

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXIII

Março — 1930

Fasciculo 3

O diagnostico da febre amarella pela dosagem
da alexina (*)

por

J. da COSTA CRUZ

São até certo ponto discordantes os resultados obtidos por diferentes pesquisadores quanto ao titulo e as oscillações que pôde apresentar a alexina no sôro dos individuos normaes. Todavia, segundo Hayden (1), Leschly (2), Lange (3), Brinkmann (4) e Goldner (5), é muito constante o teôr em alexina d'esses sôros. A causa, a nosso ver, das divergencias assignaladas pôde provir, em primeiro lugar, da existencia no sôro dos individuos normaes de substancias anti-complementares, como as que se observam após as refeições copiosas de gorduras; em segundo lugar, do emprego de uma technica de dosagem nem sempre uniforme e, finalmente, do esquecimento momentaneo de que a alexina humana é extremamente labil, sobretudo quando diluida em sôro physiologico.

Actualmente, a hypothese da pluralidade da alexina está posta á margem, sendo aceita por todos os auctores,

quasi sem excepção, a opinião sustentada por Bordet segundo a qual essa substancia, embora complexa, é uma e unica e com maior ou menor capacidade de adhesão para os mais variados complexos antigeno-anticorpo. Dahi resulta que qualquer d'esses complexos pôde servir para dosal-a, o que, de regra, se faz com os complexos hemolyticos que offerecem simplicidade de technica, rapidez e facilidade na leitura dos resultados. É indispensavel, porém, para que sejam comparaveis os resultados, usar rigorosamente o mesmo complexo nas mesmas condições de adhesão para a alexina.

De um modo geral o antigeno a empregar deve ser fortemente sensibilizado por um excesso de anticorpo e, si se quer determinar entre estreitos limites o teôr minimo de alexina de um sôro dado, deve-se empregar uma quantidade reduzida de complexo antigeno-anticorpo

(*) Recebido para publicação a 16 de Janeiro de 1930.

de tal modo escolhida que não prejudique a boa leitura dos resultados.

A importancia d'estas considerações é fundamental para a dosagem da alexina, pois só ellas explicam as enormes differenças encontradas por varios auctores.

Com ser de considerar, em vista da quantidade variavel de hemolysinas normaes nos sôros humanos, o gráo de sensibilisação do antigeno ¹ não apresenta a mesma importancia que a quantidade de antigeno sensibilizado na reacção. Com effeito, a mesma quantidade de globulos sensibilizados, ou seja 1 c. c. da emulsão a 2,5 %, em presença de 4 unidades hemolysantes ou de 40, dará para o mesmo sôro humano fresco valores sensivelmente eguaes a 0,07 e a 0,06 c. c., respectivamente, de alexina. Ao contrario, si se variar a quantidade dos globulos sensibilizados do simples ao dobro, por exemplo, empregando-se o mesmo volume de globulos a 2,5 % e globulos a 5 %, sensibilizados ambos pela mesma quantidade relativa de hemolysinas, isto é, cada qual com 40 unidades hemolysantes, encontram-se para o mesmo, sôros valores taes como 0,06 e 0,2 c. c. respectivamente (hemolyse total). Isto mostra nitidamente que a quantidade de complemento capaz de produzir a hemolyse total de um systema qualquer é, até certo ponto, proporcional á quantidade do antigeno sensibilizado ². Como é de prever o titulo da dosagem varia menos quando a leitura é feita pela hemolyse parcial ao envez da hemolyse total. N'esse caso, com effeito, o titulo em qualquer dos exemplos apontados acima é sensivelmente o mesmo e, si se desejasse apenas determinar o titulo absoluto em alexina, seria esse o processo a recomendar. Perdem-se com

elle, entretanto, outros aspectos da reacção da dosagem que têm importancia para o estudo do sôro dos amarellentos, pois nos dois doentes que examinámos no 1º dia de molestia a alteraçaõ da alexina era por assim dizer mais qualitativa que quantitativa: ausencia de hemolyse total com 0,1 c. c. em 40 minutos, mas hemolyse parcial com 0,06 c. c. que ao fim de duas horas chegou a se apresentar quasi total mesmo n'esta ultima dóse.

Sendo já discordantes os valores obtidos quanto ao teor da alexina nos sôros dos individuos normaes, é de esperar que o não sejam menos os que se referem aos das mais variadas molestias e que, por isso, de um modo geral a dosagem da alexina não tenha tido até agora a menor utilidade como methodo de diagnostico.

Ehrlich e Morgenroth (6) observaram forte diminuição da alexina nos animaes intoxicados pelo phosphoro e esses resultados foram confirmados por varios pesquisadores. Mettelnikoff (7) e Ludke (8) encontraram diminuição da alexina nas suppurações chronicas. Bergmann e Kenthe (9) descreveram impedimento da hemolyse nas uremias, pyoemias, septicemias e molestias carcinomatosas.

Bentivenga e Carini (10) acharam o mesmo resultado nas defficiencias da nutrição; Abbot e Bergey (11) no envenenamento pelo alcool; Sweet (12) na diabetes experimental e Fassin (13) e Muller (14) na tyreoidectomia. Segundo Nagelschmidt (15) ha diminuição do poder hemolytico dos sôros pela simples acção do frio, porém Tromsdorf (16) não o observou nem pela acção do frio, da fome, da fadiga, de sangrias repetidas, do envenenamento pelo alcool ou pelo opio mesmo quando os animaes enfra-

¹ Nas nossas observações encontramos valores compreendidos entre 5 e 160 unidades.

² Vide Leschly. Zeitsch. f. Imm., vol. 24, pag. 499.

quecidos por essas formas entravam em agonia.

Na gravidez a alexina é normal (Ludke 17). Para Moro e Potpeschnigg (18) encontra-se augmentada nas molestias infecciosas, taes como febre typhoide, pneumonia, e tuberculose, e consideram máo o prognostico d'essas molestias quando o contrario acontece. Aben-Athar (19) observou na peste bubonica a alexina normal e só na vespera ou antevespera da morte uma baixa consideravel. Na hemoglobulinuria paroxistica Meyer e Emmerich (20), Moro e Noda (21) observam falta de complemento. Na escarlantina Szimai (22) encontra a alexina normal ou augmentada e só ao fim da primeira semana ligeira diminuição.

Vincent (23) nota desaparição da alexina pela fadiga e Koch e Smith (24) pela fome. Huntmuller (25) observou diminuição da alexina nos atletas após exercicios sportivos. Goldner (5), finalmente, encontra diminuição de alexina na molestia de Basedow, na anemia perniciososa, na atrophia amarella aguda do figado, nas cirrhoses e em alguns casos de ictericias e de diabetes mellitus. Na uremia observou, pelo contrario, um augmento notavel de alexina.

Pensamos que os dados anteriores não podem ser acceptos sem reservas. As technicas empregadas variam consideravelmente; alguns auctores são omissoes, outros não dosam a alexina, mas o poder hemolytico total do sôro. Os trabalhos mais recentes attendem, em geral, á necessidade de uma boa sensibilização do antigeno, porém nenhum levou em consideração a quantidade de complexo antigenico sensibilizado na reacção o que é, como acima dissemos, o principal factor das divergencias observadas, e por conseguinte, da maior importancia si se querem obter valores comparaveis.

Em communicação feita á Sociedade Brasileira de Biologia, em 27 de Fevereiro

de 1929 (26), assignalamos a consideravel diminuição da alexina que se observa no sôro fresco dos doentes de febre amarella entre o 4º e o 7º dia de molestia, isto é, no periodo que succede á crise de temperatura³. Posteriormente, graças á gentileza e bôa vontade dos clinicos e internos tanto do Hospital Oswaldo Cruz como da enfermaria do isolamento do Hospital S. Sebastião, pudemos fazer numerosas dosagens da alexina quer em casos de febre amarella grave, quer em fórmias benignas ou mesmo frustas e em casos meramente suspeitos em que o diagnostico clinico não chegava a determinar de modo peremptorio a natureza da molestia. Os resultados então obtidos foram resumidamente apresentados á Sociedade Brasileira de Biologia, sessão de 27 de março de 1929 (27), e são elles com os commentarios indispensaveis que constituem o objecto do presente trabalho.

Technica. — A technica usada foi a da simples determinação da quantidade minima de sôro fresco do doente capaz de determinar a hemolyse completa d'um systema hemolytico adequado. Por commodidade servimo-nos do systema hemolytico habitualmente usado na reacção de Wassermann em quasi todos os laboratorios, constituido por globulos de carneiro e sôro de coelho anti-carneiro. Attendendo a que uma alta porcentagem de sôros humanos normaes apresenta uma quantidade variavel de sensibilizadoras hemolyticas para os globulos de carneiro, tivemos sempre o cuidado de empregar no systema hemolytico um grande excesso de hemolysinas, ou sejam de 30 a 40 unidades dosadas em presença de 0,1 cc. de sôro fresco de cobaia. Todas as determinações foram feitas no volume de 4 cc. de liquido. Os globulos eram lavados quatro vezes com

³ Recentemente estas observações foram confirmadas por L. Salles Gomes. Arch. de Hyg. 1929, n. 2, p. 155.

agua physiologica e a soluçao que nos pareceu melhor era a 2,5 %; della se usava 1 cc. em cada tubo. O sangue dos doentes, obtido por sangria da veia da prega do cotovello, era transportado immediatamente para o laboratorio, de modo que bem poucas vezes mediou mais de uma hora entre a sangria e a dosagem, precauçao indispensavel em face da grande labilidade da alexina. Os sangues que não coagulavam rapidamente eram collocados ainda fluidos nos tubos de centrifugaçao; via de regra, durante a centrifugaçao o plasma coagulava dando facilmente um soro limpido. Como era frequente esse contratempo e tambem para poupar o soro dos doentes, as doses empregadas na reacçao, que nos pareceram sufficientes, foram de 0,2 cc., 0,15 cc., 0,1 cc., 0,08 cc., 0,06 cc. e 0,04 cc..

Collocadas essas quantidades em uma serie de tubos, adicionava-se q. s. de agua physiologica para completar 2 cc.; a seguir adicionava-se 1 cc. da soluçao de globulos e depois 1 cc. do soro hemolytico previamente dosado (30 a 40 unidades). Levavam-se os tubos ao banho maria a 37° e após 30 a 40 minutos procedia-se á leitura dos resultados.

Em geral, com um tal systema os soros normaes produzem hemolyse total com 0,06, alguns mesmo com 0,04. Na dose de 0,2 cc. a hemolyse se faz em 3 a 5 minutos na dose de 0,1 cc. em cerca de 10 minutos. Nunca observamos soros normaes em que não houvesse hemolyse total com 0,08 e em nenhuma molestia examinada, inclusive a malaria (com excepçao de 1 caso), deixou de haver hemolyse total com 0,1 cc. a não ser na febre amarella. N'esta molestia mesmo com 0,2 cc. não ha muitas vezes nem traços de hemolyse. Tomamos como fracamente positiva para febre amarella a reacçao em que ha hemolyse com 0,15 e apenas hemolyse parcial ou ausencia de hemolyse com 0,1 cc. de soro do doente; positiva a que dá

hemolyse ou parcial ou total com 0,2 cc. e ausencia ou apenas traços de hemolyse com 0,15; fortemente positiva as que não dão hemolyse com 0,2 cc. ou dão apenas traços de hemolyse n'essa dose.

Todas as vezes em que procedemos a dosagens da alexina em soros de doentes fizemol-as acompanhar por uma dosagem da alexina de um soro normal de teor conhecido afim de estarmos bem seguros do valor do systema hemolytico empregado. Rarissimas vezes tivemos necessidade de verificar o poder anticomplementar do soro a examinar, o que poderá ser tambem de alguma utilidade, porque os soros dos doentes de febre amarella, como adeante veremos, não possuem propriedades anti-alexicas.

De accôrdo com essa technica e com o criterio que estabelecemos apresentamos, nas paginas 114 a 118, os resultados obtidos para a dosagem da alexina nos doentes examinados.

Como se vê d'esta lista em todos os casos clinicamente considerados como de febre amarella não se observou a hemolyse total com 0,1 cc. de soro fresco de doente, com excepçao de um unico caso em que o teor da alexina observado foi normal, isto é 0,06. A dosagem foi repetida no dia immediato com o mesmo resultado. Vale pois a pena examinar com maior cuidado este caso. Eis resumidamente a observaçao conforme a papeleta archivada:

P. F. N. Doente nº. 55—Adoeceu no dia 3 de Março com dôr de cabeça, febre, moleza no corpo. A' noite vomitou claro. Entrou no hospital no dia 5 apresentando ligeira epigastralgia e ligeira ictericia ocular. N'esse dia tomou 60 cc. de soro de cavallo anti-amarillico preparado no Instituto Oswaldo Cruz pelo Dr. H. Aragão. No dia 6 recebeu mais 60 cc. d'esse soro subcutaneamente. No dia 7 apresentou albumina na urina + + +. A temperatura

era de 40°2 no dia que entrou: no dia 7, em que foi feita a dosagem da alexina pela primeira vez, a temperatura era de 38°; no dia 8 em que se repetiu o exame, 37°. Teve alta curado em 14 de março.

Como se vê, este caso é clinicamente o typo do caso benigno de febre amarella e assim o consideramos nas publicações anteriores que fizemos. É verdade que a albuminuria foi pouco intensa e appareceu tardiamente, com pouca significação para o diagnostico por ter recebido o doente nos dois dias anteriores 120 cc. de sôro de cavallo, o que por si só poderia justificar o apparecimento de albuminuria. Todavia, pareceu-nos tambem possivel que essas injeccões de albumina extranha pudessem ter produzido um augmento da alexina no sôro do doente, transformando uma reacção fracamente positiva em negativa, uma vez que segundo Nolf (28) e Muller não só as injeccões de plasma sanguineo como de caldo aleurona, etc. em doses massiças podem produzir um augmento transitorio da alexina do sôro em animaes de experiencia.

Recentemente, porém, por um feliz acaso encontramos no laboratorio do Dr. H. Aragão o sôro d'esse doente colhido dois mêzes após a molestia e conservado, havia 6 mêzes no frigorifico, e pudemos verificar o seu poder protector em *Macacus rhesus*:

M. rhesus no. 52.—Inoculado subcutaneamente em 28-II-1929 com 2 cc. de sôro de P. F. N. e, em 29-II-1929, com 0,5 cc. de sangue infectante do *rhesus* no. 48. Apresentou em 29-II, 39°5, em 30-II, 39°2, em 1-12, 40°7; em 2-12, 40°4; em 3-12, moribundo, com 35°4. Diagnostico histopathologico: febre amarella.

O *rhesus* no. 50, testemunha do precedente, sacrificado com 37°5, em 3-12-1929 tambem teve o diagnostico histo-pathologico de febre amarella.

Como se vê, esse sôro não exerceu nenhuma acção preventiva contra o virus amarillico, pois nem mesmo um ligeiro retardamento do periodo de incubação se observou na infecção do *rhesus*. Pode-se pois assegurar que, não obstante os indicios clinicos, o caso d'esse doente não foi de febre amarella, tanto mais quanto um outro sôro de convalescente e esse de um caso muito benigno d'onde fôra possivel ao Dr. H. Aragão isolar o virus e infectar mosquitos, apesar de conservado no frigorifico ha cerca de um anno e meio, protegeu do modo o mais efficaz uma infecção amarillica em *Macacus rhesus*.

M. rhesus no. 60—Inoculado em 912-929 com 2 cc. de sôro do cavalescente Novelli e em 10-12-929 com 0,5, cc. de sangue infectante do *rhesus* no 55. Não apresentou elevação de temperatura.

M. rhesus no. 62, testemunha do precedente, inoculado em 10-12-929, com 0,5, cc. de sangue do *rhesus* no 55, apresentou 39°5 em 10-12; 39°5 em 11; 39°6 em 12; 39°2 em 13; 39°6 e á tarde 40°6, em 14; em 15, 41°. Amanheceu morto em 16-12. Diagnostico histopathologico: febre amarella.

O caso de P. F. N. é, pois, do nosso ponto de vista, muito instructivo porque nos permite assegurar, com muita probabilidade de acerto, que não é possivel diagnosticar clinicamente febre amarella apesar de todas as apparencias quando á dosagem da alexina fornece um resultado negativo. Com effeito em nenhum caso, salvo esse, clinicamente diagnosticado de febre amarella, deixamos de ver diminuição da alexina no sôro e o estudo acabado d'esse unico caso parece mostrar que, de facto, a molestia não se apresenta sem esse symptoma constante.

DOENTES			RESULTADO DA REACÇÃO	DIAGNOSTICO CLINICO	OBSERVAÇÕES
1	A. M.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella grave	Dosagem feita no 7º dia de molestia. 14-2-929.
2	D. M.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella grave	Dosagem feita no 6º dia de molestia. 14-2-929.
3	R. M.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella benigna	Dosagem feita no 4º dia de molestia. 14-2-929.
4	A.	H. O. C.	Negativa	Individuo normal	14-2-929.
5	A. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	Dosagem feita no 7º dia de molestia. 14-2-929.
6	A. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	Dosagem feita no 4º dia de molestia. 14-2-929.
7	N. F.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella benigna	Dosagem feita no 8º dia de molestia. 14-2-929.
8	C. E. S.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella grave.	Dosagem feita havia 22 dias sem febre. 14-2-929.
9	G. S.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella grave.	Dosagem feita havia 14 dias sem febre. 14-2-929.
10	M. M.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Febril no momento da sangria. 19-2-929.
11	D. F.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Sem febre no momento da sangria. 19-2-929.
12	O.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Sem febre no momento da sangria. 19-2-929.
13	W. N.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella benigna	Dosagem feita havia 2 dias sem febre. 20-2-929.
14	A. P.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella benigna	Dosagem feita havia 4 dias sem febre. 20-2-929.
15	L.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	20-2-929.
16	C. C.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	19-2-929.
17	A. D.	H. S. S.	Negativa	Cirrrose hypertrophica	Apresentava forte ictericia e falleceu 2 dias mais tarde. 20-2-929.
18	A. M.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	Não fornecia informações. Febre alta. Falleceu no dia seguinte. 20-1-929.
19	T. S.	H. S. S.	Negativa	Grippe	Estava ha 2 dias com febre. 20-2-929.

20	C.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella benigna	Dosagem feita no 6º dia de molestia. Apyretico. 24-2-929.
21	L.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella grave	Dosagem feita no 6º dia de molestia. Já estava sem febre. 24-2-929.
22	E.	H. O. C.	Negativa	Pyrexia indeterminada	Teve febre 1 dia. Ha 4 sem febre. 24-2-929.
23	S.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	24-2-929.
24	E. C.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella benigna	5º dia de molestia. Temp. 37º8. 25-2-929.
25	C. V.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	28-2-929.
26	A. C.	H. S. S.	Negativa	Convalescente de febre amarella	Teve febre. No momento apyretico. 28-2-929.
27	H. F.	H. S. S.	Negativa	Nenhum symptoma de febre amarella	3º dia de molestia. Temp. 38º2. 28-2-929.
28	M. C.	H. S. S.	Positiva	Grippe	Desde a vespera sem febre. 5º dia de molestia. 28-2-929.
29	J. J.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	Na vespera 37º8. No momento apyretico. 28-2-929.
30	A. B.	H. S. S.	Negativa	Grippe	4º dia de molestia. Temp. 37º8. 28-2-829.
31	S. M.	H. S. S.	Fracamente positiva	Febre amarella	7º dia de molestia. Desde 26-2 sem febre. 28-2-929.
32	J. S.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. Temp. 39º7.
33	C. J.	H. S. S.	Negativa	Malaria	Febril. 28-2-929.
34	A. S.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	6º dia de molestia. 28-2-929.
35	G.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º ou 4º dia de molestia. 23-929.
36	Dr. F. M.		Negativa	Intoxicação gravídica	2-3-929.
37	Dr. H. P.		Negativa	Febre typhoide	2-3-929.
38	D. M.	H. S. S.	Positiva	Grippe	24 horas de molestia. 2-3-929.
39	M. S.	H. O. C.	Negativa	Pyrexia indeterminada	2-3-929.
40	A. F.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella	3º para o 4º dia de molestia. 2-3-929.

DOENTES		RESULTADO DA REACÇÃO	DIAGNOSTICO CLINICO	OBSERVAÇÕES
41	H. G.	H. S. S.	Positiva	Grippe 4º dia de molestia. 2-3-929.
42	W. M.	H. S. S.	Negativa	Convalescente de febre amarella Apyretico havia 3 dias. 2-3-929.
43	I.	H. S. S.	Negativa	Malaria Ha 2 dias sem febre. 2-3-929.
44	A. B.	H. S. S.	Negativa	Pyrexia indeterminada Ha dois dias sem febre. 2-3-929.
45	M. C.	H. S. S.	Negativa	Pyrexia indeterminada Ha 7 dias sem febre. 2-3-929.
46	M. M.	H. O. C.	Negativa	Malaria Temp. 38º4. No momento da sangria. 6-3-929.
47	G. F.	H. O. C.	Negativa	Cirrhose, ascite, malaria chronica Temp. 37º2 no momento da sangria. 6-3-929.
48	J. F.	H. O. C.	Negativa	Infecção chronica, febril Temp. 37º4 no momento da sangria. 6-3-929.
49	C. M.	H. O. C.	Negativa	Convalescente ha 15 dias de febre amarella Temp. 36º0 no momento da sangria. 6-3-929.
50	A. M.	H. O. C.	Negativa	Tuberculose pulmonar Temp. 38º0 no momento da sangria. 6-3-929.
51	S. V.		Fracamente positiva	Malaria 2º dia de molestia. Temp. 38º5. 6-3-929.
52	A. Z.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella 6º dia de molestia. 6-3-929.
53	A. F.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella 4º dia de molestia. 6-3-929.
54	M. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella † 3º dia de molestia. 7-3-929.
55	P. F.	H. S. S.	Negativa	Febre amarella 4º dia de molestia. 7-3-929.
56	J. B.	H. S. S.	Negativa	Grippe 2º dia de molestia. 7-3-929.
57	A. G.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella 6º dia de molestia. 7-3-929.
58	F. O.	H. S. S.	Negativa	Malaria (diagnostico anatomico 9-3) Inconsciente. Temp. 38º6. Falleceu 2 dias após 7-3-929.
59	L. R.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella 5º dia de molestia. Temp. 38º0. 7-3-929.
60	O. O.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella 6º dia de molestia. Temp. 37º5. 7-3-929.

61	A. S.	H. S. S.	Negativa	Parotidite. Convalescente de febre amarella	7-3-929
62	A. R.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. 9-2-929.
63	J. A.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. 9-3-929.
64	J. K.		Fracamente positiva	Grippe	2º dia de molestia. 9-3-929.
65	A. J.	H. S. S.	Negativa	Pneumonia	3º dia de molestia. 9-3-929.
66	A. P.	H. S. S.	Negativa	Pyrexia indeterminada	5º dia de molestia. Temp. 39º. 9-3-929.
67	D. C.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. 9-3-929.
68	J. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	3º dia de molestia. 13-3-929.
69	E. P.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. 13-3-929.
70	L. D.	H. S. S.	Negativa	Individuo normal	13-3-929.
71	C. A.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella	4º dia de molestia. Temp. 38º. 13-3-929.
72	A. G.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. Forma renal. Temp. 37º2 15-3-929.
73	A. S.	H. O. C.	Fracamente positiva	Febre amarella	12º dia de molestia. Ha 3 dias sem febre 15-3-929.
74	A. A. H.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. Temp. 38º. 16-3-929.
75	M. G.	H. O. C.	Negativa	Tuberculose pulmonar	Temp. 37º. 15-3-929.
76	W. R.	H. O. C.	Negativa	Pleuresia	Temp. 37º8. 15-3-929.
77	J. A.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	2º dia de molestia. 2-3-929.
78	S. C.	H. S. S.	Negativa	Sarampo	8º dia de molestia. Temp. 38º2.
79	J. A.	H. S. S.	Negativa	Ictericia catarral	Temp. 39º5. 16-3-929.
80	J. F.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	4º dia de molestia. Temp. 37º8. 16-3-929.
81	S. S.	H. S. S.	Negativa	Grippe	2º dia de molestia. Temp. 38º4. 16-3-929.
82	J. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	6º dia de molestia. 16-3-929.
83	F. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. Temp. 39º5. 16-3-929.

DOENTES			RESULTADO DA REACÇÃO	DIAGNOSTICO CLINICO	OBSERVAÇÕES
84	A. P.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. Temp. 36º5. 16-3-929.
85	C. K.	H. S. S.	Fracamente positiva	Grippe	3º dia de molestia. Temp. 48º. 16-2-929.
86	M. J.	H. O. C.	Negativa	Pyrexia indeterminada	Ha dois dias sem febre. 18-5-929.
87	J. C.	H. O. C.	Negativa	Meningite c. espinhal	3º dia de molestia. 18-3-929.
88	M. G.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	
89	A. B.	H. O. C.		Pyrexia indeterminada	3º dia de molestia. 18-3-929.
90	C. C.		Negativa	Individuo normal	18-3-929.
91	J. C. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. 19-3-929.
92	A. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	2º dia de molestia. 19-3-929.
93	C. P.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. Apyretico. 19-3-929.
94	A. B.	H. S. S.	Fracamente positiva	Febre amarella	3º dia de molestia. Temp. 39º 19-3-929.
95	F. P.	H. O. C.	Fracamente positiva	Febre amarella	3º dia de molestia. Temp. 39º5. 19-3-929.
96	P. N.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	5º dia de molestia. 19-3-929.
97	J. F.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. 19-3-929.
98	B. S.	H. O. C.	Negativa	Malaria	22-3-929.
99	G.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	22-3-929.
100	C. C.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	22-3-929.
101	J. F.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	22-3-929.
102	A. G.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	22-3-929.
103	M. F.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	22-9-929.

Nos casos em que a reacção da alexina para febre amarella foi negativa e foi feito o diagnostico clinico de outra molestia com toda precisão, encontramos augmento de alexina em um caso na pneumonia, em um caso de grippe com phenomenos pulmonares no 1º dia de molestia e em um caso de cirrhose hypertrophica (hemolyse rapida e completa com 0,04 cc. de sôro). Nos outros o teôr era normal, independentemente do sexo, isto é 0,08 ou 0,06 cc. Nos casos de malaria examinados encontramos hemolyse total com 0,1 cc. mas em 3 casos com 0,08 cc. a hemolyse não era total. Em um unico caso encontramos um doente que deu hemolyse total com 0,15 e hemolyse apenas parcial com 0,1 cc. Tratava-se de um individuo de 60 annos, escossez, nº 51 da lista anterior, no inicio de uma infestação pelo plasmodio da terçã benigna. Máo grado muitos auctores terem notado diminuição da alexina no impaludismo, pensamos que o resultado d'esse caso n'elle denuncie apenas uma insufficiencia hepatica.

Dentre os 103 casos que formam a lista acima, em 5 casos além do supra mencionado a dosagem da alexina deu um resultado positivo para febre amarella e o diagnostico clinico foi indeciso, isto é, diagnosticou-se, á falta de symptomas mais claros, grippe sem phenomenos pulmonares; são os casos nº. 28, nº. 38, nº. 41, nº. 64 e nº. 85. Foram todas as reacções positivas ou fracamente positivas em doentes que apresentaram ora ligeira albuminuria ora ligeira ictericia, com ou sem epigastralgia mas que evoluíram facilmente para a cura e de cujos sôros não nos foi possível verificar o poder protector no laboratorio por penuria de recursos.

Em summa, dos 103 casos examinados verificou-se que uma vez a reacção foi negativa e o diagnostico clinico positivo e este ultimo era menos certo; uma vez a reacção foi positiva e o diagnostico clinico negativo e aqui com certeza

o diagnostico clinico é o verdadeiro ⁴. Em 5 casos a reacção foi positiva, o diagnostico clinico hesitante sem que se saiba quem tem razão.

Além d'estes ha alguns casos em que o diagnostico clinico não foi possível e em que a reacção foi negativa para febre amarella. Aconselhados pela prudencia e dominados pelo espirito de uma justa imparcialidade queremos crêr que alguns d'esses casos, máo grado todos os exames, possam ter sido casos de febre amarella que não foi possível apurar, e mesmo o seriam difficilmente, do ponto de vista experimental.

O certo é que, a julgar pelas observações que fizemos, nem a grippe no inicio, nem a pneumonia, nem o sarampo, nem a febre typhoide se podem confundir pela dosagem da alexina com a febre amarella. O mesmo sou forçado a dizer da malaria, si algumas conclusões quizer tirar das observações seguintes.

F. O. Doente nº. 51. Brasileiro apparentando 20 annos. Entrou a 5 de Março fortemente suspeito de febre amarella com febre alta em estado de inconsciencia. Não forneceu por isso nenhuma informação. No dia 7 foi sangrado para dosagem de alexina que existia no sôro na dose de 0,06. Falleceu em 9 de Março. Diagnostico anatomico. Impaludismo.

D. O. suspeito de febre amarella, funcionario do Instituto Oswaldo Cruz. Têm nephrite chronica. Febre, vomitos escuros; 4º dia de molestia. Dosagem da alexina negativa para febre amarella. Diagnostico clinico: malaria (terçã benigna).

Toda vez que se nos offereceu oportunidade de examinar algum doente interessante do ponto de vista da dosa-

⁴ Por informação do Dr. Soper soubemos que o sôro d'esse doente, posteriormente examinado nos laboratorios da Inst. Rockefeller, se mostrou incapaz de proteger *M. rhesus* contra a infecção pelo virus amarillico.

gem da alexina não deixamos de o fazer e assim aqui acrescentamos algumas observações curiosas e instructivas para o criterio a adoptar no que diz respeito ao diagnostico da febre amarella pela dosagem da alexina.

1o. J. F. entrou no Hospital Oswaldo Cruz como suspeito de febre amarella. Apresenta albumina, ictericia franca. Tem febre, teve vomitos. O quadro clinico simula de tal forma o de febre amarella grave que esse diagnostico é estabelecido com confiança. A dosagem da alexina deu hemolyse total rapida com 0,2 e 0,15, hemolyse quasi total com 0,1 cc., hemolyse total com 0,08 cc. Reacção muito fracamente positiva, por assim dizer duvidosa com o criterio schematico por nós admittido de inicio.

Em todos os casos de igual gravidade sempre encontramos diminuição muito maior da alexina, isto é, ausencia de hemolyse com 0,2 cc., de modo que não hesitamos n'essa reacção duvidosa em dar um resultado negativo, resultado esse que causou surpresa aos clinicos. Dois dias depois esse doente falleceu com o diagnostico clinico de febre amarella, mas o estudo histo-pathologico excluiu de modo completo esse diagnostico. Parece ter se tratado de ictericia hemolytica, o que não se pode com certeza saber por se não ter feito a dosagem da resistencia globular em vida.

2o. G. A. do H. C. E. No decurso de um tratamento anti-syphilitico (oxycyanureto de mercurio) baixa á enfermaria com forte ictericia, vomitos, sem ter apresentado febre. Procedida a dosagem da alexina verificou-se ausencia completa de hemolyse com 0,2 cc. de sôro fresco. O doente falleceu no dia immediato e algumas visceras foram trazidas para exame no Instituto, onde foi feito pelo estudo histo-pathologico do figado o diagnostico de atrophia amarella aguda do figado.

Assim, pois, a atrophia amarella aguda do figado, molestia tão rara que é esse o primeiro caso archivado entre 6.000 autopsias no Instituto Oswaldo Cruz, e cuja symptomatologia é tão semelhante ao de febre amarella que os auctores francezes (Dieulafoy) a denominavam «fièvre jaune nostras», tambem se não distingue da febre amarella verdadeira pela dosagem da alexina, pelo menos nos ultimos periodos da molestia (vespera da morte). Devo todavia acrescentar que em um caso de atrophia subaguda do figado (diagnostico clinico) a dosagem da alexina foi normal, isto é, 0,06 cc. no 3o dia de molestia em um doente observado na enfermaria de isolamento do H. S. S.

3o. A. brasileira, sexo feminino, 87 annos de idade. Ha dois annos lhe foi feito o diagnostico de anemia perniciosa. Usa desde esse tempo o tratamento de Whippe que lhe proporciona os melhores resultados. No momento do exame, ha tres mezes, não faz tratamento e apresenta 1.800.000 gl. por mm³. A dosagem da alexina revela hemolyse rapida e total com 0,04 cc. Reinicia o tratamento e um mez e meio mais tarde apresenta 3.000.000 de gl. por mm³.

Assim, máo grado uma idade avançada e uma anemia perniciosa antiga, o teôr de alexina se achava normal.

4o. G. V. brasileiro, sexo masculino. Ankylostomiase grave e antiga. 900.000 gl. por mm³. Teôr de alexina 0,06 cc.; com hemolyse quasi total em 30 m.

5o e 6o. Cirrhose atrophica. Um destes doentes, do sexo feminino, com 45 annos de idade, falleceu um mez após o exame que lhe fizemos no sôro. Ambos deram hemolyse rapida total com 0,06 cc. isto é, o teôr da alexina era perfeitamente normal.

O mesmo aconteceu em um caso de kysto hydatico do figado e um caso de carcinoma extenso d'esse orgão, d'onde

se deve concluir que quando as lesões hepáticas ainda que graves são bem circumscriptas e o fígado conserva elementos cellulares integros, esses elementos são em geral suficientes para dar ao soro um teor normal de alexina.

Da analyse summaria desta exposição parece portanto licito concluir que o methodo da dosagem da alexina para o diagnostico da febre amarella, sem ter provavelmente um valor absoluto (atrophia aguda, malaria ?) é de primeira importancia e melhor do que aquelles até agora postos á disposição dos clinicos. Com effeito, nas molestias febris, que de inicio mais se podem confundir com a febre amarella, não ha diminuição do teor de alexina do soro, havendo até, ao contrario, muitas vezes augmento. Na malaria, na maioria dos casos, a deficiencia da alexina, quando existe, é pequena e não chega a falsear os resultados para a febre amarella. Não se deve todavia esquecer que na visinhança da morte as mais disparatadas molestias (como, por exemplo, a peste) podem dar uma forte baixa do teor de alexina. São, porém, casos que aos clinicos já nenhuma difficuldade offerecem. A reacção só têm valor durante o periodo de molestia; conforme se vê da lista acima desaparece rapidamente nos convalescentes, não podendo portanto empregar-se no diagnostico retrospectivo.

Do ponto de vista epidemiologico é preciso levar em conta a possibilidade de existirem casos levissimos, que escapem tanto ao diagnostico clinico como ao diagnostico pela dosagem da alexina, pois não possuímos elementos para excluir essa possibilidade embora tenhamos encontrado reacções positivas em dois casos benignos, no 1º dia de molestia, um dos quaes posteriormente evoluiu de um modo perfeitamente typico e havia sido examinado apenas com 6 horas de febre.

Do exame mesmo superficial da relação dos casos que acima foram apresentados surge uma noção muito clara, que não nos impressionou logo: é a da regularidade com que a diminuição da alexina na febre amarella é proporcional á gravidade do caso.

Com effeito, todos os casos benignos deram, sem excepção, hemolyse completa ou quasi completa com 0,15 cc. e ausencia de hemolyse ou ás vezes traços de hemolyse com 0,1 cc. do soro. Nos casos graves, pelo contrario, a diminuição da alexina era sempre mais profunda. Voltamos por isso o espirito para a applicação pratica que d'esse facto podia resultar para o prognostico.

Verificamos, realmente que todos os casos em que houve ausencia completa de hemolyse com 0,2 cc. foram casos fataes e isso não só na febre amarella como na atrophia amarella aguda do fígado. No 2º dia de molestia, si ha apenas hemolyse parcial com 0,2 cc. e ausencia completa com 0,15 cc., o prognostico é da mesma forma sombrio.

A nossa convicção é que attingida uma certa baixa da alexina o teor d'ella é incompativel com a vida, o que significa que a alexina tem physiologicamente um papel primacial na vida do individuo ou que é produzida por um orgão cuja função é essencial e cuja actividade se póde bem acompanhar pelo teor da alexina no soro.

Nos estados morbidos, em que tem sido observada, essa diminuição accentuada é um signal que se apresenta quando outros symptomas já annunciam um desenlace fatal proximo (inanição, diabetes pancreatica, peste bubonica, etc.); na febre amarella, ao contrario apresenta-se desde o 2º dia de molestia, em enfermos aparentemente em condições que semelham as de um caso benigno, onde nada faz suspeitar um resultado fatal que inesperadamente sobrevem.

Ao contrario, os casos em que no 3º

ou 4º dia de molestia se observa hemolyse total com 0,15 cc. e ausencia de hemolyse com 0,1 cc., são casos que vão evoluir benignamente, mesmo que n'esse momento se apresentem, por outros symptomas (febre alta, agitação, hemorragias), como fórmias clinicamente muito graves.

O exame puramente objectivo das observações que fizemos, permite-nos afirmar, sem nenhuma duvida, que *a dosagem da alexina é um elemento de surpreendente segurança para o prognostico da febre amarella.*

—

Havendo verificado, logo ao exame dos primeiros casos, que os sôros dos amarellentos não apresentam propriedades anti-alexicas, nem para alexina de cobaia nem para alexina humana, pareceu-nos razoavel admittir que a diminuição da alexina era devida menos a um processo de destruição exaggerada d'essa substancia no sôro do que a uma alteração no processo de sua produção pelo organismo. Investigamos pois n'essa direcção e os resultados que obtivemos e que parecem confirmal-a, foram apresentados em sessão da Sociedade Brasileira de Biologia de Maio do corrente anno (29).

A propriedade alexica dos sôros não é, como todos sabem, o resultado da actividade de uma substancia simples, mas de um complexo de substancias, umas termolabeis, outras termoresistentes que existem sempre nos sôros normaes. Com effeito, em 1907 conseguiu pela primeira vez Ferrata (30) demonstrar que esta propriedade só se exerce pela concurrencia de duas substancias termolabeis que se podem separar pela dialyse, pois uma d'ellas possui as propriedades physico-chimicas das globulinas e, portanto, assim tratada precipita, e a outra com propriedades das albuminas permanece soluvel. Mais tarde von Dun-

gern (31) descobriu uma propriedade anticomplementar que Coca (32) verificou que se exercia sobre uma outra substancia, e esta thermoresistente, que pela dialyse acompanha de regra a fracção globulina dos sôros, e tambem indispensavel para que a alexina manifeste as suas propriedades. Consegue-se separal-a das outras duas de Ferrata, porque é absorvida energicamente por emulsões de levedos. Aos sôros assim inactivados pode-se regenerar a propriedade alexica por simples addição de sôro inactivado. Mais recentemente Whitehead, Gordon e Wormal (33), continuando os estudos d'este factor de V. Dungern, reconheceram a necessidade de uma quarta substancia, tambem thermoresistente, para que a alexina exerça a sua actividade. Trata-se de um elemento que acompanha na dialyse a fracção albumina de Ferrata e que se distingue, além disso, da de V. Dungern porque os sôros, d'onde é retirada pela acção de pequenas quantidades de ammonca, podem readquirir a actividade alexica pela simples addição de sôro inactivado donde foi retirado o factor thermoresistente de V. Dungern.

As nossas investigações n'este sentido foram feitas apenas no sôro de dois doentes, pois já n'essa occasião os casos de febre amarella escasseavam muito. Os resultados foram, porém, uniformes e nos inspiram por isso grande confiança. Transcrevemos para aqui as duas analyses que apresentamos anteriormente á Sociedade de Biologia.

1ª. Sôro de doente de febre amarella de gravidade media colhido no 4º dia de molestia. Pela dosagem da alexina deu hemolyse total com 0,2 cc., hemolyse quasi total com 0,15 e ausencia completa de hemolyse com 0,1 cc. A addição de sôro humano ou de cobaia, recentemente inactivado (a 56º durante 1/2 hora) na dose de 0,2 cc. não permite obter traços de hemolyse com 0,1 cc. de sôro do doente, o que mostra logo que não é á

falta exclusiva dos elementos thermoresistentes no sôro do doente, que se deve attribuir a ausencia da actividade alexica n'essa dose. Por sua vez a fracção globulina de Ferrata, adicionada na dose de 1 cc. a cada tubo (representando a quantidade contida em 0,1 cc. de sôro puro) não altera o titulo alexico do sôro do doente; ao contrario, a addição de 1 cc. da fracção albumina de Ferrata permittiu observar hemolyse total do systema hemolytico empregado, sempre o mesmo, até com a dose 0,005 cc. de sôro do doente.

O segundo sôro examinado sob este ponto de vista era o de um doente no 4º dia de molestia e que falleceu dois dias após. Pela dosagem da alexina não se observou nem mesmo traços de hemolyse com 0,2 cc. Como no primeiro caso o titulo alexico do sôro não se modificou pela addição de sôro humano ou de cobaia, recentemente inactivado, nem pela addição da fracção globulina de Ferrata. A addição da fracção albumina pelo contrario produziu hemolyse total até a dose de 0,04 cc. de sôro do doente. E' bem de ver n'estas experiencias que a separação das fracções de Ferrata era perfeita e que a fracção albumina, mesmo na dose dupla da empregada, isto é, na dose de 2 cc., era incapaz por si só de produzir traços de hemolyse com o systema hemolytico.

A technica que empregamos para separação d'estas duas fracções foi a de Liefmann, modificada por Braun (34), que consiste no seguinte:

Diluir o sôro fresco na razão de 1/10 com agua distillada gelada. Fazer passar durante 10 a 15 minutos uma corrente de gaz carbonico no liquido que se mantem em temperatura baixa durante toda a operação. O liquido fortemente turvo que se obtem por precipitação das globulinas é centrifugado durante 5 minutos a 3.500 rotações. O liquido que sobrenada, contendo 10 cc.

da fracção albumina diluida a 1/10, é adicionado de 1 cc. de uma solução a 8,5 % de chloreto de sodio, afim de reconstituir a isotonia, e é em seguida libertado do gaz carbonico por agitação e por transvasamentos repetidos de um tubo para outro. Essa fracção deve ser conservada immersa num vaso com agua gelada.

O deposito da centrifugação é lavado duas vezes consecutivas com agua distillada gelada e depois cuidadosamente dissolvido em agua physiologica.

Com este methodo sempre conseguimos não só uma separação facil e completa, mas tambem a obtenção das fracções perfeitamente activas, tanto com alexina humana como com alexina de cobaia, que ambas foram empregadas nas experiencias acima referidas com os sôros dos dois doentes.

Em summa no sôro dos doentes de febre amarella os elementos thermoresistentes bem como a fracção globulina thermolabil da alexina existem em quantidade apreciavel, embora se haja observado uma differença sensivel entre os sôros dos dois doentes observados; si elles não produzem a hemolyse, devemno sobretudo á ausencia da fracção albumina.

Em face d'esses resultados fomos levados a verificar o teôr da fracção globulina nos sôros normaes. Em dois sôros, cujo titulo alexico era 0,06 cc., observamos hemolyse total com 0,01 cc. pela addição da fracção albumina, o que mostra que tambem nos individuos normaes existe uma maior quantidade da fracção globulina da alexina do que da fracção albumina e que, quando se dosa como habitualmente a alexina, o titulo da dosagem correspondente apenas a quantidade da fracção albumina existente nesses sôros.

Quando se procura investigar o mecanismo e a causa da diminuição da

alexina no sôro dos doentes de febre amarella, varias hypotheses accódem ao espirito como verosimeis: fixação *in vivo* da alexina sobre um complexo antígeno-anticorpo; em face do papel que o fígado indiscutivelmente desempenha como órgão productora da alexina, filiar a uma insufficiencia hepatica a defficiencia da alexina observada; attribuir ás alterações da coagulabilidade do sangue, de longa data observados na febre amarella (S. F. da Cunha (35), 1723) as modificações da alexina, si se aceita inicialmente a hypothese de que a alexina participa do processo de coagulação ou durante elle se forma.

A favor da primeira hypothese falam algumas observações feitas em 1903 pela commissão franceza composta de Marchoux, Salimbeni e Simond (36), d'onde parece poder deprehender-se que já nos primeiros dias da molestia, quando o sangue é seguramente infectante, se encontram no sôro dos doentes propriedades preventivas, isto é, concomitantemente em circulação o agente infeccioso e seu anticorpo especifico. Ora, todos os auctores unanimemente admittem, não só a possibilidade da sensibilisação dos antigenos *in vivo*, como tão claramente demonstrou por exemplo Gabritschewsky (37) no decurso da spirochetose recorrente, como tambem, facto repetidamente comprovado por muitos pesquisadores, que a introducção directa de antigenos sensibilizados na circulação de animaes de experiencia accarreta immediatamente uma baixa no teor de alexina d'esses animaes, o que equivale dizer que sobre esses complexos tanto *in vitro* como *in vivo* se adsorve a alexina.

A nosso ver não se pode excluir, portanto, a intervenção deste mecanismo como responsavel, ao menos em parte, pela defficiencia da alexina, tanto mais quanto recentemente Frobisher (38) parece ter conseguido realisar a reacção de

fixação da alexina *in vitro*, na febre amarella.

Outros factos além d'isso falam no mesmo sentido: na febre amarella do homem a diminuição da alexina é precoce e, como se vê da lista que apresentamos, já se pode observar ás vezes nas primeiras 24 horas de molestia. E' difficil admittir que n'esse periodo de molestia, essa diminuição seja devida a uma alteração anatomica do fígado e parece mais legitimo aceitar que, pelo menos, n'essa primeira phase essa defficiencia se deva á fixação da alexina *in vivo* sobre um complexo antígeno-anticorpo. Por outro lado, no *Macacus rhesus*, nos primeiros dois dias de febre (se a crise de hypothermia não sobrevem antes) não se observa diminuição da alexina senão de modo inconstante. Ora, a febre amarella n'esses animaes é a reproducção exacta da molestia no homem com a differença que n'elles a reacção é mais precaria, a formação de anticorpos mais lenta como mostra a longa permanencia do virus no sangue e sobretudo a infecciosidade das visceras após a morte, de modo que a intoxicação mais grave é quasi sempre mortal não dando tempo, por exemplo, a que se observem os phenomenos de incoagulabilidade do sangue senão quando a morte não sobrevem logo e o animal resiste muitas horas em hypothermia ⁵. Ahi então o sangue permanece longo tempo fluido, coagulando lentamente em coagulos frouxos, como no homem, após o 4º dia de molestia, dando um sôro em que se observa uma baixa

⁵ Por vezes nos *rhesus* o sangue se comporta muito semelhantemente ao do homem. Eis um exemplo: *rhesus* 67: 0,1 cc. hemolyse total; 0,08 h. quasi total; 0,04 cc., ausencia de hemolyse. Inoculado com virus amarillico (mosquitos infectados) quatro dias após apresenta pela manhã 41º de febre. Dosagem da alexina: 0,1 cc. h. total; 0,08 h. q. t.; 0,04, ausencia de hemolyse. No dia seguinte temperatura 40º,5. Dosagem de alexina: 0,2 cc. h. t.; 0,15 hemolyse parcial; 0,1 cc. ausencia de hemolyse. No outro dia temp. 39º,9, sangue quasi incoagulavel, ausencia de hemolyse com 0,2 cc.

profunda da alexina (ausencia de hemo-lyse por vezes com 0,8 cc. de sôro puro). Pensamos por isso que entre a precocidade da diminuição da alexina e a precocidade de formação de anticorpos na febre amarella no homem, assim como, paralelamente, a falta desses dois phenomenos na febre amarella dos *rhesus*, existe uma relação intima que não é apenas méra coincidência. Attendendo, pois, a essas considerações é nossa opinião que n'esse periodo a diminuição da alexina possa correr por conta de uma reacção especifica no sôro do doente e contribuir para mais tarde determinar os phenomenos de choque anaphylactico (Sinval Lins (40)) que apparecem com a crise de temperatura (leucopenia, queda da pressão arterial, incoagulabilidade do sangue removivel como a do plasma de peptona pelos agentes thromboplasticos, desaparicação quasi completa da alexina, hypothermia, etc.).

—

O papel do figado como órgão essencial na producção da alexina foi posto em evidencia por Nolf (39), de um modo que não deixou margem a nenhuma duvida. Muller (14), mais tarde, em mag-nifico trabalho não só confirmou os resultados de Nolf como conseguiu mesmo obter producção de alexina de figados isolados de animaes e mantidos vivos á custa de uma circulação artificial.

Ora, na febre amarella o figado é sempre lesado e essas lesões não raro se extendem a todo o parenchyma hepatico. Não é crível que assim sendo deixe de haver uma forte insuficiencia hepatica na febre amarella. E' verdade que a resultado contrario chegou Lins (40) submettendo-se varios enfermos ás provas de levulosuria e galactosuria.

O facto de que no inicio da convalescença de casos benignos Lins encontra com essas provas uma insufficiencia hepatica manifesta no mesmo do-

ente que durante o periodo de molestia dias antes deu um resultado negativo, leva-me a crêr que a insuficiencia hepatica na febre amarella é com effeito consideravel, e que só essas provas de exploração hepatica na febre amarella são impraticaveis deante da intolerancia gastro-intestinal dos doentes. As mesmas lesões renaes que, ás vezes, são a causa immediata da morte são provavelmente resultado da intoxicação geral devida á deficiencia das funcções hepaticas como é provavelmente tambem o caso na atrophia amarella aguda do figado.

Como vimos acima, na febre amarella o que desaparece da alexina é apenas a sua fracção albumina; pois se dos trabalhos de Muller se verifica que nenhum órgão com excepção do figado é capaz de produzir alexina, os de Olsen (41) mostram que emquanto órgãos diversos, como o figado e baço, podem fornecer a fracção globulina, só o figado produz a fracção albumina. Não nos resta portanto a menor duvida de que a diminuição da alexina na febre amarella, pelo menos depois da crise que S. Lins com tanta felicidade approximou do choque anaphylactico, é um reflexo da debilidade funcional do figado. Julgamos mesmo possivel que desde a primeira phase da molestia, de par com uma fixação especifica *in vivo*, contribua tambem para a diminuição da alexina a incapacidade funcional em que já se possa encontrar esse órgão, e se como acima affirmámos e convictamente acreditamos a dosagem da alexina é de um alto valor para o prognostico na febre amarella, somos forçados a admittir que *a pathologia d'essa molestia gira exclusivamente em torno d'essa viscera e que é por conseguinte exclusivamente em consequencia da insufficiencia hepatica que os doentes morrem.*

—

A idea de que o teôr em alexina do sôro está na dependencia do processo de

coagulação do sangue deve-se a Metchnikoff. Todavia a opinião d'esse autor, segundo a qual a alexina é originaria dos leucocytos, cahiu em completo descredito, não sem um grande esforço e um grande dispendio de trabalho feito por parte de numerosos pesquisadores. Não só nos plasmas obtidos em tubos parafinados como pela addição de oxalatos e citratos, mas mesmo nos plasmas obtidos dentro dos vasos para impedir qualquer principio de coagulação, o teor em alexina é sensivelmente igual. De modo que a questão neste particular está hoje bem resolvida. Mas se esta ideia foi abandonada, as relações, que acaso possam existir entre a coagulação do sangue e a alexina são ainda ponto de duvida.

Desde 1908 Bordet e Delange (42) mostram-se impressionados pela semelhança de propriedades physico-químicas entre a alexina e o constituinte albuminoide da thrombina, mas pronunciam-se contra a sua identidade. Recentemente Fuchs, Hartmann e Falkenhausen (43), em numerosas publicações, insistem no assumpto e tendem a concluir das suas experiencias que a alexina ou um dos seus constituintes, a fracção globulina (Mittelstück), é também o constituinte albuminoide da thrombina (thrombogeno de Morawitz, serosima de Bordet e Delange, plamosina de Fuld e Spiro).

Abordamos também o assumpto neste particular por nos parecer que o sangue dos amarellentos poderia talvez contribuir para esclarecer este ponto. Das experiencias que executamos parece-nos licito concluir que, de facto, nem a fracção globulina, nem a fracção albumina da alexina representam o serosimã. Com effeito, obtivemos um resultado sempre uniforme com a experiencia a seguir:

Em uma serie de 5 tubos collocam-se 0,5 cc. de plasma de coelho oxalatado a 1 por 1000 tratado pelo phosphato tricalcico, isto é, isento de serosima. Ao primeiro tubo addicionam-se a seguir 1 cc.

de agua physiologica e 2,5 cc. de uma solução de chloreto de calcio (77 partes de agua physiologica e 33 de chloreto de calcio a 1%). Ao segundo tubo 1 cc. da fracção globulina da alexina (obtida pelo processo referido de Liefmann modificado por Braun, de plasma fresco de cobaia e oxalatado a 1 por 1000 e centrifugado 2 horas a 3.500 rotações) e 2,5 cc. de solução de calcio; ao terceiro tubo 1 cc. da fracção albumina do mesmo plasma oxalatado de cobaia e 2,5 cc. de solução de calcio; ao 4º juntaram-se 0,5 cc. da fracção globulina, 0,5 cc. da fracção albumina e 2,5 cc. da solução de calcio.

Resultado: no 3º tubo coagulação em 25 minutos, no 4º coagulação em 30 minutos. Os dois primeiros mantem-se fluidos mesmo após 24 horas.

E' pois evidente que a fracção globulina do plasma oxalatado de cobaia não contem o serosima que fica todo na fracção albumina.

Com o intuito de verificar si havia na fracção albumina, não serosimã mas thrombina já formada, foi feita a seguinte experiencia:

A uma serie de 5 tubos collocaram-se 0,5 cc. de plasma de coelho oxalatado a 1 por 1000. Addicionou-se ao 1º 1 cc. de agua physiologica; ao 2º 1 cc. da fracção globulina; ao 3º 1 cc. de fracção albumina e ao 4º 0,1 cc. de sôro fresco de cobaia.

Resultado: Coagulação no 4º tubo ao cabo de 12 minutos. Nos outros tres não houve coagulação mesmo após 6 horas.⁶

Em todas as experiencias de separação das fracções da alexina foram feitas testemunhas para demonstração de que

⁶ Convem acrescentar que por prolongada que seja a centrifugação do plasma de cobaia não se consegue impedir na fracção albumina a formação lenta de thrombina. N'ella fica também algum fibrinogenio, de modo que de um dia para outro n'ella apparece um pequeno coagulo de fibrina.

a separação era perfeita e que ambas se mantinham activas, isto é, verificava-se que adicionadas a globulos sensibilizados de carneiro nenhuma d'ellas separadamente mesmo na dose de 2 cc. dava traços de hemolyse ao passo que adicionadas na dose 1 cc. cada uma aos mesmos globulos sensibilizados a hemolyse era total ao fim de 15 a 20 minutos. Resulta pois que se algumas das fracções do complemento é um dos constituintes de thrombina só o pode ser a fracção albumina.

Quando não se ignora que o processo da hemolyse especifica determinado pela fracção albumina da alexina consiste provavelmente n'uma coagulação do stroma dos globulos, como parece resultar de algumas observações de Bordet (42) a hypothese de que essa mesma substancia determine a coagulação do fibrinogenio é muito attrahente. Entretanto uma experiencia já antiga de Bordet e Delange (42) falla contra essa maneira de ver e é que, si se retira de um sôro rico em serosima a alexina por meio de globulos sensibilizados, o liquido mostra ainda presença de serosima e é capaz de formar thrombina pela addicção de citosima.

Retomamos esta experiencia com o intuito de verificar se, sendo a mesma substancia a fracção albumina e o serosima, a presença de serosima se revela em titulo muito inferior ao da fracção albumina na hemolyse. Não é o caso.

Si se possui um plasma oxalatado de cobaia, que produz a hemolyse na dose de 0,02 e a coagulação do plasma phosphatado na dose de 0,01 cc., e si a elle se adicionam globulos sensibilizados em excesso e após uma hora de estufa a 37° se centrifuga, vê-se que mesmo na dose de 0,1 cc. esse liquido é incapaz de produzir a hemolyse de globulos hypersensibilizados (globulos + sensibilizadora + fracção globulina da

alexina) e não obstante na dose de 0,01 cc. continua a produzir a coagulação do plasma phosphatado recalcificado.

A' mesma conclusão leva o estudo do sôro dos doentes de febre amarella. Dada a escassez dos doentes só um sôro pudemos examinar n'este sentido. Esse sôro na dose de 0,2 cc. não dava mesmo traços de hemolyse com o systema hemolytico que sempre empregamos, mas pela addição da fracção albumina da alexina de cobaia era activo até a dose de 0,04 cc. O serosima d'esse sôro foi facilmente revelado em plasma de coelho phosphatado e recalcificado até com 0,01 cc., dose que tambem encontramos em dois sôros de individuos normaes.

E' sabido que a incoagulabilidade do sangue na febre amarella é devida em grande parte á existencia de anti-thrombina como o demonstrou Vellard e Vianna (45) e nós tivemos tambem oportunidade de observar.

Das nossas experiencias tambem, como acabámos de ver, chega-se á conclusão de que o constituinte albuminoide da thrombina pode conservar um teôr normal em um sôro que mostra uma baixa consideravel da alexina tanto em relação á fracção albumina quanto mesmo á fracção globulina.

Parece pois que estas observações afastam completamente a hypothese da participação dos constituintes do complemento na formação da thrombina e, portanto, que o processo de diminuição da alexina nenhuma relação immediata apresenta com as alterações da coagulabilidade do sangue na febre amarella.

CONCLUSÕES

1.—Accentua-se a importancia da quantidade absoluta de globulos sensibilizados, na dosagem da alexina quando se quer obter valores comparaveis pela leitura da hemolyse total.

2.—Na febre amarella a diminuição do poder alexico do sôro é um symptoma

constante, ás vezes mesmo já presente nas primeiras horas de molestia. Em um unico caso o teôr alexico foi normal e o diagnostico clinico de febre amarella parecia justificado. Ficou demonstrado no presente trabalho que o sôro desse doente não apresentou posteriormente propriedades preventivas, de modo que não se tratava com effeito de febre amarella.

3.—Embora sem nenhum elemento de prova, considera-se possivel a existencia de casos frustos em que tanto pela dosagem da alexina como pelos symptomas clinicos seja impossivel fazer o diagnostico de febre amarella.

4.—Nos convalescentes de febre amarella o teôr alexico normal do sôro se reconstitue rapidamente. A dosagem da alexina não serve por isso para o diagnostico retrospectivo da molestia.

5.—Existem estados morbidos distinctos de febre amarella, embora constituam raridade, em que a diminuição da alexina é pronunciada (atrophia amarella agúda do figado, intoxicações, malaria (?)) mas no inicio das molestias infecciosas agúdas (grippe, pneumonia, sarampo, febre typhoide, etc.) foi pelo contrario observado um ligeiro augmento do teôr alexico dos sôros.

6.—Observou-se sensivel baixa da alexina em um unico enfermo de malaria que com certeza nunca teve febre amarella.

7.—Em 5 outros casos se encontrou o teôr alexico diminuido e o diagnostico clinico foi *grippe* embora sem symptomas pulmonares. Não foi possivel verificar o poder preventivo d'esses sôros e portanto excluir a possibilidade da febre amarella.

8.—Do exame, portanto, dos 103 casos observados, a concordancia do diagnostico clinico com o da dosagem da alexina foi de 93,27 %. Dos 6,8 % de discordancias, em 0,97 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi negativo e o diagnostico clinico positivo, mas este estava

errado; em 0,97 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi positivo e o diagnostico clinico negativo estava sem nenhuma duvida certo; em 4,85 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi positivo ao passo que o diagnostico clinico foi grippe sem que se saiba com segurança com qual está a verdade.

9.—A dosagem da alexina é de grande valor para o prognostico porque quanto mais grave é o caso tanto mais baixo é o teôr alexico do sôro.

10.—A diminuição do teôr do sôro corre por conta principalmente de uma baixa no teôr da fracção albumina da alexina (Endstuck).

11.—Embora sem excluir a possibilidade de que a diminuição da alexina no sôro dos doentes seja devida a uma fixação da alexina sobre um complexo antigeno-anticorpo *in vivo*, opta-se pela hypothese de que seja sobretudo consequencia de uma perturbação funcional do figado de tal modo a baixa do teôr alexico se apresenta proporcional á gravidade de cada caso.

12.—Embora coincida frequentemente na febre amarella a incoagulabilidade do sangue com a baixa do teôr alexico do sôro, os dois processos são independentes. No sôro de um caso fatal com forte baixa do teôr alexico encontrou-se um teôr normal em serosima. Confirma-se que a incoagulabilidade do sangue nessa molestia é devida sobretudo á presença de anti-thrombina (Vellard e Viana).

13.—Os constituintes thermolabeis da alexina não parecem apresentar nenhuma relação immediata com o constituinte albuminoide da thrombina.

—————

Não devemos terminar sem expressar aqui o nosso reconhecimento ao professor Carlos Chagas e ao Dr. Carlos B. de Figueiredo pela efficaz assistencia e colaboração que prestaram a este trabalho.

Bibliographia

1. HAYDEN—citado por Goldner (5).
2. LESCHLY, 1916.—Zeitschr. f. Immunitätsf., vol. 25, p. 113.
3. LANGE, C., 1922.—Klin. Woch., vol. I, p. 1040.
4. BRINKMANN, 1922.—Centralbl. f. Bakt. orig., vol. 87, p. 50.
5. GOLDNER, M., 1929.—Deuts. Med. Woch., no. 10, p. 390.
6. EHRLICH u. MORGENROTH, 1901.—Berl. klin. Woch., p. 250.
7. METTALNIKOFF, 1900.—Ann. de l'Inst. Pasteur.
8. LUDKE, 1905.—Münch. med. Woch., pp. 2065 e 2126.
9. BERGMANN u. KENTHE, 1904.—Zeitschr. f. exp. Path. und Therapie, p. 255.
10. BENTIVENGA e CARINI, 1900.—Le Sperimentale, vol. 54, p. 490, citado por Muller (14).
11. ABBOT u. BERGEY, 1902.—Centralbl. f. Bakt., vol. 32, p. 260.
12. SWEET, 1904.—Centralbl. f. Bakt., vol. 35, p. 259.
13. FASSIN, 1907.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 62, p. 647.
14. MULLER, 1911.—Centralbl. f. Bakt., vol. 57, p. 577.
15. NAGELSCHMIDT,—citado em Sacho: Handb. d. pathog. Mikroorganismen, vol. 2, 2a, pag. 866.
16. TROMSDORF, 1902.—Centralbl. f. Bakt., vol. 32, p. 439.
17. LUDKE, 1904.—Centralbl. f. Bakt., vol. 37, p. 418.
18. MORO u. POTPESCHNIG, 1908. — Wiener med. Woch., pp. 31, 95 e 139.
19. ABEN-ATHAR, 1907.—As oscillações do complemento do sôro dos pestosos e seu valor prognostico. These. Rio de Janeiro.
20. MEYER u. EMMERICH, 1908.—Münch. med. Woch., Ref., p. 1700.
21. MORO u. NODA, 1909.—Münch. med. Woch., p. 545.
22. SZIMAI, 1925.—Jahrb. f. Kinderheilk., vol. 109, p. 317.
23. VINCENT—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 81, p. 379.
24. KOCH u. SMITH—citado por Goldner (5).
25. HUNTEMULLER—idem. idem.
26. COSTA CRUZ, J. da, 1929.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 101, p. 948.
27. COSTA CRUZ, J. da, 1929.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 101, p. 954.
28. NOLF, 1900.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 295.
29. COSTA CRUZ, J. da, 1929.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 102, p. 51.
30. FERRATA, 1907.—Berl. klin. Woch., vol. 44 p. 366.
31. DUNGERN—Münch. med. Woch., vol. 47, p. 677.
32. COCA, A., 1914.—Zeitsch. f. Immunitätsf., vol. 21, p. 604.
33. WHITEHEAD, GORDON and WORMALL, 1926.—Bioch. Journ., vol. 20, p. 1028.
34. BRAUN—Bioch. Zeitschr., vol. 31, p. 65.
35. SIMAM FELIX DA CUNHA, 1861.—Citado por P. F. da Costa Alvarenga. Anatomia, pathologia e symptomatologia da febre amarella, p. 137. Lisbôa.
36. MARCHOUX, SALIMBENI et SIMOND, 1903.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 665.
37. GABRITSCHESKY, 1896.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 630.

38. FROBISHER, 1929.—Proceed. of the Soc. f. Exp. Biol. and Med., vol. 26, p. 846.
 39. NOLF—citado por Muller, loc. cit. p. 634.
 40. LINS, S., 1929.—Arch. de Hyg. nº 1, p. 195.
 41. OLSEN, O., 1922.—Biochem. Zeitschr., vol. 183, p. 24.
 42. BORDET et DELANGE, 1912.—Ann. de l'Inst. Pasteur, vol 26, p. 744.
 43. FUCHS, HARTMANN u. FALKENHAUSEN, 1929.—Zeitschr. f. die gesamt. exp. Med., vol. 64, p. 227.
 44. BORDET, J., 1900.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 270.
 45. VELLARD e VIANNA, 1929.—Suppl. das Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, nº 7, p. 86.
-