

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA REAÇÃO DE RUBINO

ARRUDA*
CS. ASTOLFI*

RESUMO — São comentados alguns aspectos relativos à reação de Rubino, visando tanto uma melhor identificação dos elementos envolvidos como despertar o interesse dos pesquisadores para esta prova. Os seguintes aspectos são discutidos: 1) influência da temperatura sobre os elementos da reação; 2) correlação entre a reação de Rubino e: a) alterações humorais observadas na hanse-niase, b) imunidade mediada por células; 3) variações na reatividade sorológica; 4) valor prognóstico e erário de cura.

Palavras chave: Reação de Rubino. Hanseníase. Imunidade. Imunidade celular.

As dificuldades encontradas para a obtenção de um antígeno específico do *Mycobacterium leprae* têm sido o grande obstáculo enfrentado pelos pesquisadores para que reações sorológicas possam ser utilizadas no auxílio diagnóstico da hanseníase.

Atualmente, contamos com algumas provas que, se devidamente comprovadas, poderiam servir a este propósito". No entanto, estas técnicas necessitam de aparelhagem e pessoal altamente especializados, o que as inviabiliza para o uso rotineiro na grande maioria dos nossos laboratórios. Neste sentido, a reação de Rubino¹⁰ vem de encontro aos nossos interesses, já que a sua execução é extremamente simples, não requer aparelhagem especial e seu custo é irrisório.

Esta prova consiste na aglutino-sedimentação de hemácias formoladas quando em contato

com soro de pacientes hansenianos. Sua especificidade está amplamente documentada na literatura. A única restrição feita à reação de Rubino refere-se à sua baixa sensibilidade, pois ela só se apresenta positiva quando o diagnóstico já está esclarecido, podendo em certos casos ser negativa até mesmo nessas condições.

Em decorrência disso, são poucos os locais que ainda se preocupam em estudar e aperfeiçoar esta prova. Acreditamos, contudo, que com o avanço tecnológico verificado nesses quase sessenta anos que nos separam da descoberta original de Rubino, essa reação deveria ser investigada novamente, de sorte a ser utilizada em nosso meio.

Na tentativa de despertar novamente a atenção dos investidores para a reação de Rubino, organizamos os dados acumulados durante os anos que com ela trabalhamos.

(*) Biologistas do Hospital Lauro de Souza Lima
Endereço: — Rod. Bauru — Jaú Km. 115 — Caixa Postal 62 — 17.100 Bauru — SP.

Em princípio são desconhecidos os mecanismos e os elementos envolvidos na reação. Marchoux & Caro/ descreveram que o soro positivo aquecido por uma hora a 56°C perde a capacidade de aglutino-sedimentar hemácias formuladas. Em nossos estudos, soros positivos, quando aquecidos a 56°C por até duas horas, não perderam a positividade; ao contrário, a sedimentação das hemácias foi mais intensa, deixando o sobrenadante mais límpido. Quando o soro era aquecido a 60°C durante meia hora, a reação ainda se processava nos tubos de maior concentração de soro (0,5 e 0,25 ml) enquanto que nos tubos de concentração mais baixa (0,1 ml) a reação era negativa. Aquecendo o sorb positivo a 60°C durante uma hora, este perdia sua reatividade.

Trabalhando com "pool" de soros, foi possível verificar que, em condições normais, a reação se processa tanto a 37°C como a 4°C. Como já descrito pelo próprio Rubino, esta reação não ocorre a 56°C, contudo não perde a sua reatividade, pois, recolocado a 37°C a reação se processa normalmente.

Verificou-se também que soros positivos conservados a - 20°C até por um ano não perderam a reatividade.

Deste modo, tanto a conservação do soro como a relativa termo estabilidade apresentada pelo(s) fator(es) Rubino, vêm facilitar o desenvolvimento do seu estudo, dispensando condições especiais de trabalho.

De acordo com Marchoux & Caro⁷ seriam dois os elementos envolvidos na reação: um componente inespecífico, presente inclusive no soro de pessoas normais e, um outro componente específico do soro de pacientes hansenianos. Azevedo & Ferri³ referem que a substância responsável pela reação estaria ligada à fração gamaglobulínica do soro, e Silva¹¹ observou que o sistema imune humoral dos pacientes virchowianos Rubino positivos encontra-se em maior atividade que o dos pacientes Rubino negativos.

A correlação com outras alterações sorológicas que ocorrem na hanseníase foi objeto de estudo anterior² onde pode ser verificada a inexistência de relação entre essa reação e a presença de crioprecipitados, positividade ao VDRL e a presença de proteína Creativa.

Buscando ampliar esses resultados, foram estudados 74 soros de pacientes virchowianos em atividade, dos quais 33 eram Rubino positivos e 41 negativos. Os soros destes pacientes foram analisados quanto à presença ou não de fator reumatóide (Reagente latex FR, Instituto Behring). Os dados encontrados estão sumarizados na Tabela 1 e são indicativos da ausência de correlação entre essas duas provas, isolando mais uma vez a reação de Rubino dos transtornos sorológicos inespecíficos existentes na hanseníase.

Por desconhecer a natureza e os mecanismos envolvidos nessa reação, foi investigada uma possível interdependência entre Al e algumas provas utilizadas na avaliação da competência imune celular. Para isto, estudou-se o comportamento imunológico de 31 pacientes hansenianos Rubino negativos e de 20 pacientes Rubino positivos frente ao PPD (Derivado Protéico Purificado, partida RT-23, fornecido pela Divisão Nacional de Pneumologia, tricofitina (fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz), 2, 4-dinitroclorobenzeno (DNCB) e ao percentual de linfócitos T do sangue periférico.

As reações intradérmicas de leitura tardia foram obtidas injetando-se 0,1 ml do antígeno na face anterior do antebraço: As leituras foram realizadas após 48 horas e avaliadas em milímetros de induração. As respostas obtidas com o PPD foram consideradas positivas quando a induração apresentada era igual ou maior que 10 mm de diâmetro. Quanto à tricofitina, foram consideradas positivas as indurações de 5 mm ou mais de diâmetro.

Para a sensibilidade ativa foi utilizado o 2, 4 - dinitroclorobenzeno (DNCB). Os pacientes foram sensibilizados com a dose de 2.000 mg/ 0,1 ml em acetona. Após 20 dias foram avaliados com dose de 100 mg. As reações foram lidas após 48 horas, de acordo com o seguinte critério:

- = eritema e ausência de induração
- + = eritema e induração mínima
- ++ = eritema e induração acentuada, pequenas vesículas
- +++ = vesículas maiores ou bolhas e ulceração.

O percentual de linfócitos T do sangue periférico foi determinado pela técnica descrita por

Mendes, com algumas modificações⁸. Os linfócitos obtidos por gradientes Ficoll Hypaque a partir de 20ml de sangue heparinizado, foram lavados três vezes em solução de Hanks e ajustados à concentração de 3×10^6 células/ml. Cerca de 0,1 ml desta suspensão foi misturada com igual volume de hemácias de carneiro a 0,5% diluída em NaCl a 0,85%. Após centrifugação (200g/5min.) foram incubadas durante uma hora a 4°C. Decorrido esse tempo, foi adicionada uma gota de azul de metileno, diluído 1:3 em NaCl 0,85%. A percentagem de células formadoras de rosáceas foi determinada microscopicamente, contando-se no mínimo 200 linfócitos. Os resultados são mostrados na Tabela 2. Embora o número de Casos estudados seja pouco representativo; os aspectos celulares que podem ser evidenciados através destas provas, parecem não estar envolvidos na positividade ou não da reação de Rubino.

Curban, procurando possíveis variações da reatividade, a esta prova no soro de pacientes hansenianos, examinou 23 soros no decorrer de quatro anos. Observou que 20 indivíduos mantiveram sua resposta e que três soros, inicialmente positivos, após quatro anos haviam negativado. Descreveu ainda que em alguns casos ocorreu redução da positividade.

Como essa técnica faz parte da rotina do nosso laboratório, pudemos catalogar 157 pacientes que durante quatro anos foram submetidos várias vezes à reação de Rubino. Através desse estudo retrospectivo, pudemos constatar que 54 pacientes Rubino positivos e 94 Rubino negativos não sofreram alterações quanto à reatividade à prova. Sete pacientes Rubino negativos em uma primeira reação, posteriormente positivaram e assim se mantêm inalterados há três anos, enquanto que dois Pacientes inicialmente Rubino positivos se tornaram Rubino negativos. A alta percentagem (94,27%) de constância de resultados credibiliza esta prova, tornando-a perfeitamente reproduzível.

Quanto aos pacientes que apresentaram alterações de reatividade, várias hipóteses podem ser levantadas, considerando que desconhecemos quase que completamente os mecanismos envolvidos na reação. Se se acreditar que ela só se encontra sob o jugo das mesmas leis de aglutinação, como descrito pelo próprio Rubino, ela

seria dependente de um nível ótimo de antígeno e anticorpo. Deste modo, pode-se supor que um desequilíbrio nesse sistema poderia ser o responsável pelas alterações observadas. Isto pode ser observado quando trabalhamos com soros que, de acordo com a metodologia empregada na rotina⁴, são considerados negativos, mas que, com o aumento ou diminuição do volume sorológico, muitos deles se tomam positivos. Tais modificações técnicas, embora aumentando a sensibilidade da prova podem alterar a sua especificidade. Estamos trabalhando nesse sentido e os resultados obtidos serão divulgados posteriormente.

Quando investigamos o comportamento sorológico de pacientes virchowianos inativos frente à essa reação, notamos que em alguns casos a reação se mantém positiva. Pelos estudos efetuados anteriormente^{3,9}, acreditamos que esses pacientes, embora baciloscopicamente negativos pelos critérios empregados rotineiramente, ainda possuam bacilos, aqueles convencionalmente chamados persistentes. Desse modo, a reação de Rubino, mesmo sem sofrer modificações, já nos dá mais um critério para a classificação de um paciente como branqueado. Mas também, neste caso, esbarramos com a baixa sensibilidade da prova pois, da maneira como ela se encontra, seu poder indicativo abrangerá apenas os pacientes que durante o curso da infecção a apresentaram positiva.

A despeito das limitações da reação de Rubino, um outro ensaio foi realizado com a intenção de avaliar o comportamento de indivíduos comunicantes frente a essa reação, e como resultado foi verificada negatividade em todos os soros testados. Todavia, quando aumentamos a concentração sorológica, pudemos observar aglutino-sedimentação das hemácias formoladas em alguns casos. Por este motivo, embora não se tenha segurança da especificidade da reação de Rubino nestas condições, tem-se esperança de que esta, devidamente modificada, poderá vir a ser utilizada tanto em estudos epidemiológicos, como na detecção subclínica da hanseníase.

TABELA 1 Correlação entre a reação de Rubino e a presença de Fator Reumatóide no soro de pacientes virchowianos em atividade.

Fator Reumatóide	Rubino			TOTAL
		+	-	
presente		11	13	24
ausente		22	28	50
TOTAL		33	41	74

TABELA 2 Correlação entre a reação de Rubino e as provas utilizadas na avaliação de competência Imune celular.

Rubino	Linfócitos T		D N C B			P P D		Tricofitina	
	Normal	Alterado	+	+	-	+	-	+	-
Positivo	12	8	20	.		9	11	15	5
Negativo	18	13	30	1		19	12	18	13

ABSTRACT — Some aspects related to the Rubino's reaction are commented, viewing both a better identification of the involved elements and the arousing of the investigators interest for this test. The following aspects are discussed: 1) the influence of temperature upon the elements of the reaction; 2) Correlation between Rubino's reaction and: a) humoral alterations observed in leprosy; b) cell mediated immunity; 3) variations of the serologic reactivity; 4) prognosis value and healing criterion.

Key words: Rubino's reaction. Hanseniasis. Immunity. Cell-mediated immunity.

REFERENCIAS

- 1 ABE, M.; IZUMI, S.; SAITO, T.; MATHUR, S. K. Early serodiagnosis of leprosy by indirect immunofluorescence. *Lepr. India.*, 48(3): 272-276, 1976.
- 2 ARRUDA, MS.; ARRUDA, O.S.; ASTOLFI, C. S.; NOGUEIRA, M.E.; BASTAZINI, I.; OPRO-MOLLA, D.V.; URA, S. Reação de Rubino: critério de branqueamento para pacientes virchowianos. *Med. Cut. Iber. Lat. Am.*, 11(6): 423-430, 1983.
- 3 AZEVEDO, M.P. & FERRI, R.G. apud CURBAN, G.V. Contribuição para o estudo da reação de Rubino. *Rev. Bras. Leprol.*, 30(4): 179-216, 1962.
- 4 BIER, O. *Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações d medicina e d higiene*. 17. ed. São Paulo, Melhoramentos, 1976. 1056 p.

- 5 CURBAN, G.V. Contribuição para o estudo da reação de Rubino. *Rev. Bras. Leprol.*, **30(4)**: 179-216, 1962.
- 6 HARBOE, M.; CLOSS, O.; BJUNE, G.; KRONVALL, G.; AXELSEN, N. H. *Mycobacterium leprae* specific antibodies detected by radio immunoassay. *Scand. J. Immunol.*, **7(2)**: 11-120, 1978.
- 7 MARCHOUX, E. & CARO, J. Méthode de diagnostic sérologique de la lépre. *Ann. Inst. Pasteur*, **42(4)**: 542-552, 1928.
- 8 MENDES, N F ; TOLNAI, M.EA.; SILVEIRA, NPA.; GILBERTSEN, R.B.; METZGAR, R.S. Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocytebinding (T) lymphocytes. *J. Immunol.*, **111(3)**: 860-867, 1973.
- 9 OPROMOLLA, D.V.; ARRUDA, M.S.; URA, S.; PERNAMBUCO, J.C.; BASTAZINI, I.; FLEURY, RN.; TOLENTINO, M.M.; TONELU, C.J.; ARRUDA, OS. Aspectos evolutivos da reação de Rubino. *Med. Cut. Iber. Lat. Am.*, **10(1)**: 9-14, 1982.
- 10 RUBINO, M.C. Nuevas reacciones serológicas en la lepra. *Rev. Soc. Argent. Bid.*, **2**: 407-416, 1926.
- 11 SILVA, OP. *Estudo imunoquímico das imunoglobulinas em soros de hansenianos Rubino positivos e negativos: quantificação e propriedades*. Bauru, 1972. 146 p. /Tese — Faculdade de Odontologia de Bauru — USP/

Recebido para publicação em abril de 1985; aceito para publicação em junho de 1985.