de lepra tuberosa, com positividade da reação em 4 (29,0%); 12 de lepra nervosa, dos quais 2 com reação positiva (17,0%) e 20 de lepra mista, sendo 18 com reação positiva (90%). Entre os 400 testemunhos, dos quais 38 de indivíduos sãos, 29 de sífilíticos, 10 de tuberculosos (bacteriológicamente confirmados) e 10 de diferentes moléstias crônicas, nenhum apresentou reação positiva.

Analisando os resultados em face do tratamento, concluíram que este não parecia modificar de maneira apreciável a freqüência de positividade da reação. Observaram a possibilidade de mudança do comportamento sorológico, com passagem à negatividade de soros positivos, enquanto alguns soros negativos podiam tornar-se positivos. Não observaram influência de fator racial.

Bier (1936), fazendo apreciação crítica do problema sorológico da lepra, afirma, em face da especificidade absoluta da reação de Rubino e de sua reduzida sensibilidade, que seu interesse é menos prático que teórico. Chamando a atenção para o "fator enigmático" por ela responsável, ressalta a sua independência dos demais fatores imunológicos conhecidos.

Ruge e Maas (1939) examinaram 2016 soros inativados e 136 soros ativos não leprosos. Do total, 1361 provinham de doentes de diferentes moléstias. Somente em 4 casos (0,19%) a reação foi definitivamente positiva. Sobre a sua sensibilidade na lepra, nada puderam afirmar, dado o pequeno número de soros de lepra examinados (8).

Acanfora (1939) examinou o soro de 23 doentes de lepra mista, tendo 22 apresentado resultado positivo e 1 negativo. A reação de Rubino foi negativa em 79 pacientes de controle, assim classificados: 34 casos de malária, 14 de tuberculose pulmonar, 10 de amebíase intestinal, 2 de leishmaniose visceral, 2 de botão do Oriente, 2 de cirrose hepática, 15 de sífilis (12 de paralisia geral progressiva).

Souza Lima (1940), em estudo sobre os aspectos bioquímicos e sorológicos da lepra tuberculóide, obteve resultado positivo em 22 pacientes (19,6%) num grupo de 112 casos. Este foi o primeiro trabalho em que foram realizadas pesquisas em doentes de lepra tuberculóide já definida como forma clínica.

Depois de 1940 raras são as publicações sobre a reação de Rubino. Juarez (1942), em revisão bibliográfica, refere-se a reação de Rubino. Rotberg e Beebelli (1944) fazem breve revisão bibliográfica.

Horta (1944) analisando os resultados de alguns Autores, aponta a falta de sensibilidade da reação, considerando-a, porém, de valia por sua especificidade.

Bechelli e Rotberg (1951), apreciando as características da reação, ressaltam seu grande interesse teórico e prático, dada a sua especificidade.

Schaller e Serie (1958) estudaram a ação terapêutica da penicilina oxi-procaína na lepra, controlando os resultados pelas alterações clínicas e métodos laboratoriais, incluindo nestes a reação de Rubino. Em 11 casos de lepra lepromatosa, verificaram redução sorológica em 5, inalteração em 2 e resultado sempre negativo em 4. Em 1 caso de lepra tuberculóide (não especificam se tórpida ou reacional) a reação de Rubino foi positiva. Na publicação não há informe sobre o intervalo de tempo entre as provas sorológicas nem sobre a técnica seguida.

Azevedo e Ferri (1959) estudando o anticorpo responsável pela reação de Rubino, verificaram pelo método eletroforético a sua associação à fração gama globulina.

A revisão bibliográfica mostra que o fenômeno da aglutino-sedimentação das hemácias formoladas de carneiro e a reação sorológica nele baseada são exclusivos do giro leproso e devidos à presença neste de uma substância ativa específica. Todavia, a presença desta substância específica não é constante no soro leproso conforme o demonstram as pesquisas de diferentes Autores nas quais a frequência de positividade da reação de Rubino variou de 22,2 a 98%. Tais discrepâncias podem ser explicadas não só pelo uso de técnicas diferentes como também pela diversidade de composição dos grupos de doentes examinados no que respeita as formas clínicas e fases evolutivas da moléstia. Dêsse modo, a rigor os resultados não são comparáveis. Não obstante, há concordância quanto à maior frequência de positividade nas formas clínicas designadas como tuberosa e mista, identificáveis à forma lepromatosa da nomenclatura atualmente em vigor. Por outro lado, menor frequência de positividade foi assinalada pela totalidade dos autores nas formas antes designadas máculo-anestésica e nervosa, nas quais se incluíam os casos hodiernamente classificados como tuberculóides, indeterminados e alguns lepromatosos da variedade macular ou difusa. Positividade da reação de Rubino em soros de indivíduos reconhecidamente não leproso não foi verificada pela quase totalidade dos autores e os que, ao contrario, a consideraram inespecífica, parecem ter fundamentado esse julgamento em critério inexato, quando o estudo da reação se achava ainda nos primórdios. Admitida a especificidade, a inconstância de positividade da reação de Rubino no giro leproso foi atribuída unanimemente à falta de sensibilidade por imperfeição técnica. Pouco sensível, considerada sem valor diagnóstico, perdeu seu interesse a julgar pela escassez de publicações pertinentes a partir de 1940. Não obstante, a especificidade bem demonstrada assegura indiscutível interesse à reação de Rubino, cuja significação merece pesquisar-se à luz dos atuais conhecimentos da Leprologia.

MATERIAL E MÉTODOS DE ESTUDO

Procedemos ao exame sorológico de 231 doentes de lepra, matriculados em dispensário ou internados em sanatório do Departamento de Profilaxia da Lepra, do Estado de São Paulo.

Critério de classificação de lepra

A observação de cada doente estende-se do exame inicial, por ocasião do fichamento, à época do exame sorológico, compreendendo os fatos relativos à evolução clínica, os resultados dos exames baciloscópicos, histológicos e imunológicos, de modo a caracterizar a forma clínica e a condição evolutiva (quando incompleta, a observação é assinalada no protocolo com os dizeres "observação fragmentária"). Seguimos, na medida do possível, a classificação oficial recomendada pelo VI Congresso Internacional de Leprologia (Madrid, 1953), mantida pelo VII Congresso Internacional de Leprologia (Tôquio, 1958), estruturada, em grande parte, na Classificação Sul-Americana aprovada no

V Congresso Internacional de Leprologia (Havana, 1948). Dêsse modo, no presente trabalho, quanto à forma clínica de lepra, os doentes estão distribuídos em dois tipos polares, Lepromatoso e Tuberculóide e em dois grupos de casos, Indeterminado e Dimorfo.

No grupo Indeterminado, estão incluídos os pacientes portadores de manchas acrômicas, hipocrômicas, eritematosas ou eritemato-hipocrômicas, acompanhadas ou não de fenômenos nervosos que, entretanto, podem existir isoladamente ("variedade nervosa pura"). A estrutura histológica apresenta infiltração inflamatória crônica inespecífica com ou sem bacilos; êstes, quando presentes, são raros. O exame baciloscópico do muco e da lesão é negativo no primeiro, e quando positivo na última, apresenta poucos bacilos. A intradermo-reação de Mitsuda é positiva ou negativa.

São considerados doentes de Lepra Tuberculoide os que apresentam lesões cutâneas eritematosas, eritemato-hipocrômicas, liquenóides, de nítida delimitação ou marginadas, acompanhadas ou não de lesão nervosa. A baciloscopia do muco nasal e da lesão é negativa. A intradermo-reação de Mitsuda é positiva, excepcionalmente negativa. A estrutura histológica é tuberculóide em lesões ativas. Nos nossos casos em regressão ou involuídos, encontrou-se estrutura inflamatória crônica inespecífica.

Lepra tuberculóide reacional — Classificam-se como doentes de lepra tuberculóide reacional, os que apresentam lesões infiltradas de aparência ativa e suculenta, sem regressão central, e originadas bruscamente em lesões tuberculóides maiores ou em lesões de menor grau ou em lugares não previamente afetados. Em alguns casos podem aparecer nódulos de origem hematogêna mais ou menos numerosos e amplamente disseminados.

As lesões dos troncos nervosos periféricos podem-se acentuar chegando a produzir necrose e até formação de abcesso. Bacteriológicamente, enquanto as lesões cutâneas são positivas (algumas vezes de modo intenso), via de regra o muco nasal permanece negativo. Durante a reação, a resposta à lepromina pode decrescer de intensidade.

Classificam-se como doentes de Lepra Lepromatosa os que apresentam manchas eritematosas, eritema e infiltração difusa, manchas ou placas eritemato-pigmentares, tubérculos ou nódulos, acompanhados ou não de lesão nervosa. O exame baciloscópico de muco e lesão é positivo. A intradermo-reação de Mitsuda é negativa. A estrutura histológica é lepromatosa.

No grupo Dimorfo ("borderline") estão incluídos doentes cujas manifestações cutâneas se caracterizam por máculo-pápulas, placas, tubérculos ou nódulos, de coloração violácea, às vezes de tonalidade pardacenta, infiltradas, difusas, não figuradas, envolvendo, em geral, por surtos. O exame baciloscópico é quase sempre positivo na lesão e pode sê-lo no muco nasal. A intradermo-reação de Mitsuda é negativa em grande número de casos. Neste grupo, a estrutura histológica é de notável diversidade, dada a instabilidade do mesmo, podendo-se encontrar quadro histológico tuberculóide reacional ou lepromatoso.

Condição evolutiva — No presente trabalho a condição evolutiva é expressa pelo conjunto de fatos verificados nos exames clínicos, pelos resultados dos exames baciloscópicos, histológicos e imunológicos, realizados num certo período de tempo arbitrário e variável, segundo a forma de lepra, contado retrospectivamente da data do exame sorológico, objeto do presente estudo. Assim procedendo, evitamos uma apreciação unilateral, parcial ou incompleta do estado mórbido do paciente, como seria a baseada no exame clínico ou histológico e baciloscópico, sujeitos a limitações de ordem objetiva e subjetiva. Sem eliminá-las inteiramente, o critério aqui proposto permite obter impressão menos precária da situação patológica.

No grupo Indeterminado — Moléstia em evolução: aumento do número ou de dimensão das lesões ou aquisição de atividade inflamatória. Moléstia em regressão: lesões com características atenuadas ou desaparecidas, tendo-se no último caso verificado pelo menos um exame baciloscópico positivo em 10 quadrimensais ou presença de bacilo na estrutura histológica, no prazo retrospectivo de 3 anos. Moléstia involuída: branqueamento das lesões, com ou sem seqüelas, 10 exames baciloscópicos quadrimensais negativos, exame histológico sem bacilos em 3 anos contados retrospectivamente do exame sorológico.

No Tipo Tuberculóide — Critério modificado em relação ao aplicado ao Grupo Indeterminado no que diz respeito a. estrutura histológica, sempre considerada a tuberculóide nos casos em evolução.

No tipo Lepromatoso — Moléstia em evolução: aumento de número de lesões ou intensificação das mesmas. Moléstia em regressão: desaparecimento parcial ou total com ou sem seqüelas, das lesões cutâneas; quando total, tendo-se verificado exame baciloscópico positivo pelo menos de 1 a 50 quadrimensais ou exame histológico revelando estrutura lepromatosa ou inespecífica com bacilos, num período retrospectivo de 15 anos. Moléstia involuída: branqueamento, com ou sem seqüelas, 50 exames baciloscópicos trimensais negativos e exame histológico com estrutura não lepromatosa e sem bacilos, em igual período de tempo.

No Grupo Dimorfo — Moléstia em evolução: aumento do número ou da dimensão das lesões ou surtos evolutivos. Moléstia em regressão: lesões de características parcialmente atenuadas ou desaparecidas, tendo-se verificado no último caso, pelo menos um exame baciloscópico positivo em 30 exames trimensais ou exame histológico revelando estrutura tuberculóide reacional, lepromatosa, ou incharacterística com bacilos, em 10 anos retrospectivos do exame sorológico. Moléstia involuída: branqueamento ou seqüelas de lesões, 30 exames baciloscópicos trimensais negativos e exame histológico revelando estrutura inespecífica sem bacilos, observados em 10 anos retrospectivamente.

Composição dos grupos examinados

Grupo Indeterminado — Foram examinados os soros de 36 doentes de lepra do grupo Indeterminado (obs. de n.^{os} 1 a 36). Entre eles havia: 31 brancos, 3 pardos e 2 pretos; 35 brasileiros e 1 português; 12 mulheres e 24 homens. Pela idade, a distribuição foi a seguinte: de 11 a 20 anos — 4 doentes; de 21 a 30 — 17 doentes; de 31 a 40 — 7 doentes; de 41 a 50 — 2 doentes; de 51 a 60 — 4 doentes; de 61 a 70 — 2 doentes. O tempo de moléstia (declarado pelo doente) foi: de 1 ano em 4 casos; de 2-3 anos em 5; de 4-5 anos em 6; de 6 a 10 anos em 8; de 11-15 anos em 8; de 16-20 anos em 3; de 20-30 anos em 1; não pôde informar 1 paciente.

O exame baciloscópico do muco e da lesão cutânea, feito na época da prova sorológica, foi negativo em 36 pacientes. A intradermo-reação de Mitsuda foi positiva em 19, duvidosa em 1 e negativa em 16. Dos que reagiram positivamente: 1 teve reação positiva +++, 2 tiveram reação positiva ++ e 11 reação positiva +.

O exame histológico, na ocasião em que foi feita a reação de Rubino, foi realizado em 35 doentes, deixando de ser feito em 1 paciente. A estrutura histológica encontrada foi sempre de caráter inflamatório crônico inespecífico, com presença de raros bacilos em 5 casos e ausência de bacilos em 30.

Cinco pacientes não receberam tratamento sulfônico; 3 haviam sido tratados com dose total variando entre 1 e 100 g; 14 com dose total de 101 a 500 g; 12 com dose total entre 501 a 1000 g e 2 com dose total de 1001 a 2000g.

A moléstia encontrava-se em evolução em 12 casos, em regressão em 7 e involuída em 17 doentes.

Tipo Tuberculóide — Lepra tuberculóide tórpida — Foram submetidos à reação de Rubino soros de 48 doentes de lepra tuberculóide tórpida (obs. de n.ºs 37 a 84): 29 doentes eram brancos, 12 pardos, 5 pretos e 2 amarelos; 37 eram brasileiros, 4 italianos, 2 japoneses, 2 poloneses, 1 português, 1 lituano e 1 russo.

Os pacientes distribuíam-se pelos seguintes grupos etários: de 11 a 20 anos — 3; de 21 a 30 anos — 13; de 31 a 40 anos — 9; de 41 a 50 anos — 10; de 51 a 60 anos — 6; de 61 a 70 anos — 6 e com mais de 70 anos — 1. Eram do sexo feminino 24 e do masculino 24.

Pelo tempo de moléstia, os pacientes distribuíam-se da seguinte maneira: com menos de 1 ano — 7; de 2 a 3 anos — 6; de 4 a 5 anos — 9; de 6 a 10 anos — 16; de 11 a 15 anos — 9; de 16 a 20 anos — 1.

O exame baciloscópio foi negativo no muco e na lesão dos 48 pacientes.

A intradermo-reação de Mitsuda foi feita em 47 pacientes, tendo apresentado o seguinte resultado: positiva em 46; negativa em 1. Entre os positivos, verificou-se a seguinte intensidade de reação: positiva +++, 14 casos; positiva ++, 19 e positiva + em 13.

O exame histológico revelou estrutura tuberculóide sem bacilos em 11 pacientes; infiltração inflamatória com tendência à formação de estruturas nodulares com raros bacilos em 3; essa mesma estrutura sem bacilos, em 2 e infiltração inflamatória crônica inespecífica sem bacilos, em 32.

Doze doentes não haviam feito tratamento sulfônico. Dos 36 submetidos a tratamento, 3 receberam dose total variando de 1 a 100 g; 22 de 101 a 500 g; 11 de 501 a 1000 g.

A moléstia estava em evolução em 12 pacientes, em regressão em 16 e involuída em 20.

Lepra tuberculóide reacional — Foram examinados sorologicamente 7 doentes de lepra tuberculóide reacional (obs. n.ºs 85 a 91). Três pacientes eram do sexo masculino e 4 do feminino. Seis brancos e 1 preto. Seis brasileiros e 1 italiano. As suas idades: 36 (2), 54, 57, 59 e 65 anos (2). Tempo de doença (declarado pelo paciente): 1, 3, 4, 9, 10, 11 e 17 anos.

O exame baciloscópio do muco e da lesão, na ocasião do exame sorológico, foi negativo em todos. A intradermo-reação de Mitsuda foi positiva em todos, tendo sido de +++ em 1; ++ em 3 e + em 3.

O exame histológico mostrou estrutura tuberculóide reacional sem bacilos em 2 doentes e infiltração inflamatória crônica inespecífica em 5.

Em exames baciloscópicos anteriores, observou-se positividade no muco de 2 doentes e apenas em um único exame. Na lesão cutânea, entretanto, os exames baciloscópicos anteriores foram positivos em 5 pacientes e negativos em 2, um dos quais com observação breve, tendo sido feitos apenas 2 exames baciloscópicos.

Nos 5 pacientes cujo exame histológico, na ocasião do presente estudo, apresentou infiltração inflamatória crônica inespecífica, os exames anteriores revelaram quadro tuberculóide reacional com bacilos em 2 e sem bacilos em 1 e tendência à formação de estruturas nodulares com bacilos, em 1.

Quatro pacientes apresentavam a moléstia em regressão e os outros, 3, involuída. Os primeiros haviam recebido tratamento sulfônico na dose total

respectivamente de 18,0 g, 184,8 g, 270,1 g e 1901,4 g, enquanto nos últimos o tratamento sulfônico fôra de 326,9 g, 656,0 g e 865,5 g.

Tipo Lepromatoso

Foram examinados soros de 133 doentes de lepra lepromatosa (obs. n.^{os} 92-224). Dêsses pacientes, 113 eram brancos; 14 pardos; 5 prêtos e 1 amarelo. Quanto à nacionalidade, o grupo assim se distribuía: 121 brasileiros; 8 italianos; 2 portugueses; 1 argentino; 1 espanhol. Eram do sexo feminino 25 e do masculino, 108.

A distribuição etária foi a seguinte: de 11 a 20 anos — 4 pacientes; de 21 a 30 — 27 pacientes; de 31 a 40 — 43 pacientes; de 41 a 50 — 33 pacientes; de 51 a 60 — 14 pacientes; de 61 a 70 — 8 pacientes e com mais de 70 anos — 4 pacientes.

Segundo o tempo de moléstia (declarado pelo paciente), a distribuição foi a seguinte: com menos de 1 ano — 8; de 2 a 3 anos — 7; de 4 a 5 anos — 10; de 6 a 10 anos — 37; de 11 a 15 anos — 33; de 16 a 20 anos — 16; de 21 a 30 anos — 17; com mais de 30 anos — 5.

Pelas características dermatológicas, o grupo subdividia-se em 19 pacientes em quem a moléstia se exteriorizara por lesões do tipo maculoso ou eritematoso e infiltrativo difuso; 25 em quem à lesão asses tipos se acrescentara componente pigmentar — manchas ou infiltrações eritemato-pigmentares — e 87 pacientes em quem, associada ou não a êsses tipos de lesão, ocorrera a formação de lepromas tuberosos.

Em 2 pacientes, não foi possível definir a variedade.

Do primeiro grupo, 8 pacientes apresentavam a moléstia em evolução, 9 em regressão e 2 involuída; do segundo grupo, em 6 doentes a moléstia estava em evolução, em 19 em regressão e em nenhum, involuída; no terceiro grupo, a moléstia estava em evolução em 20 pacientes, em regressão em 64 e involuída em 3.

O exame baciloscópico, na ocasião do exame sorológico, apresentou os seguintes resultados: positivo no muco e na lesão em 4 pacientes; positivo no muco e negativo na lesão em 1; negativo no muco e positivo na lesão em 25; negativo no muco e na lesão em 103. Entretanto, 21 dos 25 pacientes que acusaram exame baciloscópico negativo no muco e positivo na lesão tiveram-no, em exames anteriormente realizados, positivo em ambos, assim como 82 dos 103, cujo exame baciloscópico, na ocasião da prova sorológica, foi negativo no muco e na lesão.

O exame histológico foi feito em 126 doentes simultâneamente ao exame sorológico. Revelou estrutura lepromatosa com bacilos em 77 e lepromatosa sem bacilos em 7. Em 9 casos foi encontrada infiltração inflamatória crônica inespecífica com bacilos e essa mesma estrutura inabitada em 32. Em 1 caso, não havia alteração inflamatória. Cabe assinalar que dos 41 pacientes cujo exame histológico na ocasião da prova sorológica acusara estrutura inflamatória inespecífica, 35 apresentaram em exames histológicos anteriores estrutura lepromatosa com bacilos e 1 mostrou essa estrutura sem bacilos. Apresentaram sempre estrutura inflamatória inespecífica 5 doentes, apenas 2 apresentaram sempre quadro histológico inespecífico sem bacilos.

A intradermo-reação de Mitsuda foi feita em 125 pacientes, tendo sido negativa; todavia em 2 casos (obs. n.^{os} 94 e 102) a leitura macroscópica revelou pápula eritematosa infiltrada, bem delimitada e com cêrca de 6 mili-

metros de diâmetro no 30.º dia, cujo exame histológico, entretanto, não mostrou estrutura tuberculóide típica. Tratava-se de 2 pacientes com involução completa das lesões e cessação de atividade baciloscópic verificadas em sucessivos exames, em período de observação superior a 15 anos.

Quanto ao tratamento sulfônico, haviam sido medicados com dose total compreendida entre 1 a 100 g, 20 pacientes; de 101 a 500 g, 31; de 501 a 1000 g, 15; de 1001 a 2000 g, 32; de 2001 a 3000 g, 17 e de 3001 a 5.900 g, 12. Não temos informação do tratamento de 3 doentes; não fizeram tratamento 3 pacientes.

Grupo Dimorfo

A reação de Rubino foi feita em 7 doentes do grupo Dimorfo (obs. de n.ºs 225 a 231).

Pelas características clínicas e o resultado dos exames baciloscópicos e imunológicos, a moléstia havia sido considerada como lepra tuberculóide reacional, e mesmo o achado histológico lepromatoso em alguns casos não invalidaria esse diagnóstico, dada a possibilidade de fenômenos transicionais ocorrerem nessa variedade. Todos eram de cor branca, 6 brasileiros e 1 italiano. A distribuição etária era a seguinte: de 11 a 20 anos — 1; de 31 a 40 anos — 3; de 41 a 50 anos — 1; de 51 a 60 anos — 1; de 61 a 70 anos — 1. Quanto ao sexo: feminino 4 e masculino 3. Quanto ao tempo de doença, 1 apresentava a moléstia havia 1 ano; 1, entre 4 e 5 anos; 3, entre 6 e 10 anos; 1, entre 11 e 15 anos e 1, 21 anos.

O exame baciloscópio no muco, na ocasião do exame sorológico, foi negativo em todos; da lesão cutânea, foi positivo em 2 e negativo em 5. Em baciloscopias anteriores, os 7 pacientes apresentaram positivamente na lesão e deles 2 tiveram também exame positivo no muco nasal. A intradermo-reação de Mitsuda foi negativa nos 7 doentes.

O exame histológico, feito na ocasião da prova sorológica, apresentou estrutura tuberculóide reacional com bacilos em 2 casos e em 5 o quadro histológico era o de infiltração inflamatória crônica inespecífica sem bacilos. Entretanto, exames histológicos anteriores revelaram nesses 5 casos achados diferentes e por vezes contraditórios. Em 1 paciente (obs. n.º 228) o exame histológico inicial revelou estrutura tuberculóide reacional com bacilos e foi seguido, em épocas diferentes, de exames histológicos com inflamação crônica inespecífica sem bacilos. Em 1 doente (obs. n.º 227), o quadro histológico inicial era duvidoso entre lepra tuberculóide reacional e lepra lepromatosa, seguido de outros exames acusando inflamação inespecífica, inicialmente com bacilos e depois sem bacilos.

Um paciente (obs. n.º 226) apresentou inicialmente o quadro histológico de lepra lepromatosa com bacilos e, depois, o de lepra tuberculóide reacional sem bacilos, este, porém, intercalado entre exames histológicos apresentando inflamação crônica inespecífica inicialmente com raros bacilos e depois sem bacilos. Em 3 pacientes (obs. n.ºs 225, 228 e 231) o quadro histológico inicial foi de lepra lepromatosa com bacilos, seguido por exames histológicos revelando inflamação inespecífica.

A discrepância de aspecto histológico observado não só entre os diversos doentes, mas também no mesmo doente, na mesma época ou em épocas diferentes, está a evidenciar, do ponto de vista histológico, a heterogeneidade ou instabilidade do grupo Dimorfo, verificada clinicamente pela sua variada tendência evolutiva, podendo regredir, passar à lepra lepromatosa ou manter as características iniciais.

Os 7 doentes haviam sido submetidos a tratamento sulfônico: 1 em dose total de 100,4 g; 1, de 144,0 g; 1 de 729,8 g; 1 de 865,5 g e 3 de cerca de 1.500,0 g.

A moléstia apresentava-se em evolução em 3 dos pacientes e em regressão, em 4.

Testemunhos — Foram examinados soros de 40 indivíduos não doentes de lepra, afetados de moléstias diversas: 12 de tuberculose pulmonar ativa, 10 de sífilis, 6 de leishmaniose tegumentar americana e 12 de blastomicose sul-americana.

TÉCNICAS ADOTADAS

Reação de Rubino

A reação de Rubino foi executada segundo a modificação apresentada pelo seu autor em 1931. Optamos por essa técnica, preferindo-a à de Marchoux e Caro (1928), apesar de menor simplicidade e sensibilidade, por ser considerada mais específica e, principalmente, por permitir apreciação mais ampla da reatividade sorológica. Dado o emprêgo de quantidades fracionadas de sôro, tornam-se mais evidentes as diferenças de reatividade entre os diversos soros, evitando a limitação decorrente do uso de dose única, o que sucede na técnica de Marchoux e Caro. Ademais, a técnica de Rubino oferece a vantagem de permitir surpreender fenômenos de zona que, embora com pouca freqüência, podem ocorrer, mascarando o estado reativo do sôro.

As reações sorológicas foram realizadas nos laboratórios da Secção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz.

Sôro

O sôro era obtido de sangue colhido da maneira habitual para a realização de exames sorológicos. Foram usados sempre soros com tempo de colheita não superior a 4 dias, mantidos em contato com o coágulo até o dia da prova, em temperatura de 0 a 3°C, com exceção dos soros examinados em 1956, recebidos já separados do coágulo. Após separação, o soro era centrifugado a 1500 r.p.m. 15 minutos e inativado em banho-maria a 56°C, 30 minutos.

Preparo das suspensões globulares

Foi usada mescla de sangue de dois carneiros do Biotério do Instituto Adolfo Lutz. Os carneiros doadores de glóbulos usados em 1956 eram outros, já afastados.

O sangue desfibrinado era lavado quatro vezes em solução fisiológica a 1500 r.p.m., 15 minutos. Após a lavagem, era preparada a suspensão dos glóbulos em solução fisiológica numa concentração globular, verificada pela contagem, de aproximadamente 3.500.000 glóbulos por mm³. A fixação dos glóbulos era feita mediante adição gradual de fórmol do comércio (aldeído fórmico a 40%) na proporção de 10% imprimindo-se rotação continua ao frasco recipiente, seguida de repetidas agitações após o termino da formolação. A suspensão assim preparada era conservada em temperatura ambiente e usada entre 24 horas e 4 dias após o preparo. No dia do uso, era lavada 4 vezes em solução fisiológica, a 1500 r.p.m. 15 minutos cada. A reação era realizada em tubos de 7 x 13 mm de diâmetro com a montagem adiante discriminada, observada a distribuição dos reagentes segundo a ordem de enumeração.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Sôro inativado	0,50	0,25	0,10	0,50	0,25	0,10
Sôro fisiológico	0,30	0,55	0,70	0,30	0,55	0,70
Suspensão de glóbulos formolados	—	—	—	0,20	0,20	0,20
Suspensão de glóbulos naturais	0,20	0,20	0,20	—	—	—

Após mistura, os tubos eram agitados para ressuspender os glóbulos e postos em estufa a 37°C, 1 hora.

A leitura da reação era feita em três etapas: aos 15, aos 30 e aos 60 minutos. O observado em cada tubo era expresso do seguinte modo : (—) nenhuma alteração do aspecto inicial da mistura; (+) sedimentação parcial, com formação de pequeno depósito de glóbulos, mostrando-se o líquido sobrenadante bastante turvo; (++) sedimentação parcial com nítido depósito de glóbulos e ligeira opalescência do sobrenadante; (+++) sedimentação intensa e depósito globular com sobrenadante límpido e clarificado.

O resultado final da reação era expresso de acôrdo com o critério seguinte, proposto por Bier e Arnold (1935).

Leitura da Reação de Rubino

Tempo em min.	Glóbulos naturais			Glóbulos formolados			
	1	2	3	4	5	6	
15	—	—	—	+++	+++	+++ ou ++	Fortemente positivo +++
30	—	—	—	+++	++	++ ou + ou —	Positivo ++
60	—	—	—	++ ou +	++ ou + ou —	+ ou —	Fracamente positivo +
—	—	—	—	—	—	—	Negativo

Exame baciloscópio

Na presente pesquisa, o exame baciloscópio foi feito pelo método Gabbet segundo rotina adotada no Departamento de Profilaxia da Lepra do Estado de São Paulo. O muco nasal era colhido por fricção da mucosa nasal, com

mecha de algodão em estilete e o material de lesão, por escarificação com vacinostilo.

Exame histológico

A coloração dos cortes foi feita pela hematoxilina-eosina, usando-se para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, o método de Ziehl-Nielsen modificado por Faraco, segundo a rotina do Instituto Conde de Lara.

Intradermo-reação de Mitsuda

Foi empregada lepromina integral de Mitsuda Hayashi, preparada no Instituto Conde de Lara, em injeção intradérmica de 0,1 cm³. A leitura era feita entre 25 a 30 dias após injeção e os resultados eram expressos segundo o critério recomendado pela II Conferência Pan-Americana de Lepra (Rio de Janeiro, 1946): negativo (—) ausência do elemento visível ou palpável; duvidoso (±), elemento perceptível sem os caracteres de positividade adiante descritos; positivo (+) elemento saliente, infiltrado, de cor variando do róseo ao violáceo, progressivo e persistente, de 3 a 5 mm de diâmetro; positivo (++) as mesmas características, diâmetro maior de 5 mm, e positivo (+++) quando há ulcerações.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Generalidades

Nesta investigação foi estudada a eventual dependência entre a reação de Rubino e os seguintes atributos : a) formas de lepra; b) sexo; c) grupos etários; d) grupos raciais; e) tempo de moléstia; f) variedades clínicas da lepra Lepromatosa; g) condição evolutiva nas variedades clínicas da lepra Lepromatosa; h) eritema nodoso leprótico; i) exame histológico; j) exame baciloscópio; l) tratamento sulfônico; m) situação clínica do paciente (dispensário ou sanatório); n) — reação de Mitsuda.

Análise

No estudo das dependências, tratando-se sempre de atributos qualificativos, foram executados testes de homogeneidade.

Nos casos de tabelas 2 X 2, com freqüências pequenas, foi aplicado o teste exato de Fisher (1946). Nos demais casos, foi realizado o teste de χ^2 de acordo com Fisher.

No estudo de cada associação são apresentados entre parênteses os valores de χ^2 , o número de graus de liberdade (n) e a probabilidade do teste executado (P).

Apresentação

São apresentadas apenas as tabelas que forneceram resultados significantes. Em tôdas as tabelas o primeiro dado corresponde à freqüência absoluta (f); o segundo, à freqüência relativa (p) sobre o total da tabela; o terceiro, à freqüência relativa sobre o total de cada fileira e o quarto, à freqüência relativa sobre o total de cada coluna. As freqüências relativas são

acompanhadas sempre (entre parênteses) do intervalo de confiança ao nível de 95% (I). Esses intervalos de confiança foram calculados pelas tabelas de Hald (1952).

A computação estatística foi realizada na Disciplina "Princípios e Métodos de Investigação Científica (Estatística)", da 1.^a Clínica Médica (Prof. A. B. Ulhôa Cintra) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

RESULTADOS

Os resultados do estudo das associações entre reação de Rubino e os atributos já anunciados no Capítulo II (Material e Métodos) serão expostos em dois grupos: um compreendendo as associações que a análise estatística revelou não significantes e outro, as associações que se mostraram significantes.

I — Associações não significantes

- 1) Reação de Rubino x sexo, na lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo ($P \sim 0,20$).
- 2) Reação de Rubino x sexo, na lepra do tipo Leprobatoso ($P > 0,05$).
- 3) Reação de Rubino x idade na lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo ($x^2 = 4,8720$; $n = 5$; $P \sim 0,50$).
- 4) Reação de Rubino x idade, na lepra do tipo Lepromatoso ($x^2 = 5,0673$; $n = 5$; $P \sim 0,40$).
- 5) Reação de Rubino x grupos raciais, na lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo ($x^2 = 2,4500$; $n = 5$; $P \sim 0,30$).
- 6) Reação de Rubino x grupos raciais, na lepra do tipo Lepromatoso ($x^2 = 4,1796$; $n = 2$; $P \sim 0,10$).
- 7) Reação de Rubino x tempo de moléstia, na lepra do tipo Lepromatoso e no grupo Dimorfo ($x^2 = 3,3180$; $n = 5$; $P \sim 0,70$).
- 8) Reação de Rubino x tempo de moléstia, na lepra do tipo Lepromatoso ($x^2 = 3,2053$; $n = 5$; $P \sim 0,70$).
- 9) Reação de Rubino x condição evolutiva na lepra Lepromatosa v. tuberosa ($x^2 = 0,616$; $n = 2$; $P \sim 0,95$).
- 10) Reação de Rubino x condição evolutiva na lepra Lepromatosa v. eritê-mato-pigmentar ($P > 0,30$).
- 11) Reação de Rubino x condição evolutiva na lepra Lepromatosa v. macular e eritêrnato-infiltrativa difusa ($P = 0,06$). Essa associação, embora não tenha atingido o nível crítico de significância, dêle se aproxima, o que sugere a necessidade de estudo ulterior em maior número de casos.
- 12) Reação de Rubino x Eritema nodoso leprótico ($P > 0,05$).
- 13) Reação de Rubino x exame baciloscópico atual ($x^2 = 1,9684$; $n = 3$; $P \sim 0,60$).

- 14) Reação de Rubino x exame histológico atual ($\chi^2 = 3,4816$; $n = 3$; $P \sim 0,30$).
- 15) Reação de Rubino x tratamento sulfônico, no grupo Dimorfo ($P > 0,50$).

II — Associações significantes

a) Reação de Rubino x forma de lepra (tab. 1).

Encontrou-se associação altamente significante entre reação de Rubino e formas de lepra. A associação é entre reação de Rubino negativa e lepra do grupo Indeterminado e do tipo Tuberculóide e entre reação de Rubino positiva e lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo ($\chi^2 = 81,8202$; $n = 3$; $P < 0,001$).

O fator responsável pela reação de Rubino é, por conseguinte, uma característica imunológica dos estados de menor resistência ao germe, condicionadores da lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo.

TABELA I - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DOS RESULTADOS DA REACÇÃO DE RUBINO NAS FORMAS DE LEPRAS

Forma de lepra	Reação de Rubino						Total
	Positiva			Negativa			
	f	p	I	f	p	I	
Indeterminada	0	—	—	36	1,000	—	
Tuberculóide tórpida	0	—	—	48	1,000	—	
Tuberculóide reacional	0	—	—	7	1,000	—	
Lepromatosa	78	0,587	0,485 — 0,656	55	0,414	0,302 — 0,474	
Dimorfa	3	0,429	0,099 — 0,816	4	0,571	0,184 — 0,901	
Total	81			150			231

b) Reação de Rubino x variedade clínica do tipo Lepromatoso (tab. 2).

Na tabela 2 vêm expostos os dados correspondentes ao estudo dessa associação, pelos quais se verifica associação significante entre reação de Rubino e grau de lepromatização, expresso pelo elemento dermatológico.

A associação encontrada é positiva entre reação de Rubino positiva e presença de lesões do tipo tuberoso e negativa entre reação de Rubino e lesões de tipo macular e eritemato-infiltrativo difuso, sendo igual a frequência frente a lesões de tipo eritemato-pigmentar ($\chi^2 = 17,3837$; $n = 2$; $P < 0,001$).

TABELA II - ASSOCIAÇÃO ENTRE REAÇÃO DE RUBINO E VARIEDADE CLÍNICA DE LEpra LEPROMATOSA

Variedade clínica	Reação de Rubino		Total
	Positiva	Negativa	
Tuberosa	59 0,450 (0,399 — 0,585) 0,678 (0,569 — 0,774) 0,776 (0,665 — 0,864)	28 0,214 (0,152 — 0,294) 0,322 (0,226 — 0,431) 0,509 (0,371 — 0,647)	87
Eritêmato-pigmentar	14 0,107 (0,069 — 0,197) 0,560 (0,349 — 0,756) 0,184 (0,106 — 0,294)	11 0,084 (0,051 — 0,170) 0,440 (0,244 — 0,651) 0,200 (0,104 — 0,331)	25
Macular e Eritêmato-infiltrativa difusa	3 0,023 (0,006 — 0,083) 0,158 (0,034 — 0,396) 0,039 (0,008 — 0,100)	16 0,122 (0,081 — 0,213) 0,842 (0,604 — 0,966) 0,291 (0,169 — 0,415)	19
Total	76	55	131
Não classificados	2	0	
Total	78	55	133

Essa verificação confirma a observação clássica dos autores quanto à maior frequência de positividade da reação de Rubino nas formas de lepra designadas, nas antigas classificações, tuberosa e mista.

c) *Reação de Rubino x tratamento sulfônico, na lepra Lepromatosa* (tab. 3).

Encontrou-se associação entre reação de Rubino positiva e os grupos de doentes tratados com dose total de 1 a 500 g, de 2001 a 5900 g e entre reação de Rubino negativa e o grupo tratado com dose total de 1001 a 2000 g ($\chi^2 = 20,4216$; $n = 5$; $P < 0,01$).

Verifica-se assim maior atividade sorológica nos grupos que receberam as doses mais e menos elevadas. Esse fato, aparentemente contraditório, tem sua explicação no maior acúmulo de doentes tuberosos nos grupos que receberam tratamento em doses mais elevadas.

TABELA III - ASSOCIAÇÃO ENTRE REAÇÃO DE RUBINO E TRATAMENTO SULFÔNICO, NA LEPRÁ LEPROMATOSA

	Reação de Rubino		Total
	Positiva	Negativa	
1 — 100 g	18 0,142 (0,093 — 0,229) 0,900 (0,683 — 0,088) 0,240 (0,145 — 0,345)	2 0,016 (0,002 — 0,069) 0,100 (0,012 — 0,317) 0,037 (0,005 — 0,132)	20
101 — 500 g	17 0,134 (0,087 — 0,221) 0,547 (0,360 — 0,727) 0,227 (0,136 — 0,335)	14 0,110 (0,069 — 0,197) 0,452 (0,273 — 0,640) 0,268 (0,153 — 0,405)	31
501 — 1000 g	7 0,054 (0,027 — 0,129) 0,467 (0,213 — 0,734) 0,092 (0,042 — 0,201)	8 0,062 (0,033 — 0,140) 0,532 (0,266 — 0,787) 0,154 (0,069 — 0,281)	15
1001 — 2000 g	13 0,101 (0,063 — 0,181) 0,405 (0,237 — 0,594) 0,172 (0,096 — 0,282)	19 0,150 (0,099 — 0,237) 0,594 (0,406 — 0,763) 0,364 (0,232 — 0,503)	32
2001 — 3000 g	13 0,101 (0,063 — 0,181) 0,765 (0,501 — 0,932) 0,172 (0,096 — 0,282)	4 0,030 (0,011 — 0,096) 0,234 (0,068 — 0,499) 0,077 (0,021 — 0,182)	17
3001 — 5900 g	7 0,054 (0,027 — 0,129) 0,582 (0,227 — 0,849) 0,092 (0,042 — 0,201)	5 0,038 (0,016 — 0,107) 0,417 (0,151 — 0,723) 0,095 (0,031 — 0,204)	12
	75	52	127
0	2	1	
(Não temos dados)	1	2	
	78	55	133

TABELA IV - ASSOCIAÇÃO ENTRE REAÇÃO DE RUBINO E SITUAÇÃO CLÍNICA

Situação Clínica	Reação de Rubino		Total
	Positiva	Negativa	
Doentes de sanatório	45 0,339 (0,274 — 0,448) 0,739 (0,609 — 0,842) 0,578 (0,456 — 0,681)	16 0,120 (0,081 — 0,213) 0,262 (0,158 — 0,391) 0,291 (0,177 — 0,429)	61
Doentes de dispensário (egressos)	31 0,233 (0,156 — 0,306) 0,509 (0,362 — 0,626) 0,377 (0,280 — 0,503)	30 0,226 (0,161 — 0,312) 0,462 (0,362 — 0,624) 0,545 (0,406 — 0,681)	61
Doentes de dispensário (não egressos)	2 0,015 (0,002 — 0,069) 0,182 (0,023 — 0,518) 0,026 (0,004 — 0,111)	9 0,068 (0,038 — 0,150) 0,818 (0,482 — 0,777) 0,164 (0,078 — 0,288)	11
Total	78	55	133

d) *Reação de Rubino x situação clínica* (tab. 4).

A associação entre reação de Rubino e situação clínica do paciente (doentes tratados em sanatório ou dispensário) mostrou-se significativa ($\chi^2 = 14,7231$; $n = 2$; $P < 0,001$). A associação encontrada é entre reação de Rubino positiva e doentes internados em sanatório e reação de Rubino negativa e pacientes de dispensário não egressos. Entre os pacientes de dispensário egressos, isto é, transferidos de sanatório para dispensário por melhora da sua condição clínica, verificou-se igual freqüência. Êste fato está a indicar de um lado a presença de positividade da reação de Rubino nos casos de maior malignidade (vide tab. 2) e de outro, a ação modificadora do tratamento sulfônico (vide tab. 3).

e) *Reação de Rubino x reação de Mitsuda* (tab. 5).

Os dados correspondentes ao estudo da associação entre reação de Rubino e reação de Mitsuda, no conjunto de casos das várias formas de lepra, vêm expostos na tabela 5.

A associação mostrou-se altamente significativa ($P < 0,001$), sendo encontrada associação entre reação de Rubino positiva e reação de Mitsuda negativa e reação de Rubino negativa e reação de Mitsuda positiva.

TABELA V - ASSOCIAÇÃO ENTRE REAÇÃO DE RUBINO E REAÇÃO DE MITSUDA. NO CONJUNTO DE CASOS DOS VÁRIOS TIPOS E GRUPOS DE LEPROA

Reação de Mitsuda	Reação de Rubino		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	0 0 (0,000 — 0,009) 0 (0,000 — 0,046) 0 (0,000 — 0,046)	72 0,326 (0,365 — 0,515) 1,000 (—) 0,500 (0,414 — 0,572)	72
Negativa	77 0,348 (0,365 — 0,515) 0,517 (0,419 — 0,581) 1,000 (—)	72 0,326 (0,365 — 0,515) 0,483 (0,419 — 0,581) 0,500 (0,414 — 0,572)	149
Total	77	144	221

Fica, assim, expressa a oposição entre os fatores responsáveis por esses dois fenômenos imunológicos, uma vez que a presença do fator responsável pela reação de Mitsuda é índice de elevada resistência orgânica ao bacilo de Hansen, enquanto a do responsável pela reação de Rubino indica resistência menor ou ausente.

Testemunhos — A reação de Rubino foi negativa nos soros dos 40 testemunhos, dos quais 12 doentes de tuberculose pulmonar ativa, 12 de blasto-micose sul-americana, 6 de leishmaniose tegumentar americana, 10 de sífilis.

Alguns aspectos imunológicos da lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo

O fator imunológico responsável pelo fenômeno de Rubino é uma característica dos estados de menor resistência A infecção leprosa. Demonstra-o a sua ausência nos doentes de lepra do tipo Tuberculóide, tórpida e reacional, e do grupo Indeterminado e sua presença nos pacientes de lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo. Não obstante, a inconstância da reação de Rubino verificada em doentes da mesma variedade ou subtipo e da mesma condição evolutiva, traz à consideração a hipótese de sua dependência de um fator individual condicionador. Até que ponto esta é veraz não o permite verificar o material de estudo aqui apresentado, desde que a reação negativa em determinada época não exclui positividade anterior ou futura, como ocorre em certas infecções em que se verificam período pré-sorológico e negatificação sorológica no curso evolutivo. A esse propósito, procurando estudar possíveis variações de reatividade no soro de doentes de lepra Rubino-positivos, já assinalados por alguns Autores, fizemos uma tentativa de comparação entre resultados obtidos com a reação de Rubino em épocas diferentes, examinando em 1956 e 1959, soros do mesmo grupo de pacientes (vide quadro 1).

QUADRO 1 - CONFRONTO ENTRE RESULTADOS DE REAÇÃO DE RUBINO NO MESMO GRUPO DE DOENTES (1955 E 1959)

Observação	Paciente	Reação de Rubino	
		1956	1959
151	L. A.	+++	+++
152	R. T.	—	—
154	A. R. S.	—	—
155	L. B. C.	++	++
158	J. S.	++	+
159	A. S.	+	—
161	J. P.	++	—
162	C. R. II	—	—
164	J. C. F.	+++	+++
165	A. S. M.	+++	++
167	J. G. S.	+++	+++
168	G. F.	+++	+++
169	S. D.	—	—
170	J. I. N.	+++	++
171	J. V.	+++	++
173	E. L.	+++	+++
174	A. C. II	++	—
175	A. F. S.	+++	++
176	D. N.	+++	+++
177	A. S.	++	+
178	D. R.	+++	+
179	I. A. B.	—	—
180	A. N.	++	+

Pelo quadro 1 se verifica que 5 doentes Rubino-negativos em 1956 assim se mantiveram em 1959, enquanto 15 doentes Rubino-positivos em 1956 também o foram em 1959. Entretanto, 3 pacientes que em 1956 apresentaram reação de Rubino positiva, tiveram-na negativa em 1959. No grupo dos 15 pacientes cujo resultado fôra positivo em 1956 e em 1959, em 7 a intensidade da reação se manteve, ao passo que em 8 ocorreu redução de reatividade. Tais fatos indicariam a ocorrência de processo regressivo no comportamento sorológico, devido à diminuição de teor da substância específica responsável pela reação. Elemento de segunda ordem a favor dessa hipótese é a verificação de reações de fraca intensidade em pacientes com moléstia involuída mas em cujos antecedentes se registram abundantes lesões tuberosas, pelo que se poderiam esperar reações fortemente positivas. Não obstante serem muito sugestivos êsses indícios de redução sorológica, nada pode ser afirmado, dada

a imperfeição técnica da reação. Efetivamente, a natureza do antígeno, suspensão grosseira de hemácias de sensibilidade variável conforme o animal de que são retiradas, a impossibilidade de padronizar o antígeno e a precariedade de leitura da reação não lhe conferem a reprodutibilidade necessária para comparação de resultados. Em consequência, a negatividade da reação em doentes de lepra Lepromatosa não pode a rigor ser explicada por falta de um fator predisponente, uma vez que há possibilidade de variações sorológicas sob influência do tratamento sulfônico e talvez da própria evolução da moléstia.

No grupo Dimorfo (7 doentes), a reação de Rubino foi positiva em 3, negativa em 4. Os 3 doentes Rubino-positivos (obs. 225, 229 e 230) apresentavam, na data do exame sorológico, a moléstia em evolução, com surtos eruptivos repetidos, mais espaçados e mais brandos no doente da obs. 225. Nos 4 doentes em que a reação de Rubino foi negativa, observa-se regressão da moléstia com desaparecimento de sintomas cutâneos, negatividade baciloscóptica e inespecificidade histológica. É de interesse assinalar que dos 3 doentes Rubino-positivos, atualmente em fase evolutiva, o exame histológico revelou estrutura tuberculóide reacional em 2 deles e em 1 doente — o de evolução mais branda — acusa infiltração inflamatória inespecífica sem bacilos, tendo anteriormente apresentado estrutura lepromatosa com bacilos +++. Por outro lado, observa-se em relação aos 4 pacientes Rubino-negativos, que 3 (obs. 226, 228 e 231) apresentaram anteriormente estrutura histológica lepro-matosa habitada e na ocasião do exame sorológico tinham a moléstia em regressão, livres havia mais de 2 anos de surtos eruptivos e com negatividade baciloscóptica. Um paciente (obs. 227), em cujo exame histológico inicial foi impossível a diferenciação entre lepra tuberculóide reacional e lepra lepromatosa, mostra há mais de 8 anos regressão completa das lesões, negatividade baciloscóptica e exames histológicos inespecíficos sem bacilos.

É digno de nota o fato de a reação de Rubino ter-se mostrado positiva em pacientes que apresentam estrutura histológica tuberculóide reacional, quando se verifica no quadro demonstrativo geral (tabela 1) a associação da sua positividade à lepra lepromatosa e a sua não ocorrência na lepra tuberculóide.

Este fato esta a indicar a natureza "híbrida" de certos casos de lepra do grupo Dimorfo em que se verifica a coexistência de um componente indicador de elevada resistência (estrutura tuberculóide) e de outro ligado a estado de baixa resistência à infecção (reação de Rubino positiva).

Com as limitações impostas pela reduzida casuística apresentada neste trabalho, é de admitir-se que nos casos mais rebeldes do grupo Dimorfo a atividade da moléstia seja mantida pela ação equilibrada dos componentes antagônicos. A simultaneidade de quadro histológico tuberculóide reacional e positividade da reação de Rubino indicaria êsse equilíbrio, constituindo índice de mau prognóstico, o que se verifica na pratica pela maior malignidade de certos casos Dimorfos comparados a alguns lepromatosos.

RESUMO E CONCLUSÕES

A reação de Rubino é específica da lepra. De positividade inconstante, verificada com maior freqüência nas formas mais graves da moléstia, foi considerada pouco sensível e sem valor diagnóstico, reduzindo-se a partir de 1940 (até quando data a quase totalidade das pesquisas) o interesse pelo seu estudo, a julgar pelo escasso número de publicações referentes.

Não obstante, a especificidade e desigual freqüência de positividade da reação estão a indicar, dentro dos conhecimentos atuais da patologia da lepra, uma possível associação entre o fator imunológico por ela responsável e os diferentes estados de resistência do organismo na infecção leprótica. Dêsse modo, tornou-se necessário estudá-la, não mais como meio diagnóstico, porém

como possível elemento indicador do comportamento do organismo frente ao germe, expresso pelas formas clínicas da atual classificação.

Para tanto, na presente pesquisa a reação de Rubino foi estudada em 231 doentes de lepra, dos quais 36 do grupo Indeterminado, 48 do tipo Tuberculóide (tórpidos), 7 de lepra Tuberculóide reacional, 133 do tipo Lepromatoso e 7 do Grupo Dimorfo ("borderline").

Para testemunhos foram examinados os soros de 40 pacientes: 12 casos de tuberculose pulmonar ativa, 12 de blastomicose sul-americana, 6 de leishmaniose tegumentar americana, 10 de sífilis.

Nos testemunhos a reação de Rubino foi negativa em todos.

Nos 133 pacientes do tipo Lepromatoso, a reação de Rubino foi positiva em 78 e negativa em 55. Nos doentes do grupo Dimorfo, a reação foi positiva em 3 e negativa em 4. Nos 36 doentes do grupo Indeterminado e nos 55 pacientes do tipo tuberculóide, a reação foi negativa. Verificou-se, portanto, associação positiva entre reação de Rubino e as formas Lepromatosa e Dimorfa e negativa entre reação de Rubino e lepra Tuberculóide e Indeterminada.

A análise estatística (teste de χ^2 segundo Fisher e teste exato de Fisher para frequências pequenas) dos dados obtidos nas formas de lepra em que ocorreu positividade da reação de Rubino, isto é, no tipo Lepromatoso e no grupo Dimorfo, revelou associação não significativa entre reação de Rubino e os seguintes atributos: 1) sexo; 2) grupos étnicos; 3) grupos raciais; 4) tempo de moléstia; 5) condição evolutiva (segundo critério precário aqui proposto) das variedades clínicas da lepra Lepromatosa; 6) eritema nodoso leprótico; 7) dados laboratoriais: exame histológico atual e exame baciloscópico atual; 8) tratamento sulfônico no grupo Dimorfo.

Associações significantes foram encontradas entre reação de Rubino e os seguintes atributos: a) forma de lepra, já comentada no início deste capítulo; b) variedade clínica do tipo Lepromatoso; c) tratamento sulfônico na lepra Lepromatosa; d) situação clínica do paciente; e) reação de Mitsuda.

Quanto às variedades clínicas da lepra Lepromatosa, consideradas as lesões dermatológicas, verificou-se associação positiva entre reação de Rubino e presença de lesões tuberosas e associação negativa entre reação de Rubino e lesões de tipo macular e eritemato infiltrativo difuso. Confirma-se assim a observação dos autores referente à maior frequência de positividade da reação nas formas denominadas tuberosa e mista e cutânea das antigas nomenclaturas.

Por outro lado, a associação entre reação de Rubino positiva e reação de Mitsuda negativa e, viceversa, entre reação de Rubino negativa e reação de Mitsuda positiva demonstra o antagonismo imunológico entre ambas, expressões que são de estados de resistência orgânica opostos.

Pôde ser demonstrada a dependência entre reação de Rubino e tratamento sulfônico pela associação positiva encontrada entre reação e os grupos de doentes tratados com dose total de medicamento sulfônico de 1 — 500 g e de 2001 — 5900 g e associação negativa entre reação de Rubino e grupos tratados com dose total de 501 — 2000 g. A aparente contradição representada pela associação positiva entre a reação e os grupos tratados com menores e maiores doses é explicada pela predominância de doentes tuberosos nos últimos.

Verificou-se associação entre reação de Rubino e situação clínica do paciente, encontrando-se associação positiva para doentes internados em sanatório e negativa para doentes de dispensário não egressos, registrando-se igual frequência de positividade entre doentes de dispensário egressos de sanatório. Tal achado indica associação positiva entre reação de Rubino e malignidade do caso clínico sem, contudo, excluir a possibilidade de redução sorológica paralela ao curso favorável da moléstia, por efeito terapêutico ou evolução própria.

Em confronto de resultados da reação de Rubino praticada, com intervalo de 3 anos, no mesmo grupo de doentes fala a favor dessa hipótese. Entretanto, a imperfeição técnica da reação decorrente de antígeno não padronizável e leitura precária não lhe dá a necessária reprodutibilidade para permitir comparação de resultados. Assim sendo, é impossível decidir se os resultados diferentes decorreram de variações de teor da substância específica do soro ou de diversa sensibilidade da reação.

A mesma ordem de fatos torna impossível presentemente esclarecer a hipótese de o fator imunológico responsável pela reação de Rubino depender de predisposição individual. Com efeito, reação negativa em determinada época não pode a rigor, excluir positividade anterior ou futura, questão que só pode ser esclarecida com o seguimento sorológico periódico e prolongado, de doentes Rubino-positivos, o que ainda não foi feito.

Com base nos dados aqui apresentados, chegamos as seguintes conclusões:

I — A substância específica responsável pela reação de Rubino é uma característica imunológica da lepra do tipo Lepromatoso e do grupo Dimorfo, portanto, dos estados de menor resistência do organismo ao bacilo de Hansen. Ela se opõe ao fator responsável pela reação de Mitsuda.

II — A reação de Rubino independe de sexo, idade, raça, tempo de moléstia, condição evolutiva, simultaneidade de eritema nodoso leprótico, presença de bacilos no muco ou nas lesões e estrutura histológica.

III — A reação de Rubino depende do tratamento sulfônico.

IV — A negatividade da reação observada em numerosos casos de lepra Lepromatosa sugere que o estado de menor resistência, embora necessário, não é suficiente para condicionar o aparecimento ou manter a presença do fator responsável pela reação.

V — Com as restrições devidas à imperfeição técnica da reação, que lhe não assegura a reprodutibilidade necessária para comparação de resultados, pode ser admitida a hipótese de o teor da substância específica sofrer variações no curso da moléstia.

VI — No grupo Dimorfo, a presença da substância específica pode coexistir com estrutura histológica tuberculóide reacional.

VII — Com as limitações decorrentes do pequeno número de casos observados, é sugerida a hipótese de estar em jôgo nos casos Dimorfos Rubino-positivos com estrutura histológica tuberculóide reacional um equilíbrio de componentes antagonicos a impedir a definição de moléstia para um dos tipos polares.

VIII — Os fatos expostos mostram que a reação de Rubino pode constituir instrumento de indagação e estudo dos estados de resistência na lepra.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The reaction of Rubino is specific for leprosy. As it's positivity is not constant and it is observed more frequently in the more severe cases of the disease, it was considered little sensitive and without diagnostic value. For this reason, from 1940 on (last date of most of the publications) the interest of it's study was greatly reduced as considered by the small number of publications concerned.

In spite of that, the specificity and the unequal frequency of the positive reaction seem to show, according to present knowledge of the pathology of leprosy, a possible association between the immunological factor which is responsible for the reaction and the different states of resistance of the organism during the leprotic infection. For this reason, it was necessary to study this reaction, no longer as a diagnostic method but as a possible element for indication of the behavior of the organism against the infective agent, which is shown by the clinical forms of the present classification.

With this purpose in mind, the reaction of Rubino was studied in 231 cases of leprosy, of which 36 pertaining to the group of Indetermined cases, 48 of the Tuberculoid type (torpid), 7 of reactional Tuberculoid leprosy, 133 of the Lepromatous type and 7 of the Dimorphous Group (borderline).

As controls we examined the serum of 40 patients of which 12 with active pulmonary tuberculosis, 12 with South American blastomycosis, 6 with American tegumentar leishmaniosis and 10 with syphilis.

All controls showed a negative reaction of Rubino.

Of the 133 patients with the Lepromatous type of disease, 78 showed a positive reaction of Rubino and 55 a negative reaction. The patients of the Dimorphous group showed a positive reaction in 3 cases and negative in 4 cases. The 36 patients of the Indetermined group and the 55 patients of the tuberculoid type showed a negative reaction. The results indicate therefore a positive association between the reaction of Rubino and the Lepromatous and Dimorphous Leprosy and a negative association between the reaction and the Tuberculoid and Indetermined.

The statistical analysis (test of χ^2 according to Fisher and exact test of Fisher for low frequencies) of the data obtained in the forms of leprosy in which there was a positive reaction of Rubino, i. e. in the Lepromatous type and the Dimorphous group, showed a not significant association between the reaction of Rubino and the following factors: 1) sex; 2) age group; 3) racial groups; 4) duration of disease; 5) condition of evolution (according to a pre-. carious criterion herein proposed) of the clinical varieties of the Lepromatous leprosy; 6) nodous leprotic erithema; 7) laboratory data: present hystological examination and present bacilloscopic examination; 8) treatment with sulfones in the Dimorphous group.

Significant association was found between the reaction of Rubino and the following factors: a) form of leprosy, already described at the beginning of this chapter; b) clinical variety of the Lepromatous type; c) treatment with sulfones in Lepromatous leprosy; d) clinical condition of the patient; e) reaction of Mitsuda.

As of the clinical varieties of the Lepromatous leprosy, taking into consideration the dermatological lesions, we found a positive association between the reaction of Rubino and the presence of tuberos lesions and a negative association between the reaction of Rubino and lesions of the macular type and diffuse infiltrative erythema. Thus the observation of the authors relative to the greater frequency of a positive reaction in the so called tuberos forms and mixed and cutaneous forms of the former nomenclature are confirmed.

On the other hand, the association between a positive Rubino reaction and a negative Mitsuda reaction, and vice-versa, between, a negative Rubino reaction and a positive Mitsuda reaction, show the immunological antagonism of both, which are the expressions of opposing states of organic resistance.

The dependency between the Rubino reaction and the treatment by sulfones may be demonstrated by the positive association found between the reaction and groups of patients treated with total dosis of sulfonic remedies varying from I to 500 g. and from 2001 to 5900 g. and the negative association of the reaction of Rubino with groups treated with 501 to 2000 g. of total dose. The seeming contradiction represented by the positive association between the reaction and the groups treated with smaller and larger doses is explained by the predominancy of tuberous patients among the last group.

We found a positive association between the reaction of Rubino and the clinical condition of the patient, with a positive association for patients interned in sanatories and negative for outward patients, which were not interned previously. An equal frequency of positive reaction was found among outward patients which came from sanatorial treatment. This finding shows a association between a positive reaction of Rubino and the malignancy of the clinical case, without excluding the possibility of a serological reduction parallel to the favorable evolution of the disease by means of therapy or spontaneous evolution.

The comparison of the results of the reaction of Rubino made with an interval of 3 years in the same group of patients, is favorable to this hypothesis. However the technical imperfection of the reaction due to a not standardized antigen and a precarious reading, does not give it the necessary reproductiveness to permit comparison of results. Thus it is impossible to decide if different results are due to variations of amount of the specific substance in the serum or due to a different sensitivity of the reaction.

The same order of factors make it impossible presently to clarify the hypothesis of the immunological factor responsible for the reaction of Rubino depends on an individual predisposition. In fact, a negative reaction at some period of time cannot exclude entirely a positive reaction in the past or the future. This questions would only be elucidated with a periodical and prolonged serological examination of patients with positive reaction of Rubino. This has not been made so far.

With the data here presented we come to the following conclusions:

I — The specific substance responsible for the reaction of Rubino is an immunological characteristic of the leprosy of the Lepromatous type and of the Dimorphous groups, this means of the states of less resistance of the organism to the Hansen bacillus. It opposes to the factor responsible for the reaction of Mitsuda.

II — The reaction of Rubino is independent of sex, age, race, duration of disease, conditions of evolution, simultaneous presence of leprotic nodous erithema, presence of bacillus in the mucus or in the lesions and hystological structure.

III — The reaction of Rubino depends on the treatment with sulfones.

IV — The negative reaction found in numerous cases of Lepromatous leprosy suggests that the state of lower resistance, in spite of beeing necessary, is not sufficient to condition the appearance or of maintaining the presence of the factor responsible for the reaction.

V — With the restriction due to the technical imperfection of the reaction, which does not allow the reproductiveness necessary for camparison of results,

the hypothesis may be admitted that the amount of specific substance undergoes variations during the evolution of the disease.

VI — In the Dimorphous group, the presence of the specific substance may exist simultaneously with a tuberculoid reactional histological structure.

VII — With the limitations due to the small number of cases observed, we would like to suggest the hypothesis that in the Dimorphous cases with a positive Rubino reaction and a tuberculoid reactional histological structure, an equilibrium of the antagonistic components may be present, thus avoiding the definitive evolution of the disease to one the polar types.

VIII — The facts described show that the reaction of Rubino may constitute an instrument of research and study of the states of resistance in leprosy.

BIBLIOGRAFIA

- ACANFORA, G. — Sulla reazione di Rubino. *Ann. Igiene*, **49**:152-159, 1930.
- ADANT, M. — La réaction de Rubino dans da lèpre. *C. R. Soc. Biol.*, **107**:909-911, 1931.
- ADANT, M. — Au sujet de la réaction da Rubino. *C. R. Soc. Biol.*, **110**:119-120, 1932.
- AMBROGIO, A. — Ricerche biologiche in alcuni casi di lebbra (nota preventiva). *G. ital. Derm. Sif.*, **71**:1292-1301, 1930.
- AMBROGIO, A. — La reazione di Rubino nella lepra. *Pathologica*, **24**:258-268, 1932.
- AMBROCHO, A. — Alcuni indagini sperimentali sopra il meccanismo e la specificità della reazione di agglutinino-sedimentazione dei globuli formolizzati: agglutinine specifiche ed eteroagglutinazione. *Dermosifilografo*, **10**:699-710, 1935.
- AMIES, C. R. — The Rubino's Reaction in leprosy. *Resumo em Bull. Inst. Pasteur*, **28**:228, 1930.
- AZEVEDO, M. P. & FERRI, R. G. — Estudos sôbre o anticorpo específico responsável pela reação de Rubino. *A ser publicado*.
- BEHELLI, L. M. & ROTBERG, A. — *Compêndio de Leprologia*. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Lepra. 1951. pp. 378-379.
- BENETAIZZO, G. — Rapporti tra reazione di Rubino, velocità di sedimentazione e reazione serologiche nella lebbra. *Dermosifilografo*, **7**:241-256, 1933.
- BESTA, B. & MARIANI, G. — Il valore pratico della reazione di Rubino per la lebbra, studiato in Somalia. *G. ital. Mal. esot. trop. Igiene colon.*, **9**:11-14, 1936.
- BIER, O. — Sorologia da lepra. *Rev. brasil. leprol.*, **4**:211-222, 1936.
- BIER, O. & ARNOLD, K. — Estudos sôbre a sorologia da lepra. I — Sôbre a especificidade e a sensibilidade da reação de Rubino. *Pesquisas sôbre o mecanismo da reação. Folia clin. biol.*, **7**:1-8, 1935.
- BIER, O. & ARNOLD, K. — Ueber die Serologie der Lepra. I — Die Spezifitaet und Sensibilitaet der Rubino Reaktion. *Untersuchungen ueber den Mechanismus der Reaktion. Arch. Schiffs — u. Tropenhyg.*, **39**:221-222, 1936.
- FIGUEIREDO, A. Pinto de — O diagnóstico sorológico da lepra pela reação de Rubino. *Tese. Fac. Med. Rio de Janeiro*, 1931.
- FISHER, R. A. — *Statistical methods for research workers*. London. Oliver & Boyd. 1946.
- FLEURY DA SILVEIRA & MESQUITA, M. P. — Contribuição ao estudo da reação de Rubino. *Rev. paul. Med.*, **3**:21-31. 1933.

- FURTADO, D. & LEITE, S. - A reação de Rubino e o diagnóstico precoce da lepra. Lisboa med., **9**:1019-1027, 1932.
- HALD, A. — Statistical tables and formulæ. New York, John Wiley & Sons, 1952.
- HOMBRIA, M. — Contribución al estudio serológico de la lepra. Act. dermo-sifilogr., **25**:193-200, 1932.
- HORTA, A. C. — Diagnóstico clínico, laboratorial e imunológico da lepra. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Lepra, 1944, pp. 107-109.
- IMBERT, M. F. PIMENTEL — La reacción de Rubino en la lepra. Puerto Rico J. publ. Hlth., **12**:246-256, 1936.
- TUAREZ, F., LYNN — Serologia de la lepra. Rev. Med. Trop Par. Bact. lab., **8**:28, 1942.
- LANDEZIO, F. — La reaction de Rubino-Marchoux chez les lepreux. C. R. Soc. Biol., **116**:174-176, 1934.
- LUZ, A. CERQUEIRA DA — Contribuição ao estudo sorológico da lepra. Brasil-méd., **43**:1526-1529, 1929.
- LEPINE, P.; MARKIANOS, J. & PAPAYOANNOU, A. — Valeur pratique de la reaction de Rubino pour le serodiagnostic de la lepre. Bull. Soc. Path. exot., **25**:543-546, 1932.
- MARCHOUX, E. & CARO, J. — Méthode de diagnostic sérologique de la lepre. Ann. Inst. Pasteur, **42**:542-552, 1928.
- MARKIANOS, J. — Reaction de sedimentation des globules de mouton formoles dans la lepre. Bull. soc. Path. exot., **22**:152-155, 1929.
- Mc KENZIE, A. — Some non-specific serological tests in leprosy. Leprosy Rev., **4**:49-63 et **4**:99-112, 1933.
- MONACELLI, M. — Sulla reazione di Rubino nella lepra. G. ital. Derm. Sif., **69**:1472-1476, 1928.
- MONTARES, P. — La reacción de Rubino en la lepra. Su valor diagnostico. Act. dermo-sifilogr., **24**:241-262, 1932. Trabajos San. Nac. Fontilles, **1**:137-159, 1932/1933.
- PAULLIER, V. CASTRO & ERRECART, L. — Reacción de los globulos formolados y naturales de oveja frente a algunos sueros humanos. Rev. med. lat-amer., **11**:2197-2201, 1926.
- PAULLIER, V. CASTRO & ERRECART, L. — Nuevos casos de reacción de Rubino en sujetos no leproso. Manera de obtenerla experimentalmente en leproso y no leproso. Rev. med. lat-amer., **12**:711-716, 1927.
- PELTIER, M. — De la valeur technique de la methode de Rubino dans la recherche de la sedimentation globulaire chez les lepreux. Bull. Soc. Path. exot., **21**:836-838, 1928.
- ROCA DE VIALS, R. — Contribución al estudio del serodiagnostico de la lepra. La reacción de Rubino. Crón. med. quir., **60**:27-30, 1934.
- ROTBURG, A. & BECHELLI, L. M. - Tratado de Leprologia. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Lepra. 1944, Vol. 2, pp. 262-264.
- RUBINO, M. C. — Nueva reacción serológica de la lepra. Rev. med. Uruguay, **29**:143-155, 1926 (a).
- RUBINO, M. C. — Nuevas reacciones serologicas en la lepra. Rev. Soc. argent. Biol., **2**:407-416, 1926 (b).
- RUBINO, M. C. — Nouvelle reaction sérologique dans la lepra. Rev. med. Uruguay, **32**:85-116, 1929.
- RUBINO, M. C. — Sero-diagnostic de la lepre par la agglutino-sedimentation des globules rouges de mouton formolés. Bull. Acad. Med., **105**:890-893, 1931 (a).
- RUBINO, M. C. — Séro-diagnostic de la lepre par l'agglutino-sedimentation des globules de mouton formoles. Ann. Inst. Pasteur, **47**:147-172, 1931 (b).
- RUBINO, M. C. — Untersuchungen zur Verwendung formolfixierter Hammelblutkörperchen in der Serodiagnostik. Zbl. Bakt. I abt. orig., **120**:378-384, 1931 (c).

- RUBINO, M. C. — Las reacciones serologicas en la lepra. Arch. urug. Med., **5**:414-431, 1934.
- RUGE, & MAAS, E. — Zur Frage der Rubino-Reaktion. In Festschr. Bernhard Nocht, Hamburb, Augustin, 1937. Resumo em Int. J. Leprosy, **7**:304, 1939.
- SCHALLER, K. F. & SERIE, CH. — Oxyprocatn — Penicillin in der Lepratherapie. Z. Haut — u. Geschl. Kr., **25**:340-346, 1958.
- SOUZA LIMA, M. — Algumas observações bioquímicas e sorológicas na lepra tuberculóide. Rev. brasil. Leprol. (número especial), **8**:209-215, 1940.
- SPANEDA, A. — Sulla reazione di Rubino nella lepra. Rev. sud.-amer. Endocr., **15**:508-516, 1932.
- TRAVASSOS, J. — Reação de Rubino. Arch. riogr. Med., **7**:7-11, 1928.
- ZEVALLOS, C. A. — La reacción de Rubino en el diagnostico de la lepra. Arch. Lepra, **4**:22-64, 1932.