

A REACÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA DETERMINAÇÃO DE FOCOS E NO DIAGNOSTICO RETROSPECTIVO DA FEBRE AMARELLA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E J. TRAVASSOS

Em publicações anteriores (1), descrevemos os resultados dos nossos estudos sobre a possibilidade do diagnostico retrospectivo da febre amarella por meio da reacção de fixação do complemento.

Na presente nota daremos os resultados de reacções praticadas em sôros de individuos suspeitos de febre amarella e provenientes de Santa-Cruz de la Sierra, capital do Departamento de Santa-Cruz na Bolivia. Estes soros nos foram enviados pelo dr. Salvador Mazza, chefe da "Missão de Estudos de Pathologia Regional", da Universidade de Buenos Ayres, que, por parte do governo da Provincia de Salta, Argentina, procedeu ás investigações de comprovação diagnostica *in loco*, estudando clinicamente os casos e colhendo o material necessario aos differentes exames.

A epidemia, em principios de 1932, alastrou-se entre os soldados do regimento boliviano "Colorados", victimando cerca de 60 % dos homens da tropa, propagando-se á população de Santa-Cruz e fazendo varias victimas. O presente foco do Departamento de Santa-Cruz attingiu principalmente a cidade de Santa-Cruz de la Sierra, extendendo-se ás provincias de Valle Grande e Cordillera, sendo de presumir que, antes de fevereiro de 1932 e já ha varios annos, reinasse a febre amarella sob a forma endemica em differentes zonas daquelle Departamento.

Segundo informações de Mazza (2), Santa-Cruz e circunvizinhanças parece já terem sido visitadas pela febre amarella anteriormente. Documentos datando de 1887 e que foram posteriormente publicados na "Revista del Instituto Medico Sucre" (N.º 60, julho 1932), referem a existencia do mal nessa epocha na população das Missões (Misiones), desde Santo Antonio de Parapeti até Munchiri, na provincia de Cordillera.

A doença, até então classificada sob a rubrica de "*ictericia grave de caracter epidemico*", manifestou-se, segundo a descripção do dr. Mamerto Salas, medico do regimento "Colorados", do modo seguinte: "os doentes apresentavam febre alta de 39° a 40°, mal estar geral, cephaléa intensa, lingua saburrosa, dôr epigastica com irradiações para o figado, vomitos frequentes em alguns casos e diarréa; em outros, myalgias do thorax e dos membros, pulso acelerado; seguia-se um segundo periodo apyretico com depauperamento accentuado, depressão mental e manifesta intolerancia gastrica. A maioria dos doentes melhorava definitivamente neste periodo, mas outros soffriam de hemorragias multiplas e abundantes: epistaxes, estomatorrhagias, hematêmeses, melenas e, ainda, lhes apparecia uma sub-ictericia nas conjunctivas e na pelle. Em certos doentes, a urina revelava grande quantidade de albumina".

O material que nos foi enviado pelo dr. Mazza constava de sôros de doentes e de convalescentes e destinava-se ás provas de protecção de *Macacus rhesus* e fixação do complemento. A primeira prova não poudé ser realizada neste Instituto por faltar actualmente o material adequado, tendo sido feita somente a prova de fixação do complemento nos 11 soros enviados.

Aquelle illustre collega, concomitantemente, enviou os sôros e material de necropsia ao Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, tendo tambem remetido soros ao dr. Nelson Davis, do laboratorio da Fundação Rockefeller, na Bahia, onde foram realizadas as provas de protecção em camondongos brancos. No Instituto Oswaldo Cruz, o dr. H. Aragão procedeu ás provas de agglutinação para *Leptospira ictero-hemorrhagiae* e os drs. Burle de Figueiredo e Magarinos Torres procederam ás verificações anatomo-pathologicas. Corroboraram as conclusões destes ultimos exames os professores Rocha Lima, do Instituto Biologico de S. Paulo, e Hoffmann, de Havana.

Todos os resultados foram concordes em firmar o diagnostico de febre amarella e é de notar que todas essas pesquisas foram effectuadas por esses diversos investigadores sem que soubessem dos resultados obtidos pelos demais, o que vem realçar o valor dessas differentes provas no diagnostico do mal amarrillico.

A prova da reacção de fixação do complemento, por nós realizada, comportou-se egualmente a contento e a accentuamos por ser um meio de diagnostico recentemente estudado e ser esta a primeira vez que é chamada a prestar serviços no diagnostico da infecção e elucidação de um foco. (*)

(*) Recentemente, tivemos conhecimento do resumo, in *Tropical Diseases Bulletin* XXX(1):3.1933, de um trabalho de Soper, Frobisher, Kerr e Davis, onde são consignados os resultados por elles obtidos com as provas de reacção de fixação do complemento comparativamente com a de protecção em macaco *rhesus*, feitas depois de um surto epidemico occorrido em Magé e Santo Aleixo (Estado do Rio de Janeiro). Num total de 300 sôros colhidos na zona endemica obtiveram resultados positivos, com a fixação do complemento.

Resumiremos agora a technica empregada, os resultados obtidos e faremos algumas considerações em torno do tempo optimo da sangria dos doentes em evolução do mal. Na nossa 2.^a nota publicada nas Memorias do Instituto do Butantan (1), expusemos a technica que empregámos nos nossos estudos sobre a reacção.

Como os nossos antigeneos, conservados no frigo, datassem de quasi 2 annos, antes de realizarmos as provas definitivas procedémos a um ensaio com soros, mantidos em stock, de antigos doentes de febre amarella, de *Silenus* (*Macacus*) *rhesus* sagrados 1 a 2 meses após a infecção e de individuos normaes, residentes na Bahia (Brasil) e de resultados positivos, anteriormente verificados.

O quadro No. 1 dá os resultados dessas investigações e os resultados anteriormente obtidos com esses mesmos soros, o que nos permittiu affirmar (3) que o antigeno amarillico preparado com figado de *rhesus* infectado conserva estaveis e, talvez, mesmo fortalecidas, suas propriedades fixadoras do complemento por um tempo relativamente longo (verificação após quasi 2 annos), em face de sôros especificos.

O quadro No. 2 reúne os resultados obtidos com os 11 soros enviados.

Nesse quadro são assignalados apenas os resultados de: a) reacções por nós praticadas, embora outras tenham sido feitas pelo dr. S. Mazza com antigeno que lhe enviaramos; b) prova de protecção, quando tambem realizada com os referidos soros.

As informações clinicas que completam o quadro nos foram enviadas pelo dr. Mazza e os resultados das provas de protecção para camondongos brancos, realizadas pelo dr. Nelson Davis, foram transcriptas do trabalho do dr. Mazza (2).

em 42%, resultados muito approximados ao anteriormente por nós obtido (Mem. Inst. Butantan V:185.1930); isto serve para confirmar ainda a nossa asserção quanto á possível immunização dos moradores em zonas endemicas, independente de infecção apparente e explicavel talvez pelo mechanismo já suggerido por um de nós (Mem. Inst. Butantan V:112.-1930).

Em 101 soros de pessoas residentes longe da zona de endemicidade, aquelles pesquisadores verificaram somente 3% de resultados positivos, o que concorda com os nossos estudos (0%) realizados com sôros de estrangeiros (japoneses) recém-chegados ao Brasil, podendo a pequena differença ser explicada pela inclusão fortuita de soros de pessoas immunes, anteriormente residentes em zona endemica.

Comparativamente com a prova de protecção em macaco, elles verificaram em regra, confirmando os resultados de nossas pesquisas anteriores, que os soros de reacção positiva davam protecção completa, apenas com uma discordancia de 13% favoravel a esta ultima prova. A prova de protecção, em todo caso, pode tambem falhar, como aconteceu em 1 caso, descripto pelos auctores, em que foi ella praticada com intervallos de meses, mostrando, ora completa protecção, ora ausencia de protecção e ora protecção incompleta.

QUADRO No. 2

No. do soro	Informações clinicas e outros dados	Reacção de fixação do complemento		Prova de protecção para camondongo branco	OBSERVAÇÕES
		0.2 de soro	0.1 de soro		
2	J. M. C., de Santa-Cruz, clinicamente febre typhoide, Widal positivo a 1/200, pesquisa plasmodios negativa.	0	0	?	
3	C. C., de Valle Grande, sub-ictericia, 14 dias de doença, pesquisa Leptospira negativa, Plasmodio negativa.	++	++	?	
5	A. M., de Potosi, doente ha 5 dias, epistaxes, Plasmodio <i>vitar</i> no sangue.	0	0	?	
10	S. L. R., soldado chegado de Sucre, com 1 anno de residencia em Santa-Cruz. Sem dados clinicos. Pesquisa Plasmodio negativa.	+	+	Positiva	
11	J. A., de Comarapara (Valle Grande). Convalescente. Sem dados clinicos. Plasmodio negativa.	++++	++++	Positiva	
12	M. M., de Warnes (Santa-Cruz). Symptomas de ictericia grave. Internado a 15 de março, sangue colhido a 25 de abril. Plasmodio negativa.	+++	+++	Positiva	
14	D. A., recém-chegado de La Paz, ictericia grave, paralyasia espastica dos membros. Entrado a 1 de abril, sangue colhido a 26 de abril; ainda doente com sub-ictericia e paralyasia.	0	0	Negativa	
18	R. M., soldado, de Santa-Cruz, sem dados clinicos, convalescente, Plasmodio negativa.	++	+++	?	
19	M. E., civil, de Santa-Cruz, hemorragia, manchas petechiaes, ictericia, considerado paludico.	0	0	?	
20	H. H., civil, de Santa-Cruz, com ictericia, sem hemorragias, considerado paludico, Plasmodio negativa. Convalescente.	+	+	?	
21	F. V., civil, de Charagua, com ictericia, hemorragias, manchas petechiaes. Plasmodio negativa, Weil-Felix positiva a 1/200.	0	0	?	
Testemunhas					
Rhesus . . 103	{ Immunizados febre amarella	++++	++++		{ Sangrados após 30 dias
Rhesus . . 57		++++	++++		
Rhesus . . 9	{ Inoculados «typho exanthemaico de S. Paulo.»	0	0		
Cobaia . . 471		0	0		

+ a ++++ = diferentes graus de reacção

0 = resultado negativo

? = reacção não praticada ou de resultado não conhecido

QUADRO No. 1

SÓROS EXAMINADOS	ANTIGENO N.º 105 A preparado em 25/VII/30								ANTIGENO N.º 109 A preparado em 27/4/32			
	Reacções em 30/VII/30 e 26/VIII/30				Reacções em 27/IV/32				Reacções em 27/IV/32			
	Leitura imedida		Leitura após 24 hs.		Leitura imedida		Leitura após 24 hs.		Leitura imedida		Leitura após 24 hs.	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
P. F. N. convalescente de febre amarella.	4	4	4	4	4	4	4	4	—	—	—	—
Rio, caso extr. (27/I/30) não confirmado.	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio, caso 91 (14/II/30).	4	3	3	2	4	4	4	3	4	4	3	2
Rio, caso 84 (19/II/30).	4	4	3	3	3	—	1	—	4	4	3	2
Rio, caso 62 (19/II/30).	+	0	0	0	1	2	0	+	2	1	+	0
Rio, caso 102 (4/II/30).	4	3	3	2	—	—	—	—	4	4	3	2
Rio, caso 32 (29/I/30).	4	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4
Bahia, caso 46	3	2	2	1	4	4	4	4	4	3	4	3
Bahia, caso 51	4	3	3	2	4	4	4	4	4	4	4	4
Bahia, caso 71	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4
Bahia, caso 92	4	3	3	2	4	4	4	3	4	4	4	4
Bahia, caso 67 $\oplus$	3	2	2	1	4	3	3	2	4	4	4	3
Rhesus 104 (11/VIII/30).	4	4	4	4	4	4	4	3	—	—	—	—
Rhesus 77 (13/XI/29).	4	4	4	3	4	4	4	4	—	—	—	—
Rhesus 121 (29/VIII/31).	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4
Rhesus 112 (28/ 8/30).	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4
Rhesus 57 (17/X/29).	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
Rhesus 32 (12/XI/29).	4	3	3	2	2	—	1	—	4	3	3	2
Rhesus 114 (18/VIII/00).	4	4	4	3	4	3	3	2	4	4	4	4
Rhesus 62 (6/VIII/29) $\oplus$	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4
Rhesus 122 (21/VIII/30).	3	2	2	1	3	3	1	2	4	4	2	3
Cobaia 654 — Typho exanthematico.	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
Coelho 23 — Typho exanthematico	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhesus 9 — Typho exanthematico	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0

4 = + + + +

2 = + +

+ = duvidoso

 $\oplus$

= com estes sôros as reacções primitivas foram praticadas com o antige-

3 = + + +

1 = +

0 = negativo

no No. 102 A.

— = não foi feita a reacção

As reacções variaram em graus, do positivo intenso ao fraco. E' de crer que os soros que mostravam resultados fracos tenham sido colhidos em períodos um tanto precoces, existindo os anticorpos fixadores em quantidade insufficiente para provocar o phenomeno da fixação total do complemento.

Pelas observações que temos colhido, os resultados mais intensos têm sido obtidos com soros de doentes sangrados a partir de 20 a 40 dias após a queda da temperatura. Não podemos, entretanto, precisar definitivamente o periodo optimo da sangria, por isso que não nos foi dado até agora acompanhar no homem, nas differentes phases da infecção, a evolução dos anticorpos fixadores do complemento. Nos *rhesus* infectados experimentalmente, sangrados entre 10 e 30 dias após a inoculação do virus, os resultados francamente positivos se mostram na porcentagem de 88,4% e nos sangrados entre 31 e 70 dias obtem-se 100 %, para depois decrescer a 36,3 % nos sangrados mais de um anno após a inoculação do virus. No homem, é de crer que a evolução dos anticorpos fixadores soffra a mesma marcha decrescente, para depois, talvez, se estabilizar, sob determinado teor (dependendo da propria infecção), conforme acontece com os anticorpos protectores, revelados pela immunidad adquirida.

Pelos dados que foi possivel colher, enviados pelo dr. Mazza, presume-se que o soro do doente 3, com resultado fraco (++) , tenha sido colhido aos 14 dias da doença; o caso 11, francamente positivo (+++), na convalescença (?); o caso 12, positivo (+++), aos 40 dias; o caso 18, positivo fraco (++) , na convalescença (?); quanto aos demais não temos outras informações. Seriam necessarios dados mais minuciosos a esse respeito para que ficasse esclarecido definitivamente o periodo optimo em que se deve praticar a sangria.

Em conclusão, a noção a tirar destes resultados, embora em numero reduzido, é que a reacção se presta sobretudo para o diagnostico retrospectivo da febre amarella, servindo como uma prova a mais para firmar o diagnostico desta infecção e elucidação de novos focos.

Um outro ponto para o qual queremos mais uma vez chamar a attenção é o da technica. Os elementos da reacção devem ser rigorosamente doseados e em especial o complemento que deve ser addicionado na dose optima, principalmente nos casos em que se presume a presença de anticorpos em pequena quantidade, o que se verifica nas sangrias precoces. Nestes casos, a reacção deve ser ensaiada com o complemento addicionado na unidade complementar justa ou ligeiramente accrescida, pois só assim as reacções fracamente positivas poderão ser apreciadas. A leitura dos resultados deve ser feita em 2 tempos: 1.^a — 10 minutos após a hemolyse completa, no tubo testemunha do soro; 2.^a — cerca de 8 a 10 horas de permanencia no *frigo*, não sendo conveniente prolongar em demasia essa segunda leitura.

A reacção bem executada pode dar informações de grande utilidade pratica.

RESUMO

A reacção de fixação do complemento effectuada em uma serie de soros de doentes de febre amarella provenientes de Santa-Cruz de la Sierra, Bolivia, deu resultados que variaram em graus do fraco ao forte e pareciam estar na dependencia do teor de anticorpos fixadores presentes no sangue por occasião da sangria. Conforme se deduz das observações já colhidas, as reacções mais accentuadas se verificam a partir dos 20 a 40 dias após a queda da temperatura, não tendo sido, entretanto, até agora estabelecido definitivamente esse ponto optimo, ponto em que os anticorpos amarillicos fixadores do complemento se encontrem mais abundantemente no sangue. Provavelmente o inicio de sua formação se processaria desde o final da infecção, elevando-se na convalescência, attingindo um maximo, para depois decrescer, como acontece nos *rhesus* e estabilizando-se talvez sob terminado teor, conforme ocorre com os anticorpos protectores, indice verificavel da immunidad adquirida pelo individuo. Este modo de ver justifica-se pela percentagem de resultados positivos obtidos com soros de individuos residentes em zonas onde o mal se tem mostrado endemico.

Os resultados da reacção de fixação do complemento com os soros examinados concordaram, em geral, com os da prova de protecção, servindo a reacção como um meio para o diagnostico retrospectivo da febre amarella e tambem para a elucidação de novos focos da infecção.

Na realização daquella prova deve-se dar especial attenção ao doseamento dos elementos que entram na reacção, especialmente o complemento, que deve ser addicionado na dose justa, sobretudo nos casos de doentes cujo soro tenha sido colhido nos primeiros dias após a queda da temperatura, nos quaes o teor de anticorpos é quasi sempre pequeno.

ABSTRACT

Complement fixation reaction performed in a series of sera of yellow fever patients from Santa-Cruz de la Sierra, Bolivia, yielded results varying from weakly positive to highly positive apparently depending on the rate at which the specific antibodies were present in the blood at the bleeding time.

The reactions appear to be more marked with sera taken after 20 to 40 days since the drop of temperature; the optimum period for bleeding, however, has not yet been established.

Probably such antibodies begin their appearance since the end of the fever itself and raise during the convalescence, first reaching a maximum only to decrease afterwards and become stabilized at a certain rate as found with the

protecting antibodies which serve as an indication for acquired immunity. This opinion seems to be justified by the percentage of positive reactions obtained with sera of persons living in localities where yellow fever has been endemic.

The results of the complement fixation reaction performed with the 11 samples of sera received from Santa-Cruz de la Sierra, Bolivia, through Dr. S. Mazza, of Buenos Aires, agreed in general with those of the protection tests independently conducted by Dr. N. Davis, at his laboratory, in Bahia. Therefore, that reaction may be used as a means both of establishing the retrospective diagnosis of yellow fever and of tracing new foci of this infection.

The complement fixation reaction must be conscientiously performed especial attention been given to all of the elements used, particularly the complement, which must be added in the right dose. This precaution is essential in dealing with sera that have been secured during the first days following the drop of temperature, when the rate of antibodies is still low.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos & J. Travassos* — C. R. Soc. Biol. CIV (21):697.1930; Brasil-Medico XLV (12):288.1931; Sexta Reunion Soc. Arg. Path. Reg. del Norte, Salta, Oct. 1930; Mem. Inst. Butantan V:173.1930.
2. *Mazza, Salvador* — Univ. Buenos Ayres, Mision de Estudios de Pat. Reg. Arg., Jujuy, Publicación No. 9, 1932.
3. *Monteiro, J. Lemos & J. Travassos* — Brasil-Medico XLVI(27):597.1932.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado á 4a Reunião da Assoc. Med. Pan-Americana (Dallas, Estados Unidos) em março de 1933 e á Soc. Med. & Cir. S. Paulo, em I-VI de 1933. Dado á publicidade in Bol. Soc. Med. & Cir. S. Paulo XVII:14. 1933 et Brasil Medico XLVII (17):290.1933).