

O SÓRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS PELA TECHNICA ACTUALMENTE USADA NO INSTITUTO PASTEUR DE PARIS, COM SÓROS ACTIVOS, EM CONFRONTO COM A REAÇÃO DE WASSERMANN.

PELO

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

(Assistente do Instituto)

## I

LIGEIRAS NOTAS SOBRE A EVOLUÇÃO DO SÓRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS COM SÓRO ACTIVO

Desde as primeiras experiencias de *Nagelschmidt*, publicadas em 1904, até a nossa data, medeia um espaço de tempo rico em trabalhos tendo por fim descobrir uma reacção que seja o mais sensivel indicador capaz de revelar o estigma immunitario da syphilis.

Até hoje o methodo de *Wassermann* tem-se mantido e acreditamos que se manterá por muito tempo como methodo estalão entre as reacções para o sôro diagnostico da syphilis. E', na realidade, um methodo universalmente reconhecido como bom; mas que, devido á multiplicidade de technicas empregadas, ultimamente tem se notado um ligeiro descredito ao seu valôr, graças aos resultados contradictorios fornecidos pelos laboratorios.

As variações são tantas ao seu methodo inicial, que é difficil encontrar dois laboratorios que o executem pelo mesmo processo.

Impõe-se, portanto, uma revisão; ou que o nosso prospero Estado trate de regulamentar o *Wassermann*.

Tratando-se de um methodo complicado, que exige muito bôa tecnica do seu executor, surgiram logo simplificações: umas baseando-se em certas reacções precipitantes dos sôros syphiliticos em relação a alguma substancia lipoide; outras, baseando-se nos mesmos principios de *Wassermann*, apresentam como simplificação a suppressão do complemento de cobaio, de sôro hemolytic anti-carneiro e do antígeno de figado syphilitico, por terem constatado a existencia de complemento em todos os sôros frescos, de amboceptor natural contra os globulos de carneiro no sangue humano e de lipoides em todos os orgãos.

Não cuidaremos aqui da sôro precipitação na syphilis, mas sim das simplificações do methodo original de *Wassermann* com sôro activo.

Foi *J. Bauer* <sup>(1)</sup> o primeiro a se servir da propriedade hemolytica do sôro humano para os globulos de carneiro, mas usava a sensibilisadora natural dos sôros aquecidos. A estes juntava o antígeno, complemento de cobaio e, após a fixação, globulos de carneiro não sensibilizados.

Maior simplificação ao methodo de *Wassermann* foi introduzida por *H. Hecht* <sup>(2)</sup>. Este, além da sensibilisadora já usada por *Bauer*, lançou mão tambem da alexina natural dos sôros não aquecidos.

Da simplificação de *Bauer* á de *Hecht* foi facil o transito, pois se estudava nessa occasião os inconvenientes do uso dos sôros aquecidos devido á thermolabilidade dos anticorpos em geral e particularmente da thermolabilidade das reaginas syphiliticas; dahi o exame de sôros não aquecidos e o aproveitamento da sua alexina.

O methodo de *Hecht*, tomando doses fixas de sôro fresco e de globulos, não levando em conta a variabilidade do poder hemolytic natural dos sôros, deu desde logo grande numero de resultados inexactos admittidos por todos que o usaram.

Comtudo, esse methodo, sobre ser original, veio de molde a provocar grande curiosidade pela sua simplicidade e elegancia, procurando outros experimentadores corrigir-lhe os defeitos, mas seguindo os principios do aproveitamento da sensibilisadora e da alexina encontradas normalmente nos sôros não aquecidos.

Surgem em seguida as modificações á reacção de *Hecht*.

Dos primeiros methodos apparecidos para corrigir os defeitos do de *Hecht*, deve-se apontar o de *Margaret Stern* <sup>(3)</sup>, que, embora usando o complemento natural do sôro fresco, lança mão systematicamente do sôro hemolytic anti-carneiro. Corrigia assim um dos defeitos do methodo de *Hecht*, o qual forçosamente teria que dar reacções positivas falsas com os sôros pobres em hemolysinas naturaes, mas nos sôros ricos em amboceptores o complexo hemolytic ficaria muito forte.

As doses de antígeno e de globulos de carneiro usados por *Marg. Stern*, eram menores do que as empregadas na reacção de *Wassermann*.

Em estudos comparativos feitos entre o seu e os methodos de *Wassermann*, de *Hecht* e de *Bauer*, *Stern* achou o seu methodo mais sensivel. Comtudo, ha neste methodo um ponto a corrigir, como acabamos de assignalar: o seu complexo hemolytic, que é muito forte.

*Levaditi* e *Latapie* <sup>(4)</sup> introduziram a seguinte modificação á reacção de *Hecht*: tomavam apenas tres tubos, pondo em todos elles 0.1 do sôro fresco a examinar, no primeiro tubo 0.1 de antígeno (de figado de heredo syphilitico), no segundo 0.2 de antígeno, completando em todos os tubos a quantidade de 0.4 com o que faltar com agua physiologica a 8 %. Em seguida agitavam e punham na es-

(1) — Deutsche, 1908, n.º 16, p. 698.

(2) — Wiener Klinische Wochenschrift, 1908, p. 1742; 1909, p. 265, 883; 1910, Zeit. f. Immun. p. 572.

(3) — Zeitschrift für Immunistatsforschung, 1909, vol. 1, n.º 3, p. 422.

(4) — La Presse Médicale, 1910, 16 Avril, p. 276; 1911, 4 Novembre, p. 889.

tufa a 37° durante uma hora e meia, juntando depois 0,1 de globulos de carneiro a 5 % em cada tubo. Repostos na estufa, fazem a leitura dos resultados quando a hemolyse é completa no terceiro tubo testemunha. Não se dando a hemolyse no tubo testemunha, as causas seriam devidas á insufficiencia do sôro em complemento, ou á sua pobreza em sôro hemolytic. No caso de pobreza de sôro hemolytic, juntavam 0,1 de amboceptor de coelho anti-carneiro préviamente dosado; não havendo ainda hemolyse no tubo testemunha, ha probalidade de faltar complemento no sôro, e neste caso levavam todos os tubos mais 0,1 de complemento de cobaio diluido ao quinto.

Acham os A. A. que a primeira modificaçao dá indicações precisas em mais de 90 % dos casos.

*M. Weinberg* (1), no seu methodo exposto sob o titulo de "Technica racional da reacção de fixação", basea-se no prolongado estudo que fizéra das propriedades hemolyticas e anti-hemolyticas dos sôros e estuda dois processos: um rapido, de technica simplificada, usando sôros activos; outro lento, com sôros aquecidos.

A nós só nos interessa o primeiro processo, com sôros não aquecidos, e só delle falaremos.

*Weinberg* procedia da seguinte maneira, no processo rapido: usava 16 tubos, dos quaes 10 para determinar o indice hemolytic do sôro a examinar e seis para a reacção propriamente dita. Determinava o indice hemolytic collocando 0,1 de sôro fresco em cada um dos 10 tubos e doses crescentes de globulos de carneiro a 5 % de 0,1 a 1 c. c., completando o volume de 1, 2 c. c. com agua physiologica. Em todos os 6 tubos da reacção era collocado 0,1 do sôro fresco a examinar e nos tubos 1 e 4—0,1, e nos tubos 2 e 5—0,2 de antígeno, que não é collocado nos tubos 3 e 6; completavam o volume em cada tubo com agua physiologica para 0,4. Depois de uma hora na estufa a 37°, juntavam 0,1 de globulos nos tubos 1, 2 e 3, e 0,2 de globulos nos tubos 4, 5 e 6, lendo o resultado após mais meia hora na estufa a 37°. A reacção dos tres primeiros tubos, é, portanto, repetida nos outros tres tubos, com o dobro da quantidade de globulos.

Os tubos para a determinação do indice hemolytic são collocados na estufa ao mesmo tempo que os tubos da realçao, e a leitura, após uma hora.

A parte verdadeiramente interessante do methodo de *Weinberg* é que a sua verificação do indice hemolytic do sôro não serve para determinar a quantidade de globulos a juntar á reacção, processo este ao qual confluem os autores, mas sim para julgar do valor das reacções negativas ou positivas.

*Busila* (2) recorre ao sôro de cobaio para corrigir os sôros frescos com poder hemolytic insufficiente, fazendo a reacção no mesmo dia da extracção do sangue. Usa tambem o sôro hemolytic no segundo tempo da reacção, quando este fôr necessario.

*Chabanier, M. Lebert e L. M. Bétancês* (3) fazem a reacção em dois tempos, utilizando-se dos sôros activos: no primeiro tempo,

(1)—Annales de L'institut Pasteur, 1912, p. 424.

(2)—La Presse Médicale, 1915, 23 Septembre.

(3)—Comptes rendus de la Soc. de Biol., 1917, 2 de Juin.

verificam se no complexo hemolytic existente quantidade suficiente de complemento e de sensibilisadora anti-carneiro; no segundo, realizam a reacção de fixação, se possível, utilizando apenas as propriedades naturaes do sôro, e no caso de carencia de complemento, ou de sensibilisadora, juntam complemento de cobaio, ou sensibilisadora anti-carneiro. É uma technica tambem permittendo fazer a reacção em qualquer sôro não aquecido, juntando, conforme a indicação do primeiro tempo da reacção, que é feita apenas em dois tubos, só sensibilisadora, ou só complemento se um destes faltar, ou nada juntando se existirem em dose suficiente.

*Tribondeau* (<sup>1</sup>), na sua variante ao processo de *Hecht*, acha que a determinacão do indice hemolytic para depois serem juntados os globulos á reacção é mais morosa e complicada, e diz que a pôde substituir por um simples exame dos tubos testemunhas feito 1/4 de hora depois da distribuição dos globulos de carneiro.

A sua reacção é feita em 5 tubos, usando como antígeno os lipoides de *Noguchi* em emulsão a 1 para 60: no tubo 1, tubo testemunha, não vâe antígeno, juntando 0.8 de agua physiologica e 0.1 do sôro a examinar: no segundo tubo, 0.8 da emulsão do antígeno e 0.1 do sôro: no terceiro tubo, 0.4 de antígeno, 0.4 de agua physiologica e 0.1 do sôro: no quarto tubo, 0.2 de antígeno, 0.6 de agua physiologica e 0.1 do sôro, pondo no ultimo tubo 0.1 de antígeno, 0.7 de agua physiologica e sempre a mesma quantidade do sôro fresco a examinar, isto é, 0.1.

Agita e põe na estufa a 37°, durante uma hora.

Addiciona em seguida 0.1 de globulos de carneiro a 5 %. Agita e repõe na estufa. Após 15 minutos examina os tubos testemunhas, marcando com uma cruz aquelles em que a hemolyse não fôr completa. Repõe tudo na estufa donde retira definitivamente no fim de mais 15 minutos.

Na leitura dos resultados, as reacções em que o tubo testemunha não estiver marcado com uma cruz, só serão levados em conta os tubos de diagnostico em que houver hemolyse, sendo considerados como hemolyse total toda a hemolyse parcial. Nas reacções em que o tubo testemunha estiver marcado com uma cruz, só tem valor o resultado negativo.

Com os sôros insuficientemente hemolytic, a reacção pôde ser reforçada com sôro humano negativo dosado.

O processo de *Tribondeau* tambem é passível de erros. A pequena e fixa quantidade de globulos será violentamente hemolysada com os sôros ricos em hemolysinas, não revelando as reacções fracamente positivas.

*Ronchère* (<sup>2</sup>) procura corrigir o inconveniente da presença ás vezes encontradas no sôro humano de dose muito forte de sensibilisadora natural. Dósa a alexina natural juntando apenas a quantidade justa de sensibilisadora hemolytica. Não usa a sensibilisadora hemolytica anti-carneiro, mas sim sistema hemolytic anti-humano.

Diz *Ronchère* que o seu methodo é o primeiro que realiza a uni-

(<sup>1</sup>)—Comptes rendus de la Soc. de Biol., 1917, 16 de Juin.

(<sup>2</sup>)—La presse Médicale, 1917, n.º 70, p. 712.

formidade do valor do complexo—complemento mais hemolysina. Baseia-se no suprimento ou substituição reciproca do complemento e da hemolysina.

Ha tambem uma outra variante de *Ronchese* ao methodo de *Hecht* no caso de não se dispôr de sôro de coelho anti-homem, indispensavel ao seu sistema hemolytic anti-human. Acha que quando o complemento é o proprio do sôro a examinar, a quantidade de sôro pôde variar sem isto importar na intensidade da reacção: "A fracção do complemento fixado é unicamente função da dose de antigeno e do estado physico-chimico do sôro". Isto auctorisa a variar a quantidade de sôro até obter o poder hemolytic desejado.

*Alfred Bauer e Hallion* (1) determinam preliminarmente a força hemolytica dos sôros juntando quantidades variaveis de globulos de carneiro.

*M. Rubinstein* (2) modifica a technica de *Hecht*, usando 6 tubos, todos com 0,1 de sôro fresco, dos quaes: 3 só servem para determinar o titulo hemolytic do sôro com 0,1-0,2 e 0,3 de globulos de carneiro a 5 %; os outros 3, tambem com as mesmas quantidades de globulos dos tubos anteriores, determinam o titulo hemolytic em presença do antigeno, ao mesmo tempo que dão os resultados da sôro-reacção. A idfferença que existir entre o titulo hemolytic determinado nas duas séries de tubos indicará o poder anti-complementar do antigeno.

A reacção é negativa quando ha mais ou menos igual titulo hemolytic entre o da mistura sôro mais antigeno e o titulo hemolytic do sôro; e é positiva quando o titulo hemolytic fôr elevado e o impedimento da hemolyse se der no primeiro tubo da reacção.

Quando a reacção mostrar igualdade de titulos nas duas séries de tubos, ella deve ser considerada como suspeita.

*Telmon* (3) acha que se deve suprimir o excesso nocivel de complemento procurando conservar a dóse util.

Examina o sôro apôs 48 horas na temperatura ambiente para verificar a sua riqueza em complemento, o que faz em um só tubo: agua physiologica 0,4, mais sôro a examinar 0,1. Põe o tubo na estufa a 37°, durante hora e meia. Junta depois 0,1 de globulos de coelho a 6 %, repondo o tubo na estufa. Vâe verificando o numero de minutos que são necessarios para a hemolyse total. Os sôros que hemolysarem em menos de 5 minutos são considerados como ricos em complemento, sendo experimentados doze a vinte e quatro horas depois. Quando a hemolyse se dê de sete minutos para mais, pôde ser feita a reacção.

A reacção é feita em 4 tubos, todos com 0,1 de sôro: os tubos 2, 3 e 4 com 0,1-0,15 e 0,2 de antigeno, completando o volume de 0,5 com agua physiologica. Estufa durante hora e meia; depois, em cada tubo, 0,1 de globulos de coelho a 6 %. A leitura é feita quando o tubo testemunha estiver completamente hemolysado. Centrifuga e lê o grau de hemolyse dos tubos da reacção.

(1)—*Sémaine Médicale*, 1911, n.º 9, p. 106.

(2)—*Comptes rendus Soc. Biol.*, 20-1-917.

(3)—*La Presse Médicale*, 1917, n.º 40, p. 411.

*Telmon* não discute a questão dos sôros incapazes de hemolysar 0,1 de globulos e o seu processo é impraticável para quem faz grande numero de reações de uma vez, pois terá que levar mais de 5 minutos para juntar os globulos em todos os tubos e a leitura ainda será mais demorada.

A falta de bom éxito assinalada na reacção de *Hecht* e suas modificações corre por conta, principalmente, por não levarem uns em consideração o desigual poder hemolyticó dos sôros frescos, outros por não aproveitarem a determinação do indice hemolyticó para variar a addicção de globulos a cada sôro nos tubos de reacção, technica esta que nos parece a melhor.

Este ultimo processo foi adoptado por *Gradwohl* <sup>(1)</sup>, que só usa sôros activos e recentes, aproveitando-lhes o complemento e as hemolysinas naturaes.

Pela technica de *Gradwohl*, são precisos 14 tubos, dos quaes, os 10 primeiros para a determinação do indice hemolyticó e os 4 ultimos para a reacção propriamente dita. Nos 10 primeiros tubos põe-se 0,1 do sôro a examinar em cada um, em seguida globulos de carneiro a 5 % de 0,1 a 1 c. c., juntando-se agua physiologica para igualar a quantidade de liquido que deverá ser de 1, 2 c. c. em todos os tubos. Os tubos são levados ao banho maria, onde permanecem meia hora, lendo-se a maior quantidade de globulos hemolysados, que será o indice hemolyticó do sôro.

Em seguida é feita a reacção adicionando-se a cada um dos 4 tubos restantes 0,1 do sôro a examinar; recebendo os tres primeiros tubos 0,1-0,15 e 0,2 do antigeno dosado; o quarto tubo fica como testemunha do sôro. Em seguida juntam-se os globulos de acordo com o indice hemolyticó determinado, completa-se o volume dos tubos com agua physiologica, agita-se, deixando-se em banho maria a 37°, durante 30 minutos.

*Gradwohl* não accrescenta em cada tubo da reacção e ao tubo testemunha a quantidade justa de globulos determinada pela dosagem. Sendo o indice igual a 4, será adicionado 0,1 de globulos; estando o indice entre 5 e 7, utilisa 0,15; utilizando 0,2 quando estiver entre 8 e 10. O indice sendo superior a 10, a dosagem é repetida e os globulos usados proporcionalmente ao indice obtido.

*J. A. Kolmer* <sup>(2)</sup> faz a diluição de globulos de carneiro a 5 % retirando os globulos do deposito do tubo centrifugador, o que torna a diluição mais concentrada do que commumente se usa. A determinação do indice hemolyticó e a reacção são feitas ao mesmo tempo. Conhecido o indice hemolyticó *Kolmer* junta os globulos aos tubos de reacção e testemunha, como faz *Mutermilch* na technica do Instituto Pasteur de Paris, e que adiante veremos.

Muitas outras technicas de sôro diagnostico da syphilis, com sôro activo, poderíamos citar, mas apenas apontamos as principaes.

Todas ellas procuram corrigir a variabilidade do poder hemolyticó natural dos sôros frescos, que em uns é muito forte, em outros até ausente: e, sem um complexo hemolyticó bem dosado, perde todo o valôr qualquer reacção de desvio de complemento.

<sup>(1)</sup>—American Journal of Syphilis, 1917, f. I. p. 450.

<sup>(2)</sup>—Infection, Immunity and Specific Therapy, 2.<sup>a</sup> ed., 1917.

Tratando-se de methodos rápidos, methodos de simplificação, propende naturalmente a nossa sympathia para aquelles que no limite do possível reunam a simplicidade á precisão.

O uso exclusivo do proprio sôro humano negativo para corrigir o poder hemolyticó fraco ou ausente de alguns sôros—parece-nos ser o melhor, evitando assim de introduzir albuminas estranhas na reacção; e é facil esse processo por ser commum fazer-se de uma só vez muitas reacções, quasi sempre existindo alguns sôros negativos que poderão ser imediatamente empregados nesses raros casos.

A technica actualmente usada no Instituto Pasteur de Paris, por *Mutermilch*, para o sôro diagnostico da syphilis, com sôro activo, é, a nosso ver, uma das melhores technicas que conhecemos, razão pela qual vimos apresentar os resultados da nossa investigação sobre o seu valor, confrontando-a com a reacção de *Warssermann*.

Antes, porém, vamos relatar o papel saliente obtido por esta reacção na conferencia realizada em Copenhague, em 1923, sob o patrocínio da Sociedade das Nações.

## II

### UM TORNEIO DE SÔRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS

Sob a egide da Sociedade das Nações, realizou-se no Instituto Sôroterapico de Copenhague, de 19 de Novembro a 3 de Dezembro de 1923, uma conferencia com o fim de estudar os diferentes methodos de sôro diagnostico da syphilis.

Nessa assembléa de technicos estavam representados os mais notaveis Institutos do mundo pelos seus maiores luminares.

Eis a lista dos que compareceram e tomaram parte nas pesquisas:

*Dr. Harrison, Dr. Wyler*—Medical Research Council de Londres.

*Prof. Hirschfeld, Mme. Milinska*—Instituto de Hygiene de Varsòvia.

*Prof. Madsen, M. Moerch*—Instituto Sôroterapico de Copenhague.

*Dr. Meinicke, Mme. Meinicke*—Instituto das Molestias do Pulmão, Westphalia.

*Prof. Mueller, Mme. Berckzeller, Dr. Brandt*—Laboratorio de sôro Diagnóstico de Allgemeines Krankenhaus de Vienna.

*Dr. Mutermilch*—Instituto Pasteur de Paris.

*Prof. Otto, Dr. Mumter*—Instituto R. Koch de Berlim.

*Dr. Renaux, Mlle. Jobart*—Instituto Pasteur de Bruxellas.

*Prof. Sachs, Dr. Klopstock*—Instituto para o estudo do cancer de Heidelberg.

Em numeros mais ou menos iguaes de sôros foram feitas reacções de fixação de complemento com sôros inactivados e sôros frescos, e reacções de floaculação: *Sachs-Georgi*, sigma reacção, D. M. (terceira modificação de *Meinicke*) e o seu novo methodo M. T. R. (*Meinicke Trübungs-Reaktion*).

As reacções com sôros frescos foram feitas unicamente por *Mutermilch*.

Nas reacções de fixação de complemento só *Mutermilch* e *Renaux* usaram extracto alcoolico de coração de vitello exgotado pela acetona (antígeno de *Bordet* e *Ruelens*).

Todos os outros experimentadores empregaram antígenos cholesterolinados e extractos de fígado heredo-sifilitico.

As reacções de flocação foram executadas pela technica dos seus autores e com extractos por elles fornecidos.

*Mutermilch*, fazendo, na Presse Médicale (1), um apanhado dos resultados a que chegaram os diversos experimentadores e relatando as conclusões da conferencia, aborda questões que assim resumimos:

- 1) — Dos 5 methodos empregados, qual foi o mais sensivel?
- 2) — Dos methodos usando o desvio do complemento, qual o mais sensivel, o de sôro aquecido, inactivado, ou o de sôro não aquecido, sôro activo?

3) — Quaes os extractos que deram melhores resultados? Houve vantagem no emprego de varios extractos?

1 — Tirada a porcentagem das reacções positivas pelo metodo do desvio do complemento e pelos methodos de flocação, o resultado foi o seguinte: nas reacções por desvio do complemento deram resultado positivo 56 a 63 %; nas de flocação: reacção de *Sachs-Georgi*, 48 a 56 %; sigma-reacção, 40 a 50 %, terceira modificação de *Meinicke*, 30 a 51 %; com a M. T. R. as reacções positivas foram de 45 a 54 %.

Deante desses numeros a conclusão tirada pela conferencia foi que as reacções que usaram a fixação do complemento mostraram-se mais sensiveis do que as reacções de flocação.

2 — *Mutermilch* reuniu no quadro abaixo o numero de reacções positivas de 4 experimentadores que examinaram mais ou menos igual quantidade de sôros.

QUADRO N° 1

	Total	Numero das reacções positivas	Porcentagem das reacções positivas.
Hirszfeld	178	101	56,7%
Madsen	179	80	44,7%
Mutermilch	178	112	62,9%
Renaux	179	101	56,5%

Vê-se claramente nesse quadro que a maior porcentagem de reacções positivas foi obtida por *Mutermilch*, com sôros activos (62,

(1) — La Presse Médicale, n.º 65, 13 Aout, 1924.

9 %), notando-se que todos esses casos eram de syphilis clinicamente diagnosticada. A conferencia registrou esse facto, deixando affirmado que o methodo do Instituto Pasteur de Paris (*Mutermilch, sôros frescos*), deu, nos casos de syphilis verificada, um numero de resultados positivos mais elevado do que os methodos utilizados pelos outros pesquisadores.

Com a technica usada por *Mutermilch* houve tres casos de reacções fortemente positivas e dois casos de reacções fracamente positivas, que por todos os outros methodos foram negativas.

Tendo já a conferencia assinalado oficialmente que a technica do Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos, foi mais sensivel, por essa razão poder-se-ia tambem admittir ser ella a unica capaz de revelar esses cinco casos, talvez de syphilis ignorada. Comtudo, no protocollo official da conferencia, foi accrescentado: "O processo utilisando o sôro activo (technica praticada no Instituto Pasteur de Paris) é suspeito de dar resultados não específicos em numero mais elevado do que as outras technicas. Deve-se, por consequencia, submette-la a uma experiencia ulterior, principalmente com sôros tomados depois de um tempo bastante prolongado antes da experienca".

Diz *Mutermilch*, no artigo que estamos resumindo, que muitos membros da conferencia acharam ter sido elle beneficiado por ter obtido todos os sôros recentemente colhidos, ao que responde com as seguintes palavras: "é exacto, que os sôros muito velhos, não inactivados, têm uma ligeira tendencia a se tornarem positivos, devido a uma labilidade das globulinhas que se produz no fim de certo tempo, mas esta tendencia não começa a se manifestar senão no fim de 15 a 20 dias, o que praticamente é sem interesse".

3)—Como acima ficou declarado, só *Mutermilch* e *Renaux* usaram o antígeno de *Bordet*, ao passo que os outros experimentadores lançaram mão de mais de um antígeno e antígenos cholesterinados. No entanto, como vemos no quadro 2 (\*), resumo das reacções de desvio do complemento, os resultados desses dois pesquisadores foram iguaes ou superiores aos dos outros.

---

(\*) Como o quadro anterior, este foi retirado do trabalho de *Mutermilch*, já citado.

QUADRO N° 2

	Total	+	-	+	% +	% -	% +
Harrison	144	86	51	7	59,7	55,4	4,9
Hirszfeld	178	101	72	5	56,7	40,4	2,8
Madsen	179	80	87	12	44,7	49,1	6,2
Mutermilch	178	112	61	5	62,9	34,5	2,8
Muller	165	97	60	8	58,9	36,5	4,8
Otto	148	76	62	10	51,3	41,9	6,8
Renaux	179	101	70	8	56,5	39,1	4,6
Sachs	75	55	36	4	46,6	48,0	5,4
Meinicke							

+ : reacção positiva; - : reacção duvidosa — : reacção negativa.

A conferencia assinalou esses factos declarando que os extractos de coração forneceram melhores resultados e que os resultados obtidos pelos methodos baseados em muitos extractos não se mostraram superiores aos que usaram um só.

### III

#### A TECHNICA DE SÓRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS, COM SÓROS ACTIVOS, EMPREGADA NO INSTITUTO PASTEUR DE PARIS, POR MUTERMILCH.

A reacção é feita em 6 pequenos tubos: 3 para a reacção de fixação e os outros 3, collocados a traz, para a determinação do indice hemolytic.

Os tubos da reacção recebem: o primeiro, 0,1 de antígeno, 0,2 de agua physiologica e 0,1 do sôro a examinar; o segundo, 0,2 de antígeno, 0,1 de agua physiologica e 0,1 do sôro; o terceiro tubo, recebe 0,1 do sôro e 0,3 de agua physiologica, servindo de testemunha.

Nos 3 tubos para a determinação do indice hemolytic vão 0,3-0,6 e 0,9 de globulos de carneiro a 5 % e 0,1 do sôro em cada um.

Depois de bem agitados todos os tubos, vão para a estufa a 37°, onde permanecem uma hora e meia.

Faz-se em seguida a leitura do indice hemolytic do sôro para serem juntados aos tubos da reacção quantidades variaveis de globulos de accôrdo com esse indice, que é igual á maior quantidade de globulos capaz de hemolysar. Assim, se 0,1 do sôro hemolysar no maximo 0,6 de globulos, o indice hemolytic será igual a 6. Mas

*Mutermilch* não manda juntar aos tubos da reacção senão a terça parte do indice determinado. Se 0,1 do sôro hemolysar 0,3 de globulos, será juntado nos 3 tubos apenas 0,1 de globulos. Se 0,1 do sôro hemolysar 0,6 de globulos, será juntado 0,2 de globulos, juntando-se 0,3 de globulos quando o indice hemolytic fôr igual a 9.

E' cautelosa a determinação de *Mutermilch* de só juntar a terça parte de globulos do indice determinado, devido ao rapido enfraquecimento do poder alexico do sôro durante a sua permanencia na estufa. Já vimos tambem ser esse mais ou menos o criterio seguido por *Gradwol*.

#### QUADRO N° 3

Determinação do indice hemolytic do sôro.

Tubos	Sôro a determinar o indice.	carneiro a 5% Globulos de
1	0,1	0,3
2	0,1	0,6
3	0,1	0,9

#### QUADRO N° 4

Reacção.

Anti-geno	Sôro não aquecido	Agua physiologica	Uma hora e meia na estufa a 37°	Conforme o indice hemolytic fôr igual a 0,3 0,6 ou 0,9 de globulos, juntar a cada tubo :	Meia hora na estufa a 37°
1 0,1	0,1	0,2		0,1-0,2 ou 0,3	
2 0,2	0,1	0,1		0,1-0,2 ou 0,3	
3 —	0,1	0,5		0,1-0,2 ou 0,3	

Ha casos de indice hemolytic igual a zero, isto é, 0,1 de sôro não ser capaz de hemolysar nem 0,1 de globulos, o que se poderá verificar fazendo a determinação do indice como vimos atraç quando tratamos da technica de *Weinberg*.

Em um estudo que *Weinberg* (1) fez em 400 sôros, encontrou 9 com indice hemolytic igual a zero; em 23 % não passou de 3; 50 % dos casos o indice foi de 4 a 7; em 10 %, de 10 a 11, sendo que muito raramente o indice foi encontrado mais elevado.

*Laredde e Rubinstein* tambem determinaram o indice hemolytic em 1223 sôros, tendo encontrado 4,7 % de indice igual a zero,

(1) — Loc. cit.

14, 3 % de indice igual a tres, 9, 9 % de indice igual a seis, 3, 7 % de indice igual a nove e 2, 6 % de indice igual a dez.

Tambem *Verbizier* e *Marchand*, em trezentos casos, obtiveram os seguintes resultados: 12, 33 % de indice igual a zero, 13, 6 % de indice igual a tres, 9 % de indice igual a seis e 7, 6 % de indice igual a oito. Estes A. A. liam a hemolyse aps meia hora apenas na estufa, razão pela qual obtiveram maior porcentagem de indice hemolytic equal a zero.

Pela technica do Instituto Pasteur de Paris, descripta por *Levadite* e *Latapie* em 1910, nos casos de insufficiencia hemolytica natural dos sôros usavam alexina de cobaio, ou sensibilisadora de coelho, ou ambas, confórme o que determinasse o exame prévio a que eram submettidos os sôros. Não assim actualmente: *Multermilch usa, com os sôros de indice hemolytic inferior a 3, systematicamente do proprio sôro humano fresco negativo, préviamente dosado.*

Para isso toma-se um sôro negativo ou a mistura dos sôros negativos das reacções que se acabam de fazer. Dilue-se a mistura ao meio, ao quarto, ao oitavo, etc., com agua physiologica, procedendo-se a uma reacção para cada diluição, só modificando a quantidade de globulos a juntar no segundo tempo, que será sempre 0,1, como se vê no quadro n.º 5.

#### QUADRO N.º 5

Dosagem de uma mistura de sôros humanos negativos frescos.

Tubos	Anti-geno	Agua physiologica	Mistura de sôros $\frac{1}{2}$	Mistura de sôros $\frac{1}{4}$	Mistura de sôros $\frac{1}{8}$	Globulos de carneiro a 5 %	Meia hora na estufa a 37°.
1	0,1	0,2	0,1	—	—	0,1	
2	0,2	0,1	0,1	—	—	0,1	
3	—	0,5	0,1	—	—	0,1	
4	0,1	0,2	—	0,1	—	0,1	
5	0,2	0,1	—	0,1	—	0,1	
6	—	0,5	—	0,1	—	0,1	
7	0,1	0,2	—	—	0,1	0,1	
8	0,2	0,1	—	—	0,1	0,1	
9	—	0,5	—	—	0,1	0,1	

Depois de dosado o sôro ou a mistura de sôros diluidos, cujas substancias hemolyticas vão ser utilisadas, toma-se seis tubos, servindo os tres primeiros como testemunhas e os tres ultimos para a reacção. Nos tres tubos testemunhas a unica modificação da distribuição exposta no quadro 2, é que em vez de 0,1 do sôro a exami-

nar coloca-se 0,1 da mistura dos sôros cuja maior diluição produziu hemolyse na dosagem que acabamos de ver, e a quantidade de globulos que é sempre 0,1. Nos tres tubos da reacção a distribuição é a mesma dos tubos testemunhas, juntando-se 0,1 do sôro a examinar além de 0,1 do sôro dosado diluido ao maximo e menos 0,1 de agua physiologica em cada tubo para uniformizar a quantidade de liquido.

QUADRO N° 6

Tubos	Antigeno	Sôro a examinar	Mistura de sôros diluida ao maximo	Agua physiologica		Globulos de carneiro	
1	0,1	—	0,1	0,2		0,1	
2	0,2	—	0,1	0,1		0,1	
3	—	—	0,1	0,5		0,1	
4	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	
5	0,2	0,1	0,1	—		0,1	
6	—	0,1	0,1	0,2	Uma hora e meia na estufa a 37°	0,1	Meia hora na estufa a 37°

Havendo hemolyse nos tres tubos testemunhas o resultado da reacção pode ser lido definitivamente; no caso contrario, não se dando hemolyse nesses tubos, a reacção terá que ser repetida, sendo que a unica modificação a fazer na distribuição do quadro 6, é substituir a quantidade do sôro hemolyticó diluido ao maximo por uma quantidade duas vezes maior. Assim, se no primeiro caso foi usado 0,1 da diluição ao quarto, deve ser usado depois 0,1 da diluição ao meio. Convém, para se não perder muito tempo, fazer de uma vez a reacção com essas duas doses do sôro hemolyticó humano dosado.

Com o liquido cephalo rachidiano a reacção pode ser feita da mesma maneira que com os sôros destituidos de poder hemolyticó. Só ha a considerar que, sendo o liquido cephalo rachidiano pobre em anti-corpos específicos, a quantidade usada deverá ser muito maior que a de sôro: 0,3-0,5 a 1 c. c., como aconselha o autor da reacção.

QUADRO N° 7

Tubos	Antigeno	Liquido cephalo rachidiano	Mistura de sôros diluida ao maximo	Agua physiologica		Globulos de carneiro	
1	0,1	0,5 a 1cc.	0,1	0,1		0,1	
2	0,2	0,5 a 1cc.	0,1	—		0,1	
3	—	0,5 a 1cc.	0,1	0,2	Uma hora e meia na estufa a 37°.	0,1	Meia hora na estufa a 37°.

*Preparo do antígeno.* O antígeno aconselhado é o de *Bordet e Ruelens*, ligeiramente modificado e que para aqui transcrevemos do trabalho de *Mutermilch*: moer 100 grammais de coração de vitello, juntar 125 c. c. de acetona e deixar em contacto um a dois dias na temperatura ambiente; eliminar a acetona por filtração em papel, juntando de novo 200 c. c. de acetona. Deixar na temperatura ambiente seis a oito dias agitando todos os dias. Filtrar novamente e pôr mais um pouco de acetona fresca durante um a dois dias. Filtrar e seccar o tecido cardíaco na estufa a 37°. Adicionar em seguida 200 c. c. de álcool a 95°, deixando agir durante 10 a 12 dias na temperatura ambiente, agitando todos os dias. Filtrar.

A emulsão do antígeno deve sempre ser feita juntando-se a água ao antígeno gota a gota, agitando-se constantemente.

A diluição aconselhada é a de 1/20, mas *Mutermilch* só considera como bom o antígeno que em diluições concentradas (1/5) não dê resultados positivos com sôros negativos, e que em altas diluições (1/160 ou 1/320) dê ainda reacções positivas com os sôros syphiliticos.

O antígeno deve ser experimentado em todas essas diluições com sôros positivos e negativos.

Os antígenos usados nas nossas reacções foram experimentados nas diluições de 1/10 até 1/200, com sôros fortemente positivos e com sôros negativos, dando bons resultados.

Devido à actividade desigual de alguns corações, sempre usamos no preparo de um antígeno, quer seja elle para a reacção de *Wassermann* ou para alguma reacção de floculação, de seis a nove corações, seguindo o conselho dos que mais estudaram o assumpto (*Noguchi, Coca e L'Esperance*, etc.). E assim preparamos o antígeno de *Bordet e Ruelens*, que nos serviu.

#### IV

#### CONFRONTO COM A REACÇÃO DE WASSERMANN

Fizemos, como se vê no quadro 8, duzentas e cincoenta reacções, confrontando o método de sôro activo usado no Instituto Pasteur de Paris, por *Mutermilch*, com a reacção de *Wassermann*.

Damos na parte referente á reacção de *Mutermilch* o resultado da leitura do índice hemolytic de cada sôro. Onde houve apenas hemolyse parcial, ou ausencia de hemolyse com 0,3 de globulos, assim como nos líquidos céphalo rachidianos, a reacção foi feita com uma mistura de sôros negativos dosada segundo recommenda o método; em seguida vê-se o resultado da reacção com 0,1 e 0,2 de antígeno. Na parte do quadro que trata da reacção de *Wassermann*, damos os resultados obtidos com os dois antígenos por nós usados.

QUADRO N° 8

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.				Pela reacção de Wassermann			
NOMES	Indice hemolytic			Antigeno			
	0,5	0,6	0,9	Bordet e Ruelens			
				0,1	0,2		
1 P. R. — 27-6-925	H	H	H	—	—	—	—
2 H. — 27-6-925	H	Hp	0	++++	++++	++++	++++
3 R. F. — 27-6-925	H	Hp	0	—	—	—	—
4 A. G. — 27-6-25	H	H	H	—	—	—	—
5 J. S. — 27-6-925	H	H	H	—	—	—	—
6 4615 — 15 7 925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
7 4628 — 15-7-925	H	H	H	—	—	—	—
8 4610 — 15-7-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
9 4614 — 15-7-925	H	H	H	—	—	—	—
10 4660 — 17-7-925	H	H	H	++	++	++	++
11 4657 — 17-7-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
12 4648 — 17-7-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
13 4661 — 17-8-925	H	H	Hp	—	—	—	—
14 M. B. — 17-7-295	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
15 M. C. — 17-7-925	H	H	H	+++	++++	+++	+++
16 5018 — 31-7-925	H	H	H	—	—	—	—
17 4958 — 31-7-925	H	H	Hp	—	—	—	—
18 4966 — 31-7-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
19 4967 — 31-7-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
20 R. V. — 7-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
21 M. A. — 7-8-925	0	0	0	—	—	—	—
22 G. V. — 14 8-925	H	H	H	—	—	—	—
23 F. G. — 14-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
24 R. P. A. — 14-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
25 A. F. — 14-8-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
26 1037 — 14-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
27 C. C. S. — 21-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
28 P. R. — 21-8-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
29 E. R. — 21-8-925	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
30 O. M. — 21-8-925	H	H	Hp	—	—	—	—
31 M. D. — 11-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—

	NOMES	Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos						Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos		
		0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens	0,1	0,2	Bordet e Ruelens	Noguchi
52	S. S. — 11-9-925	Hp	Hp	0	++++	++++	++++	++++	++++
53	F. P. — 11-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—
54	R. M. — 11-9-925	H	Hp	Hp	+++	++++	++	++	++
55	M. G. — 4-(-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—
56	E. J. — 4-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—
57	F. C. — 4-9-925	Hp	Hp	0	++++	++++	++++	++++	++++
58	J. P. — 4-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—
59	E. A. — 4-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—
40	A. R. — 4-9-925	H	H.	Hp	—	—	—	—	—
41	O. A. — 4-9-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++	++++
42	M. J. — 4-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—
43	M. P. — 4-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—
44	J. S. — 11-9-9.....	H	Hp	Hp	+++	++++	+++	+++	+++
45	I. V. — 11-9-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++	++++
46	M. P. — 11-9-925	H	H	H	—	+	—	—	—
47	J. A. — 11-9-925	H	Hp	Hp	+	+++	+++	+++	+++
48	C. M. — 11-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—
49	M. G. S. — 18-9-925	H	H	H	++++	++++	++++	++++	++++
50	H. M. — 18-9-925	H	Hp	Hp	+++	+++	+++	+++	+++
51	M. E. — 18-9-925	H	H	0	++++	++++	++++	++++	++++
52	F. P. — 18-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—
53	E. L. C. — 18-9-925	H	H	Hp	+++	++++	++	++	++
54	F. S. — 18-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—
55	J. L. — 18-9-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++	++++
56	O. R. L. — 18-9-925	H	H	Hp	++	+++	++	++	+
57	F. G. — 18-9-925	Hp	Hp	Hp	+++	+++	++++	++++	++++
58	M. G. — 18-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.										Pela reacção de Wassermann			
	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos			Bordet e Ruelens	Noguchi		
		0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		0,1	0,2					
59	A. J. — 18-9-925	H	H	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
60	F. C. — 18-9-925	H	H	H	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
61	R. U. — 25-9-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
62	J. S. — 25-9-925	H	H	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
63	A. T. — 25-9-925	H	H	H <sub>p</sub>	++++	++++	++	++	+	—	—		
64	C. C. — 25-9-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
65	R. M. — 25-9-925	H	H	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
66	A. A. — 25-9-925	H <sub>p</sub>	0	0	++	+++	++	++	+	—	—		
67	P. B. C. — 25-9-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
68	J. B. N. — 25-9-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++		
69	P. S. — 25-9-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
70	J. M. L. — 25-9-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
71	A. C. — 25-9-925	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
72	R. S. — 25-9-925	H	H	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
73	L. R. — 25-9-925	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
74	A. R. S. — 25-9-925	H	H	H <sub>p</sub>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
75	C. C. — 16-10-925	H	H	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
76	A. M. — 16-10-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
77	J. M. — 16-10-925	H	H	H <sub>p</sub>	—	+	—	—	—	—	—		
78	N. B. — 16-10-925	H	H	H <sub>p</sub>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
79	A. A. — 16-10-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	+	++	+	+	+	+	+		
80	J. P. — 16-10-925	H <sub>p</sub>	0	0	—	—	—	—	—	—	—		
81	F. G. — 30-10-925	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	0	—	—	—	—	—	—	—		
82	C. A. — 30-10-925	H	H	H <sub>p</sub>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++		
83	C. M. — 25-10-925	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++		
84	J. L. — 25-10-925	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		
85	M. B. — 25-10-925	H	H <sub>p</sub>	H <sub>p</sub>	—	—	—	—	—	—	—		

	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Pela reacção de Wassermann	
		0,5	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Antigenos	
					0,1	0,2	Bordet e Ruelens	Noguchi
86	G. P. — 25-10-25	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
87	J. A. — 25-10-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
88	R. S. — 25-10-925	0	0	0	—	—	—	—
89	A. Q. — 25-10-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
90	J. M. A. — 25-10-925	Hp	Hp	Hp	+++	++++	+++	+++
91	P. N. — 25-10-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
92	R. C. — 25-10-925	0	0	0	—	—	—	—
95 (*)	M. J. P. — 25-10-25	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
94	699 — 25-10-925				—	—	—	—
95	A. G. — 30-X-925	H	H	H	++++	++++	++++	++++
96	M. F. G. — 3010-25	H	H	Hp	—	—	—	—
97	N. C. — 30-10-925	H	H	Hp	—	—	—	—
98	V. M. — 30-10-925	H	H	H	—	—	—	—
99	O. L. — 30-10-925	H	H	H	—	—	—	—
100	B. R. — 30-10-925	H	H	H	—	—	—	—
101 (*)	J. F. O. — 30-10-925	H	H	H	++	+++	—	—
102	1248 — 30-10-925				—	—	—	—
103	C. N. — 30-10-925.	H	H	H	—	—	—	—
104	M. F. — 6-11-926	H	H	Hp	—	—	—	—
105	L. A. P. — 6-11-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
106	L. R. — 6-11-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
107	J. O. — 6-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
108	A. A. — 6-11-925	H	H	H	—	—	—	—
109	C. B. — 6-11-925	0	0	0	—	—	—	—
110	A. D. — 6-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
111	U. — 6-11-925	H	H	Hp	—	+	—	—
112	R. N. B. — 6-11-925	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.										Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos			Bordet e Ruelens	Noguchi
		0,5	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		0,1	0,2			
115	F. — 6-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
114 (*)	M. — 6-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
115	724 — 6-11-925				—	—	—	—	—	—	—
116	M. C. C. — 15-11-25	H	Hp	Hp	+	+	+	+	+	+	+
117	J. L. P. — 15-11-925	H	H	Hp	++++	++++	++	++	++	++	++
118	B. S. — 15-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—	—	—
119	J. F. — 15-11-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
120	J. F. — 15-11-925	H	H	H	++++	++++	++	++	++	++	++
121	N. S. — 15-11-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
122	J. M. — 15-11-925	H	H	Hp	—	+	+	+	+	+	+
123 (*)	J. B. P. — 15-11-925	H	H	Hp	++++	++++	++	++	++	++	++
124	H. I. — 25-11-925				—	—	—	—	—	—	—
125	U. N. — 27-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
126	A. G. C. — 27-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
127	P. C. — 27-11-925	Hp	Hp	Hp	++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
128	F. F. — 27-11-925	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—
129	M. L. — 27-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—	—	—
130	G. O. — 27-11-925	Hp	Hp	0	—	—	—	—	—	—	—
131	M. C. — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
132	E. S. — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
133	J. L. M. — 27-11-925	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—
134	J. F. O. — 27-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—	—	—
135	79 — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
136	B. — 27-11-925	H	Hp	Hp	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
137	1548 — 27-11-925	H	H	H	—	—	—	—	—	—	—
138	A. N. A. — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	—
139	O. B. C. — 27-11-925	H	H	H	—	—	—	—	—	—	—

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.							Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos	
		0,5	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2		
140	S. G. — 27-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
141	A. D. — 4-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
142	L. S. — 4-12-925	H	H	Hp	+++	+++	++	++
143	M. P. — 4-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
144	X. B. — 4-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
145	J. A. — 4-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
146	C. G. — 4-11-925	Hp	Hp	Hp	+++	+++	+++	+++
147	J. D. — 11-12-925	H	H	H	—	—	—	—
148	L. M. — 11-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
149	R. G. — 11-12-925	H	H	H	—	—	—	—
150	R. M. — 11-21-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
151	A. J. — 11-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
152	M. F. — 11-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
153	I. M. R. — 18-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
154	E. R. — 18-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
155	O. A. — 18-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
156	C. O. — 18-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
157	C. F. — 18-12-925	H	H	Hp	+	+	+	+
158	J. D. O. — 18-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
159	1467 — 18-12-925	H	Hp	Hp	++++	++++	+++	++++
160	V. A. — 18-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
161	X. — 18-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
162	J. R. — 20-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
163	A. M. — 20-12-925	H	H	Hp	++	++	++	++
164	V. A. — 20-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
165	A. B. — 20-12-925	H	Hp	Hp	+	+	+	+
166	C. M. — 20-12-925	H	Hp	Hp	—	++	++	+

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.										Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos			Bordet e Ruelens	Noguchi
		0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		0,1	0,2			
167	J.R. — 20-12-925	H	H	H	++++	++++	—	—	+	+	
168	M. A. D. — 20-12-925	H	Hp	Hp	++++	++++	—	—	++++	++++	
169	I. B. — 20-12-925	H	H	H	—	—	—	—	—	—	
170	P. F. A. — 22-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—	—	—	
171	J. D. G. — 22-12-926	H	H	H	—	—	—	—	—	—	
172	J. P. — 22-1-926	H	H	Hp	—	—	—	—	—	—	
173	R. F. C. M. — 22-1-26	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	
174	D. M. — 29-1-926	0	0	0	+	+	—	—	+++	+++	
175	C. O. — 29-1-926	H	H	0	—	—	—	—	—	—	
176	A. B. — 29-1-926	H	Hp	0	—	—	—	—	—	—	
177	A. C. — 29-1-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	
178	A. M. — 29-1-926	H	Hp	0	—	—	—	—	—	—	
179	T. A. S. 29-1-926	Hp	0	0	—	—	—	—	—	—	
180	A. M. — 29-1-926	Hp	Hp	0	—	—	—	—	—	—	
181	H. F. S. — 29-1-926	Hp	Hp	0	—	—	—	—	—	—	
182	A. P. N. — 29-1-926	H	Hp	0	++++	++++	—	—	++++	++++	
183	A. B. — 29-1-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	
184	A. C. — 29-1-926	0	0	0	++	++	—	—	++	++	
185	M. P. L. — 29-1-926	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	
186	A. B. — 29-1-926	Hp	Hp	Hp	++++	++++	—	—	++++	++++	
187	M. L. — 29-1-926	H	Hp	Hp	+	++	—	—	—	—	
188	F. — 29-1-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—	—	—	
189	J. A. R. — 29-1-926	H	H	0	—	—	—	—	—	—	
190	C. H. — 29-1-926	H	Hp	0	—	—	—	—	—	—	
191	V. L. — 29-1-926	Hp	Hp	Hp	++	++	—	—	++	++	
192	L. A. — 29-1-926	H	0	0	—	—	—	—	—	—	
193	E. C. — 29-1-926	H	H	H	—	—	—	—	—	—	

	NOMES	Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.						Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos		
		0,5	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi	
194	H. C. — 29-1-926	H	H	H	—	—	—	—	
195	J. R. L. — 12-2-926	H	H	Hp	—	—	—	—	
196	R. R. — 12-2-926	H	H	Hp	—	—	—	—	
197	M. C. — 12-9-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—	
198	A. G. — 12-2-926	H	H	H	—	—	—	—	
199	H. S. — 12-2-926	Hp	Hp	Hp	++++	++++	+	+	
200	R. G. — 12-9-926	H	H	H	—	—	—	—	
201	J. D. — 16-4-926	H	H	H	—	+	—	—	
202	M. D. — 16-4-926	H	H	H	++	+++	—	—	
203	A. D. — 16-4-926	H	H	H	—	—	—	—	
204	J. F. S. — 16-6-926	H	H	Hp	—	—	—	—	
205	J. C. — 23-4-926	H	H	H	—	—	—	—	
206	T. J. — 23-4-926	Hp	0	0	—	—	—	—	
207	O. S. — 23-4-926	H	H	H	—	—	—	—	
208	M. D. — 30-4-926	H	H	H	—	—	—	—	
209	L. M. — 30-4-926	H	H	H	—	—	—	—	
210	A. P. — 30-4-926	H	H	H	—	—	—	—	
211	A. R. — 30-4-926	H	H	H	++++	++++	++++	++++	
212	F. R. C. — 7-5-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—	
213	A. C. — 7-5-926	H	H	Hp	—	—	—	—	
214	V. M. — 7-5-926.	H	Hp	Hp	—	—	—	—	
215	S. B. — 7-5-925	H	H	H	—	—	—	—	
216	C. T. — 7-5-926	H	H	H	—	—	—	—	
217	E. C. — 7-5-926	H	Hp	Hp	—	++	—	—	
218	M. S. — 7-5-926	H	H	H	—	—	—	—	
219	M. C. — 7-9-926	H	H	Hp	—	—	—	—	
220	J. — 18-5-926	H	H	H	—	—	—	—	

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.							Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos	
		0,6	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2		
221	A. J. C. S. — 18-5-25	H	H	H	++++	++++	++++	++++
222	A. — 18-5-926	Hp	Hp	Hp	++ gr	++++	++	+++
223	J. S. — 21-5-925	H	H	Hp	+++	++++	+	+
224	E. C. — 21-5-926	H	H	H	—	—	—	—
225	V. A. — 21-5-926	H	H	Hp	—	+++	+	+
226	A. M. 21-5-926	H	H	Hp	—	—	—	—
227	E. C. — 21-6-926	Hp	0	0	+++	++++	++	+++
228	K. A. — 21-6-926	H	H	Hp	—	—	—	—
229	J. S. — 21-6-926	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
230	O. F. — 21-6-926	H	H	Hp	—	—	—	—
231	J. G. R. F. — 21-6-26	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
232	W. T. — 28-5-926	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
233	L. O. — 28-5-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
234	B. M. — 28-5-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
235	A. E. — 28-5-926	H	H	Hp	+	++	—	—
236	F. R. — 28-5-926	H	H	Hp	—	—	—	—
237	C. L. — 28-5-926	H	H	Hp	—	++	—	—
238	A. T. — 28-6-926	H	Hp	Hp	—	++	—	—
239	O. — 18-6-926	H	H	Hp	—	—	—	—
240	N. — 18-6-936	H	Hp	Hp	—	—	—	—
241	A. A. — 18-6-925	H	H	H	—	—	—	—
242	C. A. R. — 25-6-926	H	Hp	Hp	+	+	+	+
243	M. R. — 25-6-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
244	A. A. S. — 2-7-926	H	H	H	++++	++++	++++	++++
245	L. F. — 2-7-926	H	H	Hp	—	—	—	—
246	M. B. — 2-7-926	H	H	H	—	—	—	—
247	M. — 2-7-926	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++

Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.							Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytic			Antigeno		Antigenos	
		0,5	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2		
248	B. R. — 9-7-926	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
249	M. D. — 9-7-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
250	L. O. — 23-7-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—

H: hemolyse; Hp: hemolyse parcial; O: ausencia de hemolyse;  
—: reacção negativa; (\*) reacções feitas com líquido cefalo rachidiano.

As reacções positivas são assinaladas com uma a quatro cruzes conforme a sua intensidade.

## V

## DISCUSSÃO

Como acabamos de ver, em duzentos e cinco exames feitos ao mesmo tempo pelas reacções de Wassermann e de Mutermilch, 79 (31, 6 %) foram positivas na reacção de Wassermann e 90 (36 %) na reacção de Mutermilch. E' provavel haver uma maior sensibilidade na reacção de Mutermilch, embora para se fazer semelhante afirmação com segurança precisassemos do controle da clinica.

Se tomarmos as reacções que foram positivas pelos dois methodos, isto é, 79 reacções, vemos que 53 foram consideradas como dando desvio de igual intensidade tanto na reacção de Wassermann como na de Mutermilch, correspondendo o numero de cruzes, embóra na leitura assim praticada haja desvantagem para a reacção de Mutermilch que é feita com um só antigeno nas duas doses de 0,1 e 0,2. Constatamos tambem que dessas 79 reacções, 21 (26, 7 %) tiveram mais cruzes na reacção de Mutermilch do que na de Wassermann, e apenas 5 (6, 3 %) mostraram-se mais fortemente positivas nesta reacção do que naquella. Portanto, mais uma prova da maior sensibilidade da reacção de Mutermilch, maior sensibilidade tambem assignalada na conferencia de Copenhague, como vimos atraç.

No quadro 9 damos o resumo dos resultados das 250 reacções feitas.

QUADRO N° 9

	Total	Numero de reacções positivas	Porcentagem de reacções positivas	Maior sensibilidade entre as reacções positivas pelos dois methodos.	Porcentagem de maior sensibilidade entre as reacções positivas pelos dois methodos
Reacção de Wassermann	250	79	31,6%	5	6,3%
Reacção de Mutermilch	250	90	36%	21	26,7%

Apropositado é agóra entrar na discussão do assumpto sem nos estirarmos niamamente sobre elle.

Para medir o valôr da reacção usada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos, para o sôro diagnostico da syphilis, foi escolhida a reacção de *Wassermann*, geralmente tida e havida por todos como reacção padrão.

Infelizmente não pudemos verificar se nos casos positivos com sôro activo e negativo no *Wassermann*, de que lado estaria a observação clinica.

A reacção de *Wassermann*, com ser uma reacção de indiscutivel valôr, é feita de maneira differente em cada laboratorio. E' o que

temos visto; cada um de nós se julga no direito de a praticar da maneira que a nossa observação acha ser a melhor, quando não procura faze-la da maneira mais facil. Dahi sobre vindo a discordancia dos resultados de exames feitos ao mesmo tempo em diversos laboratorios e a sua inevitável consequencia—o descredito da reacção.

Já vimos mesmo escripto sobre a reacção de *Wassermann* "que talvez ella tenha em seu activo mais maleficios do que beneficios, prestados á humanidade". São exageros a que chegam todos aquelles que não consideram a relatividade dos factos; embóra imperfeita e de difficult execução devido ás inumeras causas de erro que contornam a sua technica, ella tem grande valôr, embóra deva merecer dos clinicos uma confiança relativa.

Como nos servimos da reacção de *Wassermann* para medir o valor da reacção de *Muttermilch* com sôro activo, torna-se quasi indispensavel que digamos, embóra sumariamente, como ella foi feita.

Não cabe no espaço deste trabalho abordar questões tão discutidas como sejam as inumeras variantes de technica da reacção de *Wassermann*. Apenas diremos que o nosso complexo hemolyticó é rigorosamente dosado no momento da reacção.

Como diz *Ronchère*<sup>(1)</sup>, isso pôde ser feito de duas maneiras: usando a mesma dose de complemento, para o que é preciso ser titulado préviamente o sôro de cobaio e juntado á reacção em quantidades diferentes segundo o titulo determinado (*Lerede e Rubinstein*); ou então usar o mesmo volume de sôro de cobaio, sendo que, neste caso, para compensar o poder complementar tão variável desse sôro, ajustar o complexo hemolyticó com doses variaveis de sôro hemolyticó (*Wassermann e Lange*).

Geralmente seguimos o primeiro processo: tomamos uma mistura de sôros de 3 a 4 cobaios conservados em jejum e sangrados de manhã, mistura diluida a 1/10, da qual tomamos doses crescentes (0,1-0,15-0,2-0,25-0,3), respectivamente em cinco tubos, juntamos 1 c. c. de globulos sensibilizados com 3 unidades, inteiramos com agua physiologica o volume de 3 c. c., pomos na estufa a 37° durante 30 minutos, fazendo em seguida a leitura. Tomamos sempre duas unidades complementares. Quando, embóra muito raramente, seríamos forçados a usar mais de 0,5 da diluição dos sôros de cobaios, fazemos, então, nova dosagem do nosso systema hemolyticó com o auxilio do segundo processo, aumentando uma ou duas unidades de sôro hemolyticó aos globulos já sensibilizados com as tres unidades, repetindo o ensaio anteriormente feito com as mesmas doses crescentes do complemento deluido a 1/10. Regulo de maneira a tomar sempre de 0,3 a 0,4 da diluição a 1/10 da mistura dos sôros dos cobaios, mas sempre duas unidades complementares.

Não tomamos de 0,5 para cima levando em conta as recomendações de muitos (*Sormani, Kaupe, Kretchmer, Lerede e Rubinstein*) que acham ser a dose de 0,05 de sôro muito elevada, diminuindo o numero de reacções positivas, tendo *Ronchère*<sup>(2)</sup> procurado demonstrar que neste caso o volume do sôro de cobaio age pela ação neu-

(1) La Reaction de Bordet-Wassermann pour le séro-diagnostic de la syphilis. Paris, 1919.

(2) Comptes rendus de la Soc. de Biol., 27 Juillet, 1918.

tralisante das suas albuminas, questão, aliás, muito discutivel. Ainda recentemente o Dr. Arlindo de Assis<sup>(1)</sup>, em trabalho "Sobre a influencia da albumina do complemento na dosagem das reacções de fixação", põe em cheque a opinião de Ronchère que acabamos de citar. Acha que a massa de albumina existente no sôro de cobaio diluído que se usa nas experiencias de fixação é muito pequena para ser responsabilizada como factor capaz de ter influencia na dosagem da reacção de fixação. Das suas experiencias, muito demonstrativas, conclue: "Não nos parece, por isso, que, nas condições que apresentamos, seja lícito imputar á albuminas do sôro complementar a menor influencia na apreciação da intensidade fixadora".

A lei chamada do suprimento ou substituição baseada nos estudos de Hideyo Noguchi<sup>(2)</sup>, nos autoriza a seguir as duas maneiras acima espostas de dosar o complexo hemolytic. Noguchi verificou que o amboceptor aumenta progressivamente a actividade do complemento; assim, em presença de uma unidade de amboceptor, geralmente é preciso 0,1 de complemento para produzir hemolyse. Ao passo que, empregando-se 4, 8, 20 unidades de amboceptor, pôde-se obter o mesmo resultado com 1/3, 1/5 e 1/10 da mesma quantidade de complemento (0,1).

Convém assignalar que este suprimento não se faz de maneira regular, como também a diminuição do complemento abaixo de uma certa concentração não pôde mais ser compensado por um excesso de amboceptor, e reciprocamente (*Rodet e Fabre*).

O nosso Wassermann é feito com dois antigenos: o de *Bordet* e *Ruelens* e o de *Noguchi*.

Haveria muito que dizer sobre a escolha de antigenos. Ha sobre o assumpto um magnífico trabalho publicado este anno, no qual são estudados diversos antigenos, trabalho feito sobre a mesma direcção, em diversos dos melhores laboratorios dos Est. Unidos da America do Norte, relatado por *Ruth Gilbert* e *Virginia Langworth*<sup>(3)</sup>.

Nesse trabalho foram tomados para estudos, entre outros, os seguintes antigenos: o do Laboratorio do Estado de N. Y. (cholesterinado), o de Müller (cholesterinado), o de Kolmer (cholesterinado), o de *Bordet* e *Ruelens* e o de *Noguchi*.

Ficou constatado que os antigenos do Laboratorio do Estado de N. Y. e o de Müller, ambos cholesterinados, deram mais alta porcentagem de reacções positivas nos casos de syphilis verificada; no grupo de casos presumivelmente não syphiliticos foram elles que deram maior numero de reacções positivas, talvez falsas. O antígeno de Kolmer foi o menos sensivel, ficando o antígeno de *Bordet* e *Ruelens* e o de *Noguchi*, no meio, entre os menos sensíveis, com a vantagem sobre estes de dar muito menos reacções positivas com sôros de doentes clinicamente não syphiliticos. Acham ser essencial tomar-se dois antigenos, um que seja altamente sensivel, como o antígeno cholesterinado do Laboratorio do Estado de N. Y. ou o antígeno, também cholesterinado, de Müller; outro, que tenha pequena ou ne-

(1) *Sciencia Medica*, anno IV, n.º 4, 30 de Abril, 1926.

(2) Joltrain (Ed.). *Nouvelles Méthodes de séro-Diagnostic*. Paris, 1916, p. 58.

(3) Standardization of the Wassermann Test—The American Journal of Syphilis, 1926, Vol. X, n.º 1, p. 101.

nhuma tendencia a dar reacções positivas senão em casos de syphilis activa, como por exemplo o antigeno de *Bordet* e *Ruelens*.

Temos dado sempre preferencia aos antigenos não cholesterinados, mas não podemos deixar de reconhecer a utilidade que haveria em seguirmos as recommendações das recentes pesquisas dos laboratorios dos Estados Unidos.

E' verdade que na conferencia de Copenhague, que nos referimos atraç, foram melhores os resultados obtidos pelos methodos usando um só antigeno, não cholesterinado, aos methodos usando muitos antigenos e alguns cholesterinados, mas não ha negar que é cauteloso usar-se dois antigenos.

Ha tambem quem adopte uma mistura de antigenos.

Como estamos discutindo o assumpto do nosso trabalho não nos podemos deixar de referir ao aquecimento ou inactivação dos sôros usado na reacção de *Wassermann* e a sua consequencia na pesquisa da sensibilisadora syphilitica.

E' sabido que o sôro tem um complemento proprio, variavel em sua quantidade de um caso a outro, razão pela qual, na reacção de *Wassermann*, tornando-se indispensavel uma quantidade medida de complemento, este é destruido pelo aquecimento a 56°, durante meia hora, e substituido por sôro fresco de cobaio rigorosamente dosado. Mas, acontece que esse aquecimento—segundo observaram primeiramente *Hans Sachs*, *Altmann*, *Leberer*, *Noguchi*, *Thempsen*, *Busila*, *Weinberg*, *Steinitz*, *Halion*, e *Bauer*, etc., e pódem observar todos aquelles que quizerem repetir as experiencias desses observadores, como fizemos—diminúe a sensibilidade da reacção, isto devido, como demonstrou muito bem, entre outros, *Busila* (¹), no seu artigo sobre “Uma sensibilisadora syphilitica thermolabil”, que os sôros positivos podem ter, uns, sensibilisadoras thermolabeis, outros, sensibilisadoras thermoestaveis, podendo alguns conter a mistura dessas duas variedades de anti-corpos.

Já é conhecido que a sensibilisadora syphilitica do proprio liquido cephalo rachidiano tambem pode ser parcial ou inteiramente thermolabil, como a dos anti-corpos em geral. Portanto, quando a reacção de *Wassermann* é positiva no liquido e negativa no sangue, não quer sempre dizer que a sensibilisadora esteja ausente neste, mas sim que tenha dsapparecido pelo aquecimento devido a sua thermolabilidade, ao passo que o liquido não é aquecido para ser submettido a essa reacção.

Quando as duas sensibilisadoras thermolabil e thermoestavel existem conjuntamente em um sangue, ou liquido, assim mesmo a reacção feita com sôro activo é mais forte de que a feita com sôro aquecido. Existindo só a sensibilisadora thermolabil, com a technica original do aquecimento a reacção será negativa; ao passo que, na technica com sôro activo, a reacção poderá ser até fortemente positiva. Quando só existir a sensibilisadora thermoestavel as reacções pelas duas technicas serão mais ou menos da mesma intensidade.

Convém tambem assignalar que já foi por diversos experimentadores observado ser principalmente no começo da syphilis, no fim de um tratamento e na syphilis latente que se notam a presença ex-

(¹) Loc. cit.

clusiva dos anti-corpos thermolabeis, o que não deixa de ter interesse clínico.

Ao rematar estas considerações sobre a acção do aquecimento do sôro no sôro diagnostico da syphilis, não podemos deixar de assinalar que há também os que julgam que a inativação, se de um lado enfraquece os anti-corpos syphiliticos, de outro estabiliza esses anti-corpos, eliminando as reacções não específicas, tendo *Bôas* notado que os sôros dos tuberculosos, cancerosos, nephriticos, etc., fixam o complemento em presença de um antígeno lipoidico desde que se use sôro activo, o que se não daria com o sôro após inativação.

Não é nosso intento passar em revista aqui todos os pontos fracos da reacção de *Wassermann*, apenas de passagem citamos alguns com o fito de justificar as discordâncias por nós encontradas nos resultados das reacções de *Wassermann* e de *Mutermilch*.

A reacção de *Wassermann* é muito boa, mas não é perfeita. Há nela ainda um ponto que também não queremos deixar de assinalar.

E' sabido que o sôro humano contém normalmente uma sensibilizadora hemolytica, como também complemento, variando ambos em sua riqueza de um sôro para outro.

A propriedade heterolytica do sôro humano para com os globulos vermelhos de carneiro compõe-se da sensibilizadora e do complemento que podem ser determinados conjuntamente, como é feito na determinação do índice hemolytic do sôro, ou também podem ser determinados separadamente.

Ora, na reacção de *Wassermann*, com o aquecimento do sôro, este perde o complemento que vai ser substituído pelo complemento de cobaio rigorosamente dosado, mas conserva a sensibilizadora hemolytica que é thermoestável, a qual não é levada em conta na reacção. No entanto, da mesma forma que o complemento, a sensibilizadora hemolytica do sôro humano varia enormemente de um sôro para outro, não podendo deixar de influir no resultado da reacção.

*Weinberg* denominou índice da sensibilizadora hemolytica anti-carneiro, normalmente encontrada no sôro humano, a quantidade de globulos de carneiro a 5% dissolvidos por 0,1 de sôro inativado em presença de sôro de cobaio diluído a 50%.

No quadro abaixo vê-se a determinação desse índice por nós feito em 17 sôros.

**Determinação da propriedade heterolytica de sôros humanos aquecidos 30 minutos a 56°.**

Sôros	Tubos	Sôro aquecido	Complemento a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 50 minutos na estufa a 37°.
1	1	0,1	0,1	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	HP
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	0
2	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
3	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
4	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
5	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	2,5	HP
	3	"	"	0,5	0
	4	"	"	0,7	0
	5	"	"	0,9	0

Sôros	Tubos	Sôro aquecido	Complemento a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 50 minutos na estufa a 37°.
6	1	0,1	0,1	0,1	H
	2	"	"	0,5	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
7	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,5	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
8	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,5	HP
	3	"	"	0,5	0
	4	"	"	0,7	0
	5	"	"	0,9	0
9	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,5	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
10	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,5	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
11	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,5	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H

Sôros	Tubos	Sôro aquecido	Complemento a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
12	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
15	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	HP
14	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	HP
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	HP
15	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
16	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	HP
	3	"	"	0,5	HP
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	0
17	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H

Como acabamos de ver, é desigual e ás vezes grande a quantidade de sensibilisadora anti-carneiro existente no sôro humano. Em quasi 50 % dos casos do nosso quadro, 0,1 de sôro aquecido poude sensibilisar 1 c. c. de globulos de carneiro a 5 % substituindo o sôro hemolytic. Um sôro humano pôde dissolver globulos de carneiro 20 vezes mais do que um outro sôro, ambos aquecidos.

Na reacção de *Wassermann* o sistema hemolytic é dosado sem o sôro a examinar; a quantidade de complemento e de sôro hemolytic juntados é uniforme para todas as reacções feitas na occasião, podendo dizer-se que a quantidade de complemento será na realidade igual em todas as reacções por estarem os sôros inativados, mas a sensibilisadora hemolytica tem que ser desigual de uma reacção para outra, devido a levar cada sôro tambem a sua sensibilisadora hemolytica natural, não destruida pelo aquecimento e não previamente dosada. Ora, já vimos atraç que a sensibilisadora hemolytica ou amboceptor aumenta progressivamente a actividade do complemento; portanto, contendo cada sôro quantidades tão desiguas de amboceptor, como nos mostra o ultimo quadro, cada reacção terá o seu sistema hemolytic de força desigual, mas força desigual devido sempre á maior actividade do complexo hemolytic por um excesso da sensibilisadora hemolytica, excesso que constitue indiscutivelmente mais uma causa de erro na reacção de *Wassermann*, pois é sabido que "Uma quantidade de anti-corpus syphiliticos, justa sufficiente para fixar 0,1 de complemento com duas unidades de amboceptores, não é mais efficaz em presença de uma quantidade maior" (Joltrain).

Em um sôro rico em anti-corpos um excesso de hemolysina terá pequena acção, mas nos sôros fracamente positivos a sua acção poderá dar como resultado uma reacção negativa.

De passagem convém ainda assignalar que os sôros de cobaios usados como complemento na reacção de *Wassermann* tambem têm propriedade heterolytic para com os globulos de carneiro, propriedade essa de desigual poder, como vemos no quadro seguinte, em que determinamos as heterolysinas de 8 sôros de cobaios.

**Determinação da propriedade heterolytica de sôros de cobaios (sôros não aquecidos).**

Sôros	Tubos	Sôro de cobaio a 50 %	Globulos de carneiro a 50 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
1	1	0,1	0,1	0
	2	0,5	"	0
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	H
	2	0,1	"	0
	3	0,5	"	0
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	HP
	3	0,1	"	0
2	2	0,5	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
	4	0,1	"	0
3	2	0,5	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
	5	0,1	"	0
4	2	0,5	"	HP
	3	"	"	H
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
	5	0,1	"	0
5	2	0,5	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	HP

Sôros	Tubos	Sôro de cobaio a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 50 minutos na estufa a 37°.
6	1	0,1	0,1	H
	2	0,5	"	H
	3	0,5	"	H
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
7	1	0,1	"	0
	2	0,5	"	HP
	3	0,5	"	H
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
8	1	0,1	"	0
	2	0,5	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	H

Como na reacção de *Wassermann* o systema hemolytic é dosado com o complemento do dia e este deverá ser de uma mistura de sôros de dois a quatro cobaios, as suas heterolysinas para com os globulos de carneiro ficam tambem dosadas no conjunto do complexo hemolytic, não podendo, portanto, influir na reacção. Será, contudo, mais uma causa de erro para aquelles que não fazem essa dosagem, e maior ainda quando, além de não a fazerem, tomam o sôro de um só cobaio, que poderá ser rico em complemento e rico em heterolysina anti-carneiro, tornando o systema hemolytic inesperadamente muito forte sem o saber o experimentador.

Ao terminar queremos apenas que vejam neste modesto trabalho o producto de um esforço que, em nosso conceito, não passa da enunciação de problemas.

Ha muita cousa ainda a rever e a fazer sobre as questões que acabamos de abordar; e embóra já esteja na consciencia de quasi todos que a reacção de *Wassermann* é, na sôro diagnose da syphilis, a reacção na qual maior confiança tem-se depositado, contudo, ella tambem apresenta muitos pontos fracos, como provam á saciedade as considerações que vimos relembrando.

Somos da opinião de *Rubinstein* que affirma ser o uso simultâneo dos methodos de sôro aquecido e de sôro activo "indispensável ao sorologista para a probidade de seu trabalho e utilidade de seus resultados".

## RESUMO

Não se podendo negar a existencia de duas sensibilisadoras syphiliticas, uma thermolabil e outra thermoestavel, tanto no sangue como no liquido cephalo rachidiano, a reacção de *Wassermann*, executada segundo a sua technica original, com sôro aquecido, não poderá ser sempre uma prova de ausencia de sensibilisadora syphilitica, que poderá ser parcial ou totalmente thermolabil.

E' indispensável, portanto, que acompanhe a reacção de *Wassermann* uma reacção complementar em que seja usado o sôro activo, reacção capaz de revelar ambas as sensibilisadoras.

A reacção de *Mutermilch*, com sôros activos, actualmente usada no Instituto Pasteur de Paris, sendo, como acabamos de ver, uma reacção facil, sensivel e precisa,—impõe-se como uma das melhores reacções complementares á reacção de *Wassermann*, tornando-se, talvez, preferivel usa-la só a ter que usar a reacção de *Wassermann* sem o seu auxilio ou sem o auxilio de uma boa reacção com sôro activo.

A reacção de *Mutermilch* mostrou-se mais sensivel do que a reacção de *Wassermann*.

Em 250 exames feitos entre sôros e alguns líquidos cephalo rachidianos—31, 6 % foram positivos na reacção de *Wassermann* e 36 % na reacção de *Mutermilch*.

Todos os exames que foram positivos na reacção de *Wassermann* (79), foram tambem positivos na reacção de *Mutermilch*.

Houve 11 reacções positivas (4,4 %) na reacção de *Mutermilch*, nos 250 exames feitos, que foram negativas na reacção de *Wassermann*.

## SOMMAIRE

---

L'existence de deux sensibilisatrices syphilitiques, une thermolabile et une thermostable, tant dans le sang que dans le liquide céphalo rachidien ne pouvant être mise en doute, la réaction de *Wassermann*, exécuté suivant sa technique originale, avec le serum chauffé, ne pourra pas toujours donner la preuve de l'absence de sensibilisatrice syphilitique, qui pourra être partiellement ou totalement thermolabile.

Il est donc indispensable que la réaction de *Wassermann* soit complétée par une autre réaction, utilisant le serum actif et capable de révéler les deux sensibilisatrices.

La réaction de *Mutermilch*, faite avec les serums actifs, utilisée actuellement à l'Institut Pasteur de Paris, étant une réaction facile, sensible et précise, s'impose comme l'une des meilleures réactions complémentaires de la réaction de *Wassermann*; il est même peut-être préférable de l'utiliser seule plutôt que d'utiliser la réaction de *Wassermann* sans elle ou sans une autre bonne réaction avec serum actif.

La réaction de *Mutermilch* s'est montrée plus sensible que celle de *Wassermann*.

En 250 examens, surtout de serums et quelques liquides céphalo rachidiens, 31, 6 % ont été positifs avec la réaction de *Wassermann* et 36 % avec celle de *Mutermilch*.

Tous les examens positifs dans la réaction de *Wassermann* (79) ont été également positifs dans celle de *Mutermilch*; 11 réactions positives (4, 4 %) avec la réaction de *Mutermilch* ont été négatives avec celle de *Wassermann*.

---