

DIAGNOSTICO SOROLOGICO DA FEBRE AMARELLA

SOBRE A REACÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

POR

J. LEMOS MONTEIRO E J. TRAVASSOS

PRIMEIRA NOTA

Considerações geraes

O ultimo surto epidemico de febre amarella verificado na capital do paiz, deu ensejo a que, entre nós, se realizassem varios trabalhos experimentaes, alguns dos quaes repousam sobre bases de grande rigor scientifico.

Da confirmação das experiencias de Stokes, Bauer e Hudson sobre a receptividade do *Macacus rhesus* ao virus, passaram os nossos pesquisadores a varios outros problemas ainda obscuros no capitulo da febre amarella, sendo já bem avultado o numero de trabalhos executados a respeito, nos varios estabelecimentos scientificos brasileiros.

Um dos pontos mais estudados, por sua capital importancia, foi, sem duvida, o do diagnostico e, por isso, os esforços convergiram para a aquisição de um methodo biologico que fornecesse, por si só, elemento seguro para o seu estabelecimento o mais precocemente possivel. E', com effeito, desse diagnostico precoce que mais necessita o hygienista, por isso que, sendo a phase infectante da doença limitada aos tres primeiros dias da molestia, melhores resultados para o exterminio do fóco serão colhidos quanto mais cedo se realizarem as medidas prophylacticas.

No particular visado já temos alguns elementos que, quando presentes, poderão servir de complemento á symptomatologia clinica inicial. Afóra a albuminuria precoce, já de longo tempo conhecida, a diminuição do poder alexico do sôro e da coagulabilidade do plasma, foram, das aquisições ultimas, as que, com mais frequencia, têm sido postas em evidencia desde o periodo inicial do mal. Os demais methodos biologicos baseados na pesquisa de anticorpos (agglutininas collateraes, anticorpos fixadores do complemento), vêm a seguir, podendo prestar

auxilios em periodo mais adeantado da doença e para a verificação de convalescentes.

A prova da infectuosidade do sangue do doente em relação ao *Macacus rhesus*, embora de resultados tardios e dispendiosa, deve ser executada, sempre que for possivel, mormente nos primeiros casos do apparecimento do mal, pois, dentre as demais, quando positiva, é a unica fiel.

Se o desfecho clinico é a morte, a histologia pathologica confirma ou infirma o diagnostico, com a verificação do conjuncto de lesões que se convencionou chamar de signal de Rocha Lima. Na convalescença ou depois da cura clinica do doente, só se poderão colher elementos para o diagnostico com os methodos que visam a pesquisa dos anticorpos no sangue ou com a prova do poder protector do soro. Infelizmente, esta ultima, para ser prova fiel, necessita não só de um virus sufficientemente activo para o *rhesus*, como de ser realizada em varios animaes e respectivas testemunhas, o que a torna dispendiosa (*).

As provas baseadas na pesquisa dos anticorpos, alem de serem especificas e facilmente realizaveis, reduziriam a questão a uma simples manipulação de laboratorio, com grandes vantagens e real proveito pratico.

Essas vantagens praticas, alem de outras, como seja a aquisição de mais uma prova para a verificação da identidade dos virus africano e americano, já demonstrada por Theiler, Sellards e Watson, Hudson, Bauer e Philip, por Aragão e por um de nós, justificariam a tentativa de novas pesquisas experimentaes em torno do assumpto.

O poder protector do soro de convalescentes de febre amarella, já assignalado por Marchoux, Salimbeni e Simond em o seu trabalho de 1903, provado experimentalmente por Hudson, Bauer e Philip e entre nós por Aragão, mostrava-nos que não seria impossivel a pesquisa de anticorpos nesses soros, mesmo usados os methodos de que actualmente dispomos para essa ordem de investigações. A pesquisa que realizámos, de agglutininas não especificas, para certo *Corynebacterium*, abriu-nos o caminho e falou desde logo a favor dessa possibilidade. Por isso é que, numa outra ordem de estudos, nos propusemos a pesquisar os anticorpos especificos fixadores do complemento nos soros de doentes, convalescentes e de individuos clinicamente curados do mal e ainda nos soros dos *M. rhesus* inoculados com o virus amarillico, afim de verificar se colheriamos dados que pudessem ser uteis. A maior difficuldade a resolver estava no preparo do antigeno a usar na reacção. Sabendo-se com segurança que o virus

(*) Na segunda parte deste trabalho (2.^a nota), discutimos o valor desta prova, em virtude dos resultados obtidos com soros de individuos naturalmente (?) immunizados (residentes em zonas endemicas do mal) e possuidores de anti-corpos fixadores do complemento.

se encontra principalmente no figado, este orgam deveria ser o escolhido para o preparo do antigeno.

Em pesquisas preliminares empregamos os antigenos salinos phenolados, formolados e chloroformados, usados nos solutos vaccinantes, sem que obtivessemos qualquer resultado animador, o que vem confirmar as verificações de Aragão e outros. Usámos, de identico modo, o sangue do macaco infectado, colhido em franca reacção febril, com os mesmos resultados. Passámos aos cocto-antigenos, ultimamente aconselhados por Moses, preparados conforme a technica descripta por Krause e Takaki, mas, a despeito de termos obtido fixações ligeiras com os sôros especificos, os resultados finaes não foram apreciaveis.

Tratando-se de uma doença de agente etiologico desconhecido, que se incluye na classe dos virus filtraveis, procurámos entre as suas similares uma em que a prova da fixação do complemento tivesse dado melhores resultados para termos, assim, elementos de orientação em nossos estudos preliminares. No particular, chamaram-nos a attenção as pesquisas de Ciuca, na febre aphtosa, demonstrando que um bom antigeno era conseguido pela maceração septica do epithelio das vesiculas, cujo poder altamente infectuoso já tinha sido provado pelas pesquisas de Vallée, Carré e Rinjard. Por tal processo tratava-se de obter as substancias advindas da desintegração cellular por um processo de autolyse e, talvez mesmo, uma modificação do estado colloidal das proteínas que, segundo Ciuca, offereciam desta maneira menor embaraço á reacção de fixação do complemento do que quando em suas primitivas condições. Essas vantagens, no entanto, a nosso ver, eram algo embaraçadas pela presença e cultivo de germes de nenhuma relação com o mal e cuja actividade biologica seria aproveitada na desintegração tissular, indo formar antigenos outros, que agiriam sob a influencia de determinados sôros e em condições especiaes. Obteriamos, desse modo, antigenos collateraes de que nos fallam Schultz, Bullock e Lawrence.

As investigações de Hindle (2), mostrando que se póde obter uma maior quantidade de virus dos figados de animaes infectados provocando-se o rompimento cellular por differença de pressão osmotica, deu-nos orientação para a technica do preparo de um antigeno, que teria provavelmente as qualidades essenciaes do de Ciuca, com a vantagem de reduzir as affinidades collateraes. A desintegração cellular, realizada assim por um processo physico-chimico, permittiria obter em solução o conteúdo cellular e com elle a substancia antigenica.

Frobisher Jor., com orientação identica, conseguira já resultados animadores.

Technica para o preparo do antigeno

Para o preparo do antigeno procedemos do seguinte modo: figado de *Macacus rhesus* infectado pelo virus africano (amostra da raça Asibi), colhido por ocasião da necropsia realizada logo após a queda da temperatura e sacrificio do animal, é pesado, cortado em pequenas fatias de 2 a 3 millimetros de espessura e lavado em agua physiologica renovada por varias vezes. A ultima porção

da agua de lavagem é decantada e os fragmentos do orgam são collocados em um almofariz e triturados com areia esteril. Para cada gramma de figado addiciona-se 1 cc. de uma solução esterilizada hypertonica e de titulo conhecido de chloreto de sodio (usamos a 10 %); mistura-se bem e deixa-se 24 horas no *frigo* em um frasco com rolha de esmeril, esterilizado e contendo perolas de vidro. Junta-se, então, agua destillada esterilizada em quantidade tal, que reduza a 8,5 por mil a concentração final do chloreto de sodio no soluto salino empregado. Junta-se a quantidade de agua á emulsão de figado rapidamente e agita-se o frasco o mais energicamente possivel por espaço de 1 hora. Centrifuga-se ou filtra-se em papel e depois em vela Mandler, de 14 libras de pressão. O filtrado, que guarda uma côr amarellada, é distribuido asepticamente em empolas estereis, e, semeado em meios aerobios e anaerobios, deve mostrar-se completamente desprovido de germes, constituindo o antigeno, que é conservado no *frigo*.

Ensaaios preliminares

Procurando verificar a acção anti-complementar desse antigeno, observámos que elle é totalmente desprovido dessa propriedade desde a dose de 0,5 cc., em face de 2 unidades complementares. Nessa mesma quantidade é desprovido de acção hemolytica, isoladamente ou em face de um sôro.

Em um primeiro ensaio experimentámos o antigeno assim preparado na dose de 0,2 cc. com um sôro de convalescente de febre amarella, com um de um *rhesus* que resistiu á infecção e um outro humano, de individuo normal e que sempre residiu em zona indemne do mal. Em face de 2 unidades complementares, os 2 primeiros sôros ensaiados fixaram o complemento; o do individuo normal, immediatamente após a hemolyse do testemunha do sôro, mostrou uma fixação ligeira e 3 minutos após já estava totalmente hemolysado. Esse primeiro ensaio estimulou-nos a proseguir nas pesquisas, pelo que desde logo procurámos estabelecer a unidade antigenica. Para isso, ensaiámos com o sôro de P. F. N., convalescente de febre amarella, cujo resultado anterior fora perfeitamente satisfactorio: verificámos que 0,05 cc. era a dóse minima de antigeno necessaria para que, em face de 2 unidades complementares, houvesse completa fixação do complemento, a leitura sendo feita 10 minutos após o apparecimento de hemolyse total no testemunha do sôro.

Procurando, em seguida, outras propriedades desse mesmo sôro em face do antigeno, notámos o phenomeno da precipitação, sómente no tubo em que os dois elementos se encontravam em partes iguaes, emquanto que nos demais, com doses menores de antigeno, nada observámos. Com o sôro normal, testemunha, conservados os elementos na mesma quantidade, nenhum precipitado foi verificado, mostrando-se o liquido perfeitamente claro. Esses ensaios levaram-nos a usar em nossos estudos o sôro a examinar e o antigeno, em partes eguaes.

Outros elementos da reacção

Os varios outros elementos constantes da reacção foram assim preparados:

Sôro a examinar - Os primeiros sôros que examinámos, de doentes e *rhesus* infectados pelo virus africano, vinham sendo conservados em empolas e no *frigo*; muitos delles mesmo aquecidos a 55° mostraram-se anti-complementares. Os demais sôros, colhidos quando já estavamos em trabalho sobre o assumpto e quando não eram utilizados logo no dia immediato, soffriam um aquecimento previo de 15 minutos a 55°. No dia em que praticavamos as reacções, todos os sôros eram aquecidos. Em alguns desses sôros notamos uma hemolyse rapida, já perfectamente visivel em 10-15 minutos. Em outros, ao contrario, era tardia, indo até 30 minutos e mais. Essas differenças devem correr por conta das hemolysinas naturaes anti-carneiro que aquelles podem conter. Pensamos, entretanto, que ellas não exercem grande influencia na reacção propriamente dita, pois em alguns sôros, cujo testemunha hemolysava rapidamente com uma e duas unidades complementares, tivemos resultados francos de fixação, usando tres e mesmo quatro unidades complementares. A quantidade de sôro usada nas reacções foi a de 0,2 cc.

Complemento - Tres cobaias (machos) eram sangradas na tarde da vespera. Coagulado o sangue, separava-se o sôro, centrifugava-se e guardava-se no *frigo* até a manhã seguinte, quando era dosado. A dosagem do complemento é assumpto capital nas reacções de fixação. Já é da pratica corrente fazer-se a dosagem em face do antigeno em dóse identica á que se vae usar na reacção. Aconteceu, porem, que o nosso antigeno accelerava a acção da alexina e, de outro lado, contribuia para a formação de um complexo que fixava ligeiramente o complemento, quando em presença de um sôro negativo. Dahi a necessidade de se dosar o complemento em face do antigeno e de um sôro negativo, escolhendo-se de preferencia os de estrangeiros, recentemente chegados ao paiz. Entre esses se seleccionam os que, por si sós, não accelerem demasiadamente o phenomeno da hemolyse. Usámos como unidade complementar a menor quantidade de complemento necessaria para se obter a hemolyse completa dos globulos em meia hora, em face de um sôro negativo, do antigeno e de 3 a 4 unidades hemolyticas.

Systema hemolytico - A hemolysina empregada foi a de coelho anti-carneiro, usada na dóse de tres a quatro unidades hemolyticas. Os globulos de carneiro eram lavados varias vezes e diluidos a 5 %.

Technica da reacção

Sabida que é a possivel fallibilidade deste methodo sorologico nas doenças infectuosas e dada a difficuldade de sua realização em virtude da serie de elementos de maior ou menor variabilidade, com que o pesquisador tem de lidar, somente depois de estabelecida a uniformidade da technica se poderiam colher ensinamentos uteis ao diagnostico. Foi o que procuramos fazer, adoptando, após varios ensaios,

a technica que passamos a expôr, por ser, não só a mais adaptavel ás condições do material com que iniciámos as nossas pesquisas (sôros velhos, conservados no *frigo*), como tambem constante em os seus resultados. E' superponivel á technica de McIntosh Fields para os sôros anti-complementares e basea-se nos mesmos principios do methodo de Browning e McKenzie, Calmette e Massol, etc.

Entre os inconvenientes dessa technica contam-se o uso de maior quantidade de sôro e de complemento, e ainda a difficuldade na leitura quando se trabalha com muitos sôros a um só tempo. No nosso caso, porém, estas desvantagens tornam-se nullas, por isso que as duas primeiras são perfeitamente sanaveis, o mesmo acontecendo quanto á difficuldade na leitura, pois poucas seriam as vezes em que teriamos de examinar muitos sôros a um só tempo. Por outro lado, as vantagens que nos poderiam advir de seu character estrictamente quantitativo e da possibilidade de examinar sôros providos de propriedades anti-complementares, como era o nosso caso, superavam os obstaculos por ventura esperados. Eis porque a adoptamos.

A technica consiste no seguinte: a uma mesma quantidade de sôro a examinar (0,2 cc.) e de antigeno (0,2 cc.), adicionam-se quantidades crescentes de complemento, avaliadas por unidades e completa-se o volume para 1,5 cc. com agua physiologica, pondo-se os tubos em banho maria a 37°-38° durante 1 ½ hora. A cada tubo da reacção deve corresponder um testemunha do sôro, com identica quantidade de unidades complementares. O tempo de incubação da primeira phase tem uma certa importancia no resultado final da reacção. As nossas observações demonstraram que elle deve ser de 1 ½ - 2 horas a 37°, de 3 a 4 horas á temperatura ambiente e de uma noite a 10° (na geladeira).

As hematias, sensibilizadas com 3 a 4 unidades hemolyticas, são adicionadas, na segunda phase da reacção, num volume de 1 cc., seguindo-se nova incubação. Concomitantemente fazem-se tubos testemunhas com sôros seguramente negativos e positivos, obedecendo o mesmo criterio de numero crescente de unidades complementares.

A leitura immediata da reacção deverá fazer-se 10 minutos depois que os testemunhas preparados com os sôros negativos apresentarem hemolyse completa. Os testemunhas dos sôros a examinar (sem antigeno), orientarão o tecnico sobre a capacidade anti-complementar do sôro e sobre a possibilidade de poder ou não ser realizada a leitura no tempo indicado acima, devendo, de accordo com a marcha da reacção, ser prolongado o periodo de incubação. De qualquer modo, deve fazer-se uma leitura tardia, isto é, 24 horas depois e quando os tubos são conservados na geladeira.

Para a avaliação da intensidade da reacção, tomamos como norma o comportamento do segundo tubo em deante, isto é, o resultado de 2, 3, 4 e 5 unidades complementares, no caso de o sôro não mostrar impedimento. Nos sôros anti-complementares, o resultado nos é dado por differença do grau de hemolyse e só deverão ser tomadas em consideração as grandes differenças, entre os tubos teste-

munhas do soro e da reacção propriamente dita, sendo a leitura feita após meia hora de incubação.

O esquema seguinte, figurada a hypothese de a unidade complementar ser 0,3 cc., dará uma idéa da reacção:

TUBO	Soro a examinar	Antígeno	Complemento diluido		Salina a 8,50/100	1 1/2 a 2 horas em banho maria a 37°-38°	Globulos a 5% sensibilizados com 3 a 4 unidades hemolyticas	Incubação segundo comportamento dos testemunhas
			Unidades complementares	Quantidade				
Tubo reacção .	0.2	0.2	1	0.3	0.8	1 1/2 a 2 horas em banho maria a 37°-38°	1 cc.	Incubação segundo comportamento dos testemunhas
Test. soro . .	0.2	—		0.3	1.0		1 cc.	
Tubo reacção .	0.2	0.2	2	0.6	0.5	1 1/2 a 2 horas em banho maria a 37°-38°	1 cc.	
Test. soro . .	0.2	—		0.6	0.7		1 cc.	
Tubo reacção .	0.2	0.2	3	0.9	0.2	1 1/2 a 2 horas em banho maria a 37°-38°	1 cc.	
Test. soro . .	0.2	—		0.9	0.4		1 cc.	
Tubo reacção .	0.2	0.2	4	1.2	—	1 1/2 a 2 horas em banho maria a 37°-38°	1 cc.	
Test. soro . .	0.2	—		1.2	0.1		1 cc.	
	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.		etc.	

Uma serie identica será feita para os testemunhas, positivo e negativo, da reacção. Para o primeiro, poderá ser empregado um soro de convalescentes de febre amarella ou de um *rhesus* immunizado; para o segundo, devem ser preferidos os de estrangeiros recentemente chegados ao paiz.

Resultados experimentaes

Praticamos a reacção com soros de doentes e convalescentes de febre amarella, de *Macacus rhesus* infectados e immunizados, de doentes de outras infecções, de individuos normaes, residentes ou não em zonas onde a febre amarella tem existido e, finalmente, com soros de estrangeiros recentemente chegados ao paiz.

O quadro abaixo resume os resultados e percentagens até agora obtidos:

Sôros de	Resultados		Observações
	Positivos	Negativos	
Casos de febre amarella e convalescentes	81,8	18,1	O n.º de sôros examinados foi reduzido (11). Outros se mostram anti-complementares.
Rhesus infectados e immunizados	95,8	4,1	Nos rhesus infectados a reacção mostra-se positiva desde o quarto dia.
Doentes de outras infecções .	14,5	85,4	Febre typhoide (com Widal positivo); doentes febris (com Widal negativo); typho exanthematico (Weil-Felix positivo) e syphilis (Wassermann positivo).
Nacionaes normaes residentes ou não em zonas onde tem havido febre amarella (*)	28,9	71,0	Residentes em S. Paulo, alguns tendo vivido no norte do paiz; de pessoas residentes na Bahia.
Extrangeiros recém-chegados ao paiz	0	100	Lithuanos e japoneses chegados em Santos na vespera da colheita do sangue.

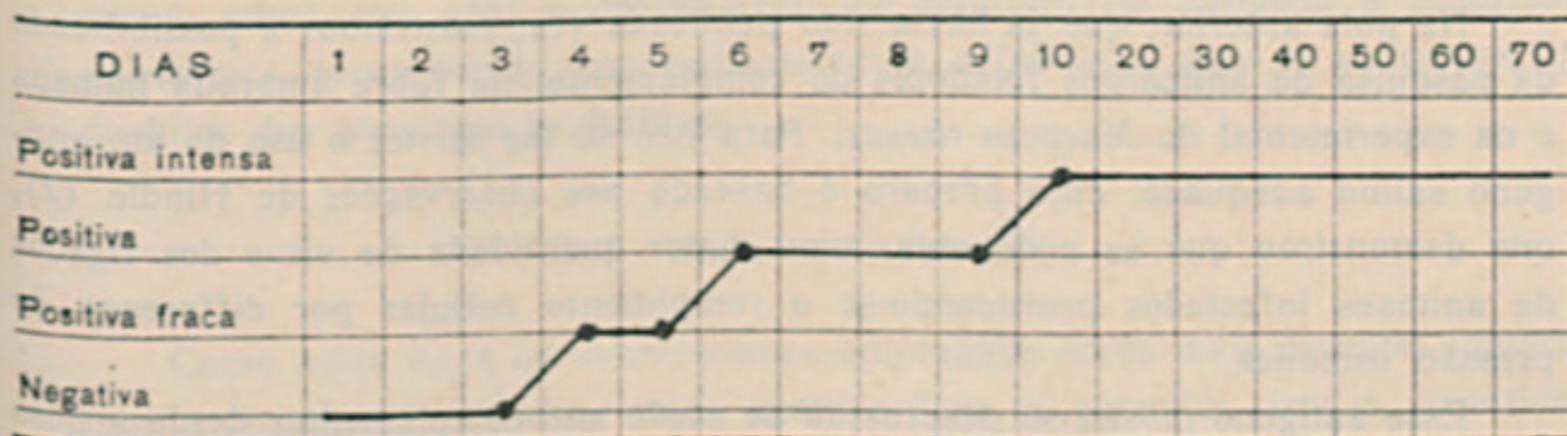
A simples vista do quadro acima dá-nos uma idéa da especificidade e sensibilidade da reacção e da possibilidade das indicações que poderá fornecer.

Quando iniciámos os nossos estudos sobre a fixação do complemento na febre amarella, já declinava francamente o surto epidemico verificado na capital do paiz e, por isto, poucos foram os sôros conseguidos para a nossa reacção. Os que tinham sidos guardados no *frigo*, mostravam-se na maioria anticomplementares, motivo por que 9 desses sôros foram inutilizados. Como não pudemos dispor de sôros colhidos em dias seguidos durante a evolução do mal, não conseguimos determinar em relação á infecção humana, desde quando a reacção começa a mostrar-se positiva. A quasi totalidade de sôros de amarellentos, por nós examinados, provinha de convalescentes e nos havia sido fornecida pelo dr. H. Aragão.

No que diz respeito á febre amarella experimental, tivemos oportunidade de examinar sôros de 25 *rhesus*, tendo sido possivel acompanhar a evolução da reacção. Somente após o 4.º dia é que se puderam obter fixações do complemento, de pequena intensidade, augmentando gradativamente no 6.º e no 10.º dia.

(*) Para o estudo destes sôros, muito devemos á gentileza do Dr. Eduardo Araujo, director do Instit. Oswaldo Cruz da Bahia, que nos enviou 100 sôros de pessoas residentes em Salvador. Neste numero estão incluidos sôros de extrangeiros, geralmente portugueses, porém residentes ha annos na capital bahiana. Não foram ainda todos estudados, o que está sendo feito, de modo que a estatística publicada poderá ser alterada em futuras publicações. Sôros de nacionaes residentes em zona indemne, colhidos de pessoas que nunca sahiram de S. Paulo, foram todos negativos.

O graphico abaixo dá uma idéa da marcha da reacção na infecção experimental.



Nos doentes de outras infecções, cuja percentagem de resultados positivos se elevou a 14,5 devemos levar em conta que se tratava, na maioria, de nacionaes. Com effeito, é possível que alguns nacionaes cujo sôro foi ensaiado, apresentassem relativa immuniidade pelo facto de talvez terem residido em antigos focos da infecção. Isto é tanto mais verdade quanto ficou apurado que, entre as pessoas ainda residentes em zonas endemicas, a percentagem de positivos se elevou a quasi 30 %.

De 20 sôros de estrangeiros examinados, lithuanos e japoneses, recémchegados ao paiz (24 horas antes), não obtivemos nenhum resultado positivo.

Frobisher Jor. (3), trabalhando sob os auspicios da Fundação Rockefeller de New York e baseado, como nós, na observação de Hindle, preparou o seu antigeno salino, provocando, pela differença de pressão osmotica, a ruptura das células hepaticas contendo o virus. Os seus resultados concordam com os que obtivemos.

Pelos resultados acima descriptos, verifica-se que a reacção apresenta especificidade em relação á febre amarella humana e experimental, mostrando tambem a identidade dos virus africano e americano. Ella poderá servir igualmente para a verificação da immuniidade de pessoas, principalmente nacionaes, residentes em zonas onde o mal tenha existido.

Para maior facilidade de preparação do antigeno pelos laboratorios não especializados, pensamos que poderia ser utilizado o material secco e conservado no vacuo e no *frigo*.

As nossas experiencias realizadas com antigeno salino de figado secco, preparado sob a mesma technica descripta acima, demonstram essa possibilidade, se bem que os resultados sejam muito inferiores.

SEGUNDA NOTA

Na nota anterior, que já havia sido publicada (1), mostrámos a possibilidade da pesquisa de anticorpos fixadores do complemento, na febre amarella humana e na experimental do *Macacus rhesus*. Para isso se faz mister o uso de um antigeno salino adequado, cujo preparo é baseado nas observações de Hindle (2), que demonstrou que se póde obter uma maior quantidade de virus dos figados de animaes infectados provocando-se o rompimento cellular por differença de pressão osmotica.

Esse antigeno mostra-se desprovido de acção anti-complementar desde a dóse de 0,5 cc. em presença de 2 unidades complementares, bem como de acção hemolytica, isoladamente ou em face de um sôro. Como tivéssemos trabalhado com sôros antigos, conservados em empolas no *frigo*, mostrando-se muitos delles com elevado poder anti-complementar, fomos obrigados a usar uma technica (a de McIntosh Fields) que nos permittiu fazer as leituras com segurança.

Os resultados das reacções effectuadas até então, com sôros diversos, foram dados em resumo na nota anterior e concordavam com os de Frobisher Jor. (3) que os expoz em um trabalho publicado antes do nosso.

Agora daremos os resultados dos ensaios que realizámos posteriormente. Além de pequenas modificações de technica, tivemos a oportunidade de estudar mais alguns sôros de individuos que tiveram febre amarella no ultimo surto epidemico do Rio de Janeiro, e de proceder um maior numero de verificações, seja no decurso da infecção experimental do *Macacus rhesus*, seja em sôros de nacionaes residentes em localidades como a Bahia, onde a febre amarella parece existir endemicamente. Emfim, effectuámos algumas provas de protecção do *rhesus* com sôros que nos deram resultados positivos, conforme exporemos em seguida.

Novas verificações sobre o preparo do antigeno

São as seguintes as observações realizadas:

a) Segundo fez Frobisher Jor., pode-se empregar uma solução hypertonica de chloreto de sodio a 8,5 %, o que tem a vantagem de facilitar o calculo;

b) As nossas experiencias demonstraram que não ha maior vantagem em filtrar o antigeno em vela, mas sim em passal-o simplesmente em papel filtro juntando-lhe phenol e guardando-o no *frigo*: assim elle se conserva bem, mostra-se mais activo, permittindo a obtenção de resultados muito nitidos, o que deve correr por conta de uma maior riqueza em virus;

c) Na escolha do material para o preparo do antigeno, deve-se dar preferencia a figados (de *rhesus*) que se mostrem mais attingidos, com a côr camurça disseminada por todo o orgão, convindo sacrificar-se o animal logo após a queda da temperatura e retirar do coração a maior quantidade possivel de sangue para que o figado fique bastante exsangue;

d) Os antigenos preparados com figados seccos, conservados no vacuo e no *frigo*, são muito menos activos;

e) As tentativas que realizámos de extracção da substancia antigenica pelo alcool, ether, etc., têm a desvantagem de imprimir ao antigeno a propriedade polytropica, apresentando, concomitantemente, affinidades para os anticorpos lipoi-dophilos dos sôros dos syphiliticos.

Technica da reacção

Como nesta nova serie tivéssemos empregado sôros mais recentes, empregámos a technica geralmente usada nessa ordem de pesquisa, isto é, quantidades fixas de antigeno (0,2) e de complemento, em face de doses decrescentes de sôro a estudar (0,2 - 0,1 - 0,05 cc.). O complemento, previamente dosado na manhã do dia em que praticavamos as reacções, em presença do antigeno, era usado na dose correspondente a 2 unidades complementares.

Os sôros a pesquisar soffriam um previo aquecimento a 55° antes de serem utilizados na reacção. Para testemunhar o poder anti-complementar do sôro, usámos a dose de 0,4 cc.. A hemolysina era empregada na dose de 3 a 4 unidades e as hematias de carneiro, em suspensão a 5 %. Volume total de 2,5 cc..

A 1.ª incubação durava 1 1/2 a 2 horas e a segunda, apenas 1/2 hora. Fizemos sempre uma leitura immediata e uma outra após uma noite na geleira, de sorte que os resultados expostos neste trabalho são baseados sempre na ultima leitura.

Os sôros que se mostraram anti-complementares foram posteriormente ensaiados segundo a technica que expusémos em nossa 1.ª nota.

Damos a seguir os resultados obtidos com sôros diversos, empregando um antigeno preparado com as modificações acima. Por elles se poderá ter idéa do valor pratico do methodo e, para que isto melhor se evidencie, os sôros são separados em diferentes grupos, de accordo com sua procedencia.

Resultados obtidos na febre amarella humana

Conforme assignalámos no 1.º trabalho, quando iniciámos os nossos estudos sobre a fixação do complemento na febre amarella já declinava francamente o surto epidemico verificado na Capital do paiz e, por isto, poucos foram os sôros que conseguimos estudar. Os que tinham sido guardados no *frigo*, quasi todos em diminuta quantidade, mostraram-se, na maioria, francamente anti-complementares, motivo por que 9 dentre elles foram regeitados.

Como não conseguimos soros colhidos em dias seguidos durante a evolução do mal, não pode ser determinado, em relação á infecção humana, o periodo em que a reacção começa a apresentar resultados positivos nos casos confirmados

da molestia. A quasi totalidade dos sôros examinados provinha de convalescentes e de pessoas immunes; as amostras do 1.º grupo foram-nos enviadas pelo Dr. Henrique Aragão, do Instituto Oswaldo Cruz e as do 2.º foram colhidas por pessoa indicada pelo Dr. J. Barros Barreto, do Departamento Nacional de Saúde Publica. A estes distinctos collegas apresentamos aqui nossos agradecimentos.

O quadro abaixo resume os resultados obtidos:

Sôros de	Negativos	Positivos fracos	Positivos fortes	
Suspeitos, diagnostico não confirmado	3	0	1	No de resultado positivo, a necroscopia revelou im-paludismo.
Febre amarella (diagnostico clinico)	1	2	0	
Convalescentes	0	1	4	
Após 4 a 20 mezes da infecção	1	3	11	

Resultados na febre amarella experimental do *Macacus rhesus*

Em nosso trabalho anterior demos os resultados obtidos na febre amarella experimental, segundo estudo feito em 25 *rhesus* no periodo de infecção e já immunizados. Verificámos que os anticorpos fixadores do complemento se mostram em maior quantidade do 10.º dia após a inoculação do virus, perdurando posteriormente pelo menos até o 70.º dia (periodo da pesquisa).

Nesta nova serie de ensaios tivemos a oportunidade de realizar maior numero de verificações, estudando sôros de *rhesus* em varias phases da evolução da doença e de *rhesus* immunizados, datando de mais de 12 mezes a infecção de alguns.

O quadro abaixo resume os resultados até agora obtidos:

<i>Macacus rhesus</i>	Total	Negativos	o/o	Positivos fracos	o/o	Positivos fortes	o/o
Normaes	3	3	100	0	0	0	0
Após 3 a 5 dias	12	7	58,3	5	41,6	0	0
Após 6 a 9 dias	8	3	37,5	4	50,0	1	12,5
Após 10 a 30 dias	26	0	0	3	11,5	23	88,4
Após 31 a 70 dias	5	0	0	0	0	5	100,0
Mais de 1 anno	11	2	18,1	5	45,4	4	36,3

Positivos fracos: reacção + e ++
Positivos fortes: reacção +++ e ++++

Ainda por estes resultados se verifica que, na infecção experimental, a reacção se póde mostrar positiva desde o 4.º dia após a inoculação do virus. Tudo faz crer que os anticorpos fixadores do complemento augmentam, até um certo limite, no organismo do animal, permanecendo, na convalescença e nos immunizados, por largo espaço de tempo e provavelmente decrescendo em seguida.

Do 10.º dia em diante os anticorpos fixadores do complemento já são em grande numero, mas depois de 1 anno parece que vão desaparecendo, apresentando alguns animaes reacções negativas ou fracamente positivas.

Resultados com sôros de pessoas residentes na Bahia

Para o estudo da reacção em material proveniente de individuos normaes, de logares onde a febre amarella tem existido mais ou menos endemicamente, obtivemos por especial gentileza do director do Instituto Oswaldo Cruz da Bahia, Dr. Eduardo Araujo, a quem somos muito gratos pelo auxilio prestado, varios sôros de pessoas residentes em Salvador, capital daquelle Estado.

Em nossa primeira nota apresentámos os resultados percentuaes de alguns (20) desses sôros já examinados por aquella occasião. Agóra damos um estudo completo desses sôros, num total de 67:

Negativos	o/o	Positivos fracos	o/o	Positivos fortes	o/o
34	50,7	13	19,4	20	29,8

Por idade foram os seguintes os resultados percentuaes:

IDADES	Negativos	o/o	Positivos fracos	o/o	Positivos fortes	o/o
De 12 a 20 annos. . .	8	11,9	1	1,5	2	3,0
De 21 a 30 annos. . .	15	22,4	8	11,9	10	14,9
De 31 a 70 annos. . .	11	16,4	4	6,0	8	11,9

De accordo com o sexo, os resultados foram os seguintes:

SEXO	Negativos	o/o	Positivos fracos	o/o	Positivos fortes	o/o
Masculino	18	26,8	5	7,5	11	16,4
Feminino	16	23,9	8	11,9	9	13,4

Resultados com sôros de pessoas residentes em São Paulo

Do Instituto Bacteriologico obtivemos varios sôros de individuos aqui residentes e remettidos áquelle estabelecimento para nelles ser praticada a reacção de Wassermann, cujos resultados nos foram juntamente enviados. Procedémos a reacção de fixação do complemento com antígeno amarillico nesses sôros e

ainda em muitos outros que conseguimos de pessoas que habitam São Paulo ha muitos annos, tendo, entretanto, algumas dellas passado temporadas no Rio de Janeiro. Não pudemos fazer um inquerito satisfactorio de todos, motivo por que damos aqui somente os resultados obtidos:

SOROS	Negativos	o/o	Positivos fracos	o/o	Positivos fortes	o/o
Soros c/ Wassermann + + + + .	7	87,5	1	12,5	0	0
Soros c/ Wassermann negativo .	16	80,0	3	15,0	1	5,0
Diversos	19	79,1	3	12,5	2	8,3
Média	42	82,2	7	13,3	3	4,5

Resultados com sôros de estrangeiros recém-chegados ao paiz

De 20 sôros estrangeiros examinados, lithuanos e japoneses, recémchegados ao paiz (24 horas antes), não obtivemos nenhum resultado positivo.

Resultados com sôros de outras infecções

Com o intuito de estudar a especificidade do antigeno amarillico, realizámos varias provas em sôros de doentes de febre typhoide, de typho exanthematico e de outras doenças febris.

O quadro abaixo dá os resultados que obtivemos:

Soros de doentes de	Negativos	Positivos fracos	Positivos fortes
Febre typhoide	18	0	2
Typho exanthematico	5	1	0
Doenças febris	13	1	2

Os commentarios que fizemos em nosso primeiro trabalho cabem aqui para a explicação da percentagem, embora pequena, de resultados positivos com sôros de pessoas residentes em S. Paulo e de doentes de outras infecções: taes resultados explicar-se-iam pelo facto de algumas destas pessoas terem, possivelmente, residido em zonas onde a febre amarella haja existido endemicamente, apesar de que não nos foi possivel confirmar esta suspeita que se justifica, em todo caso, pelos resultados com os sôros das pessoas residentes na Bahia.

CONSIDERAÇÕES EM TORNO DO ANTIGENO E DOS ANTICORPOS AMARILlicos

Hadjopoulos e Burbank (4) consideram um antigeno como composto de 2 moléculas dissimilares: a molécula immunogenica, isto é, fracção productora de anticorpos e a molécula immunophilica ou fracção reactiva aos anticorpos. Kol-

mer (5), do mesmo modo, julga necessario discutir o papel de um antigeno sob dois aspectos: em relação á producção de anticorpos e em relação á inter-reacção com anticorpos *in vitro* no que diz com a fixação do complemento.

No caso presente, directamente só poderemos estudar a qualidade antigenica do nosso soluto *in vitro*, isto é, em relação aos anticorpos fixadores do complemento ou, como diria Burbank, á sua fracção immunophilica, por isso que, sendo o nosso antigeno um soluto chimicamente complexo, onde proteínas, lipoides, hydratos de carbono, etc. formam compostos indefinidos ou ainda não estudados, não poderíamos saber a qual destes está ligado o papel de antigeno. Se, com effeito, injectarmos em animaes de especies differentes, em dóses crescentes, o soluto antigenico e, após o preparo do animal, procurarmos no sôro anticorpos fixadores, usando como antigeno o mesmo soluto, é forçoso que os encontraremos, por isso que os complexos proteino-lipoidicos, lipoides livres, e outros, por si sós, independentemente da substancia especifica, são capazes de provocar a formação de anticorpos. Não resta duvida de que o sôro de cavallo inoculado com o virus (figado), que goza, de accordo com as verificações de Pettit e seus collaboradores (6), de poder protector para o *rhesus*, contém anticorpos fixadores do complemento, como se pode verificar no quadro abaixo:

Soros anti-amarillico do	Testemunhas do soro: Unidades complementares				Reacção: Unidades complementares			
	2	3	4	5	2	3	4	5
Instituto Pasteur. . .	+	—	—	—	+++	++	+	—
Instituto Butantan . .	—	—	—	—	++++	+++	++	+

Mas, como poderemos affirmar que esses anticorpos fixadores do complemento são especificos para a porção immunogenica do antigeno, se como antigeno na reacção usamos o mesmo complexo chimico que foi inoculado no animal? Os anticorpos fixadores poderiam ser especificos, tanto para o virus propriamente dito, como para os complexos proteino-lipoides do figado.

Indirectamente, porém, podemos ter a prova de que o nosso antigeno possui a fracção immunogenica: com effeito, dos *rhesus*, inoculados com figados que nos serviram para o preparo do antigeno, alguns ficaram infectados e morreram de febre amarella, outros resistiram á infecção e apresentaram em seu sôro quantidade apreciavel de anticorpos que fixam o complemento em face de um antigeno preparado com o figado de *rhesus* infectado, mas que não o fixam em face de um antigeno preparado com figado de *rhesus* normal, conforme as verificações tambem de Frobisher Jor. Por outro lado, sabe-se que os sôros de *rhesus* immunizados e os de convalescentes de febre amarella gozam da propriedade de proteger os animaes sensiveis contra o virus e, pelas verificações por nós realizadas, esses sôros possuem, em regular quantidade, anticorpos fixadores do complemento. Isso não quer dizer, entretanto, que o poder de protecção corra só por conta dos anticorpos fixadores do complemento, mas que estes dois anticorpos podem exis-

tir concomitantemente, sobretudo no periodo de convalescença, podendo perdurar por periodo mais ou menos longo, sendo os ultimos (os fixadores do complemento) mais facilmente eliminados, conforme as nossas investigações nesse sentido.

O antigeno contém seguramente o virus amarillico, conforme se demonstra pela inoculação do figado, de que foi preparado, em *Macacus rhesus*. Um dos antigenos com que realizámos a maioria das reacções deste trabalho, provinha do *rhesus* 102, cujo virus fora utilizado para inoculação do *rhesus* 105, que teve infecção característica e morte em 5 dias, sendo transferido para o *rhesus* 108 que tambem morreu em 5 dias, após infecção typica, e, assim por diante, através de outras passagens; o *rhesus* 103, inoculado com dose muito reduzida de uma emulsão de figado do mesmo *rhesus* 102, teve apenas reacção febril, resistindo á infecção, mas a reacção praticada então com o seu sôro (apenas 0,05 cc.) deu resultado fortemente positivo (++++).

Por outro lado, poder-se-ia provar indirectamente a existencia da fracção immunogenica no antigeno, pela prova de protecção dos sôros contendo anticorpos fixadores do complemento em relação á infecção experimental. O quadro abaixo mostra esta verificação por nós realizada e o resultado obtido:

Prova de protecção do *Macacus rhesus* com sôros contendo anticorpos fixadores do complemento

Soro de	Resultados da reacção	Animaes de prova	Testemunhas	Resultados da protecção
P. F. N., convalescente de febre amarella.	++++	<i>Rhesus</i> 107, inocul. c/ 2cc. de soro P. F. N., em 21-7-30; inocul. c/ virus (2cc. sangue do <i>rhesus</i> 105), em 22-7-30. Nada de anormal apresentou.	<i>Rhesus</i> 108, inocul. em 22-7-30 c/ virus (2cc. sangue do <i>rhesus</i> 105). Morte em 25-7-30 c/ lesões typicas.	Positivo
O. A. P. Guimarães, normal, residente na Bahia.	++++	<i>Rhesus</i> 120, inocul. em 12-8-30 c/ 2cc. de soro O. A. P. G.; em 13-8-30 inocul. c/ virus (2cc. de sangue <i>rhesus</i> 119). Nada de anormal apresentou.	<i>Rhesus</i> 122, inocul. em 13-8-30 c/ virus (2cc. sangue do <i>rhesus</i> 119). Evolução característica, hypothermia, sacrificado em 21-8-30, apresentando lesões typicas.	Positivo
J. Magalhães, normal, residente na Bahia.	++++	<i>Rhesus</i> 121, inocul. em 12-8-30 c/ 2cc. de soro J. M.; em 13-8-30 inocul. c/ virus (2cc. sangue do <i>rhesus</i> 119). Nada de anormal apresentou.		Positivo

Indirectamente, pois, poderemos provar que no nosso antigeno existe a fracção immunogenica.

Para o estudo da fracção immunophilica basta verificar os resultados das reacções nos sôros dos *rhesus* immunizados, das pessoas convalescentes e das

immunes á febre amarella. A percentagem elevada de resultados positivos dispensa-nos qualquer commentario.

Tratando-se, contudo, de um antigeno chimicamente complexo, não podemos assegurar que este se fixa unicamente ao anticorpo especifico amarillico, por ventura existente nos sôros humanos. A prova realizada nos sôros de estrangeiros recentemente chegados ao paiz que, como se sabe, são os mais sujeitos á infecção, dá-nos margem, entretanto, para julgarmos que o antigeno possui certa especificidade.

DISCUSSÃO E SUMMARIO

As considerações feitas no inicio da nossa 1.^a nota mostram a importancia que apresenta o estabelecimento de um diagnostico sôrologico da febre amarella para a confirmação do diagnostico clinico, nos casos em que este apresenta dificuldades, como acontece no principio das epidemias, nos casos benignos, formas frustras, etc..

Assignalamos tambem as pesquisas que, nesta nova phase do estudo da febre amarella, foram feitas por differentes pesquisadores.

Os resultados obtidos com a reacção de fixação do complemento, com sôros de pessoas convalescentes de febre amarella e de immunes, com sôros de *rhesus* nos varios periodos da infecção, bem demonstram a possibilidade de um diagnostico post-infecção, muitas vezes necessario para comprovar a suspeita de um caso que se revele por uma forma clinica frustra ou susceptivel de confusão com outros estados morbidos. A prova de protecção realizada em *rhesus* é dispendiosa e muitas vezes inacessivel entre nós, por falta de animaes em abundancia.

A reacção de fixação do complemento sendo positiva no decurso ou depois de uma infecção suspeita clinicamente poderá ser discutida, quando se tratar de um nacional residente ou tendo residido em zona em que a febre amarella é endemica. Tratando-se, porém, de um estrangeiro recentemente chegado ao paiz e provindo de região indemne, o resultado positivo parece revelar seguramente a infecção.

Como referimos no decorrer deste trabalho, o antigeno que usamos deve apresentar em sua molecula as fracções immunogenica e immunophilica, o que lhe empresta valor de especificidade, mas não podemos assegurar que nos sôros humanos não existam outros anticorpos, além do especifico ao virus, capazes por sua vez de, em presença deste, fixarem o complemento. As provas de protecção realizadas nos *rhesus* com sôros de nacionaes que apresentavam um resultado fortemente positivo, além dos resultados sempre negativos da reacção em sôros de estrangeiros recentemente chegados ao paiz, falam, entretanto, a favor de uma certa especificidade desses anticorpos. Essas mesmas provas vêm mostrar que tambem ha causa de erro na prova de protecção: tratando-se de um doente, nacional e oriundo de fóco endemico, ella perde o valor, do mesmo modo que a prova de fixação do complemento.

CONCLUSÕES

I. A infecção amarillica, tanto humana como experimental, depois de certo periodo da evolução, na convalescença e nos imunizados, pode ser diagnosticada por uma reacção baseada na fixação do complemento.

II. Para esta reacção o antigeno será preparado com figado de *rhesus* infectado, tratado por processo especial que liberte a maior quantidade possivel do virus. Este antigeno apresenta especificidade e sensibilidade na infecção, tanto humana como experimental.

III. Os sôros de nacionaes residentes em zonas onde o mal é endemico, em proporção de quasi 50 %, contêm anticorpos fixadores do complemento, o que não acontece com os sôros de estrangeiros recémchegados ao paiz.

IV. Conforme se passa com os sôros de convalescentes, os sôros de nacionaes contendo anticorpos fixadores do complemento (reacção com ++++), são capazes de proteger o *Macacus rhesus* em relação á infecção experimental.

V. Tratando-se de sôros de nacionaes oriundos de zonas de endemia amarillica, este facto poderá falsear os resultados da reacção quanto ao diagnostico post-infecção, o que tambem se dará com a simples prova de protecção do *rhesus* pelo sôro de convalescente.

CONCLUSIONS

I. The diagnosis of yellow fever, both human and experimental may be based on the complement fixation reaction made in the course of the infection, in the convalescence and after complete recovery.

II. The antigen for this reaction must be prepared from the liver taken from infected *rhesus* monkeys and ground in a way that may set free as much virus as possible. The antigen thus prepared shows both specificity and sensitiveness to the infection.

III. The sera of natives living in places where the disease is endemic show complement-fixing antibodies in about 50 % of the cases, whilst those of newly arrived foreigners give negative results.

IV. The sera of natives containing complement-fixing antibodies (++++ reactions), like those of convalescents, afford the *rhesus* protection against yellow fever.

V. This indeed may mislead one in the interpretation of the results, should the reaction be made on material from persons living in the endemic zone, but the *rhesus* protection test made with convalescent's serum will act likewise.

REFERENCIAS

- (1) - *Monteiro, J. Lemos e Travassos, J.* — *Brasil Medico* (14):313.1930.
- (2) - *Hindle* — Repr. from *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* XXII(5):405.1929.
- (3) - *Frobisher, Jor.* — Repr. from *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* XXVI:846.1929.
- (4) - *Hadjopoulos e Burbank* — *J. Lab. Clin. Med.* (12):972.1927.
- (5) - *Kolmer* — *Serum diagnosis by complement fixation, 1928* - Philadelphia, Lea & Febiger.
- (6) - *Pettit, Stefanopoulo et Frasey* — *C. R. Soc. Biol.* XCIX(28):1114.1928.

(Trabalho das Secções de Virus e de Immunologia
do Instituto Butantan, terminado em outubro de 1930).