

## LA REACCION DE RUBINO EN LA LEPRA \*

Por M. F. PIMENTEL IMBERT

Del Departamento de Bacteriología de la Escuela de Medicina Tropical de la Universidad de Puerto Rico.

En 1926, M. C. Rubino, de Montevideo, Uruguay, propuso un método para el serodiagnóstico de la lepra. Este consistía en poner suero de leproso en presencia de una suspensión de glóbulos rojos formolados de carnero en solución fisiológica. Dentro de un lapso de tiempo limitado se observa una sedimento-aglutinación, cuyo fenómeno solamente se produce cuando se utilizan sueros de individuos leprosos, permaneciendo los glóbulos formolados en suspensión en cualquier otro suero que no proceda de un enfermo de lepra. Esta es, esquemáticamente expuesta, la "reacción de Rubino".

Pero resultados poco concluyentes encontrados por diversos investigadores, y el hecho de darse algunas veces reacciones séricas positivas en sujetos no leprosos, hicieron que Rubino, según ulteriores publicaciones, perfeccionara su técnica.

Hemos querido comprobar la sedimento-aglutinación de los glóbulos rojos formolados del carnero (reacción Rubino) en la lepra y, para tal fin, nos propusimos ensayarla en un grupo de leprosos confirmados, controlando dicha reacción en un número de individuos sanos y en sujetos que padecían otras enfermedades.

### HISTORIA

En 1925 estudiaba Rubino la serología de la sífilis y observó que el suero de cierto sujeto precipitaba la caída de los glóbulos rojos formolados de oveja. Dicho suero resultó ser de un sujeto afecto de lepra.

Dice Rubino en su último trabajo publicado<sup>1</sup>: "Como ya lo he manifestado en publicaciones anteriores, [la reacción] tuvo origen en los trabajos que realizaba para despojar a los sueros humanos de su sistema hemolítico natural, a fin de practicar la reacción de Bordet-Wassermann con un sistema

\* Recibido en Redacción el 1ro. de junio de 1936.

hemolítico bien medido y sin necesidad de recurrir a la inactivación por el calor para privarlos también del complemento. La idea tiene como fundamento que los glóbulos de oveja en presencia de los sueros humanos fijarían las hemolisinas naturales y así sensibilizados por ese amboceptor fijarían también el complemento del propio suero; dejando en éste solamente el amboceptor que se deseaba investigar; en este caso era la "reagine" sifilítica.

Pero era necesario evitar la hemolisis de los glóbulos de oveja dentro del suero y para esto se hacía imprescindible fijar antes los glóbulos por una sustancia, que a la vez que fuera buen fijador de los tejidos, respetara en éstos sus cualidades antigénicas. Fué así que elegí el formol como fijador, porque gozaba en bacteriología del crédito de un buen conservador de las suspensiones microbianas destinadas a las reacciones de aglutinación."

Como hemos indicado antes, en el curso de sus investigaciones observó Rubino que, en un suero, los glóbulos no permanecían en suspensión como era lo frecuente, sino que caían al fondo del tubo al cabo de cierto tiempo, quedando el suero un poco clarificado. Llamóle la atención el fenómeno observado, averiguó el estado clínico del sujeto, y resultó ser un caso de lepra. Continuando sus observaciones notó que el mismo fenómeno se repetía a menudo en los sueros de individuos afectos de tan terrible enfermedad.

La primera comunicación ante la Sociedad de Dermatología y Sifiliografía de Montevideo fué hecha por Rubino en junio de 1926, y expone entonces solamente la frecuencia del hecho observado.

La primera técnica utilizada por el autor era la siguiente:

Tomaba una determinada cantidad de sangre desfibrinada de carnero. Reemplazaba el suero por una cantidad igual de solución fisiológica normal, marcándose el volumen resultante. Lavaba los glóbulos tres o cuatro veces con la misma solución. Se le adicionaba formalina (a razón del 10 por ciento) del volumen resultante y se dejaba a la temperatura del laboratorio por 24 horas. Se lavaban luego los glóbulos así formolados con solución fisiológica, por tres o cuatro veces, y se reconstituía el volumen primitivo con solución fisiológica. A 1 cc. de esta mezcla se adicionaba 1 cc. de suero y se le dejaba en la estufa a 37°C. durante una hora.

En los sueros de enfermos leprosos la precipitación de los glóbulos era rápida, verificándose antes de la hora. En los sueros de individuos sanos o afectados de otras enfermedades la precipitación era lenta, comenzando después de la hora.

Prosiguiendo sus trabajos encontró que en algunos sueros de sujetos no leprosos, la aglutino-sedimentación también se producía, pudiendo comprobar que, cuando esto ocurría, también eran aglutinados los glóbulos del carnero en estado natural, esto es, sin formolar, y que el fenómeno era debido a la presencia en esos sueros de una heteroaglutinina especial, que podía coexistir con la aglutinina específica de los sueros de leprosos. Basándose en este hecho perfeccionó la técnica empleada, utilizando entonces dos series de tres tubos con diluciones progresivamente crecientes de suero y una serie con glóbulos formolados y otra sin formolar para que sirviesen de control.

En el 1928, el profesor E. Marchoux y J. Caro <sup>2</sup>, al estudiar la reacción de Rubino usando la primera técnica descrita por el autor, obtienen resultados positivos en la mitad de los sueros de leprosos y negativos en los diversos sueros utilizados como control. Además de ésto, modifican la técnica de Rubino mezclando el suero leproso y la suspensión globular en la proporción de cinco partes de suero por una de suspensión globular.

Peltier <sup>3</sup>, siguiendo el primer método descrito por Rubino, y también la modificación introducida por el profesor Marchoux, encuentra con el primero un porcentaje positivo de 22 por ciento en 18 sueros de leprosos, y en 75 sueros de sujetos no leprosos la reacción fué negativa. Con la modificación de Marchoux obtuvo 33.3 por ciento reacciones positivas en 18 sueros de sujetos leprosos; en cambio, encuentra 17.3 por ciento reacciones también positivas en los mismos 75 sueros utilizados como controles.

Monacelli \* investiga 13 sueros leprosos y obtiene 12 reacciones positivas y todos los controles negativos.

En el 1929, J. Markianos <sup>4</sup> publica el resultado de sus investigaciones, encontrando un porcentaje bajo de reacciones positivas, pero reconoce su especificidad.

A. Cerqueira Luz <sup>5</sup> obtiene en 79 sueros de leprosos un 50 por ciento de reacciones positivas en los casos de lepra

\* Citado por Rubino.<sup>1</sup>

cutánea, 33.3 por ciento en los de lepra nerviosa y un 50 por ciento en la mixta. En un grupo de sueros controles, de sifilíticos y de tuberculosos no encontró ninguna reacción positiva.

En 1931 publica Rubino <sup>6</sup> un interesante trabajo sobre su reacción, donde da a conocer amplios e interesantes detalles de la misma, exponiendo minuciosamente ciertos detalles prácticos necesarios para la buena marcha de la reacción. Hace además un estudio de 36 casos de lepra en sus diversas manifestaciones y obtiene 27 casos positivos, 7 negativos y 2 dudosos. Usando como controles 304 sueros de diferentes enfermedades, la reacción permaneció constantemente negativa, a excepción de un solo caso en el que después de un estudio clínico minucioso se descubrió que el enfermo presentaba ambos nervios cubitales grandemente engrosados y procedía de una colonia francesa, donde había convivido con leproso.

Lepine, Markianos y Papayoannou <sup>7</sup>, publicaron sus observaciones de 118 casos de lepra, y aseguran haber obtenido un 50 por ciento de reacciones positivas, siendo de opinión de que la reacción de Rubino es absolutamente específica.

En 1932, A. Spanedda <sup>8</sup> publica un trabajo cuyas conclusiones están en completa contradicción con todos los que hemos mencionado a este respecto, negándole especificidad a la reacción. Spanedda encuentra solamente un solo caso positivo en 13 sueros de leproso y 9 casos positivos en los 76 controles usados. La técnica seguida por Spanedda no se ajusta por completo a la técnica original, lo que evidentemente puede explicar sus desfavorables conclusiones.

Los últimos trabajos realizados por Rubino <sup>1</sup> en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene en la Argentina, en 126 sueros de pacientes leproso, dice haber obtenido 78 positivos a la reacción, 47 negativos y 1 dudoso. Los 39 sueros de diversas enfermedades fueron todos negativos.

Bier y Arnold <sup>9</sup>, en un trabajo sobre la serología de la lepra, estudian la reacción de Rubino en 327 casos de lepra y encuentran en la forma nerviosa 29.3 por ciento positivos; 41.7 por ciento en el tipo maculo-anestésico; 56.6 por ciento en los casos mixtos; 66.6 por ciento en los nodulares y 13.8 por ciento en los casos incipientes. En 945 controles solamente encuentran 0.1 por ciento de reacciones positivas.

## TÉCNICA EMPLEADA POR NOSOTROS

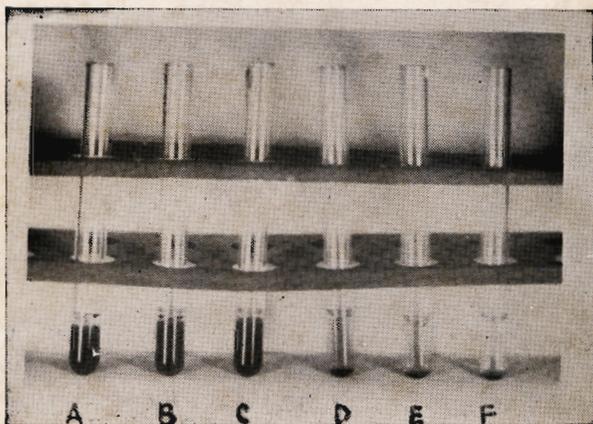
Hemos seguido estrictamente la técnica de Rubino, con su última modificación, en lo que se refiere a las diluciones del suero y la cantidad de suspensiones globulares para cada serie de tubos.

Para la preparación de las suspensiones globulares utilizamos sangre de oveja mantenida en el laboratorio. En cada sangría obteníamos de 30 a 35 centímetros cúbicos, sangrando al animal una o dos veces por semana. En todo momento la fórmula hemática del animal permaneció normal.

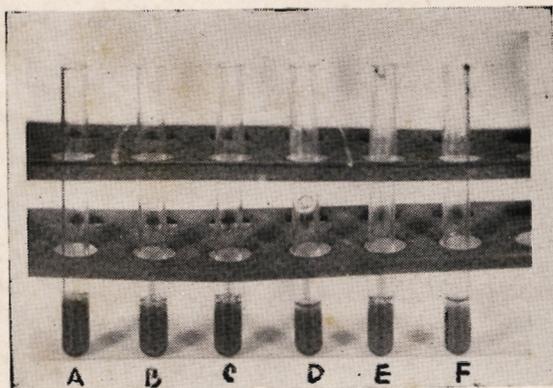
Para preparar los glóbulos formolados poníamos sangre desfibrinada en tubos estériles de centrifugación, de fondo redondo, de 50 mililitros de capacidad, marcando exactamente el volumen. Lavábanse los glóbulos cuatro veces con solución fisiológica al 0.85 por ciento. Después del último lavado se igualaba el volumen con solución fisiológica y se completaba con la misma solución hasta doblar el volumen original de sangre. Luego agregábamos lentamente, y siempre agitando la suspensión, formalina (formol al 40 por ciento) a razón de 10 por ciento del volumen resultante. Así preparados los glóbulos, se dejaban a la temperatura ambiente por 24 horas. Al cabo de ese tiempo, ya impregnados de formalina, eran lavados nuevamente cuatro veces. Para eliminar el sedimento pastoso formado por los glóbulos después de cada centrifugación, los sometíamos a una rotación prolongada hasta obtener una suspensión homogénea. Después del último lavado llevábamos esta suspensión con solución fisiológica, hasta obtener una concentración globular alrededor de 4,000,000 por milímetro cúbico.

Para la preparación de los glóbulos naturales procedíamos lavando por cuatro veces con solución fisiológica y elevando el volumen de la suspensión hasta obtener la concentración globular arriba mencionada.

Para la obtención de los sueros extraíamos de 5 a 8 cc. de sangre, que depositábamos en tubos estériles en la refrigeradora hasta el momento de proceder a la extracción del suero. Nunca los tubos con sangre permanecieron en la refrigeradora más de 24 horas. El suero se separaba lo más asépticamente posible, envasándolo en tubos estériles e inactivándolo por calentamiento a 52-53°C durante media hora.



Reacción fuertemente positiva al cabo de una hora.  
 Tubos A, B, C, cuyos glóbulos en estado natural permanecen en suspensión.  
 Tubos D, E, F, en que glóbulos formolados aparecen aglutino-sedimentados.



Reacción Negativa.  
 Tubos A, B, C, con glóbulos en estado natural, y  
 D, E, F, con glóbulos formolados en suspensión.

Los tubos y pipetas utilizados en las reacciones eran cuidadosamente esterilizados. Para cada reacción empleábamos 6 tubos de hemolisis; tres para los glóbulos formolados y tres con glóbulos naturales como testigos. Primeramente distribuíamos el suero, después la solución fisiológica, agitábase bien los tubos y agregábamos luego las suspensiones globulares, siguiendo el esquema que damos a continuación:

Tubos	1	2	3	4	5	6
Suero para examen.....	0.5	0.25	0.1	0.5	0.25	0.1
Solución fisiológica.....	0.2	0.45	0.6	0.2	0.45	0.6
Suspensión de glóbulos formolados.....	0.1	0.1	0.1			
Suspensión de glóbulos naturales.....				0.1	0.1	0.1

Se agitaban de nuevo los tubos y se ponían a la estufa a 37°C. La primera observación de los resultados se hacía a los 15 minutos, la segunda a los 30 y la última al cabo de una hora.

Clasificábamos como reacciones positivas las que solamente producían aglutino-sedimentación en la serie de los glóbulos formolados, o cuando era claramente más pronunciada en esta serie que en la de los glóbulos naturales. Negativas aquellas en que la aglutino-sedimentación no se producía. (El Grabado No. 1 muestra una reacción positiva; el No. 2 una negativa.)

Cuando observábamos la aglutino-sedimentación con igual intensidad en ambas series, procedíamos a la absorción de las heteroaglutininas siguiendo la siguiente técnica: Por cada centímetro cúbico de suero agregábase 0.5 de una suspensión de glóbulos naturales. Después de agitarlos se ponían en la refrigeradora durante una hora, volviendo a agitarlos de vez en cuando, tres o cuatro veces. Al sacarlos de la refrigeradora se centrifugaban y se hacía la reacción con el líquido decantado utilizando el siguiente esquema:

Tubos		
Suero.....	0.8	0.8
Suspensión de glóbulos formolados.....	0.1	
Suspensión de glóbulos naturales.....		0.1

## RESULTADOS OBTENIDOS

Para la preparación de este trabajo hemos practicado la reacción de Rubino en un número total de 278 sueros; de éstos, 47 eran de sujetos leprosos, bacteriológicamente confirmados; 214, de sujetos que padecían diversas afecciones y 17 de individuos normales.

## SUEROS DE ENFERMOS LEPROSOS

Las muestras de sangre de leprosos, obtenidas por nosotros, procedían de las siguientes sitios:

Del Leprocomio Insular de Puerto Rico.....	11
Del Leprocomio Nacional de la República Dominicana....	34
De la Clínica Dermatológica del Hospital de la Escuela de Medicina Tropical (San Juan Puerto Rico).....	2

Las tablas III y IV ilustran los casos de lepra estudiados por nosotros.

El número total de sueros de leprosos estudiados alcanzó a 47. De éstos, 33 fueron positivos a la reacción y 14 negativos, o sea un 70.21 por ciento de reacciones positivas.

En las distintas formas de lepra nuestros resultados fueron los siguientes:

19 casos de lepra tuberosa.....	16 positivos
10 casos de lepra mixta.....	7 positivos
16 casos de lepra nerviosa.....	10 positivos
2 casos de lepra máculo-anestésica.....	0 positivos

TABLA I  
PORCENTAGE OBTENIDO EN LAS DISTINTAS FORMAS DE LEPRAS

	Total	Positivos	Negativos	%
Lepra tuberosa.....	19	16	3	84.21
Lepra mixta.....	10	7	3	70.
Lepra nerviosa.....	16	10	6	62.5
Lepra maculosa.....	2	0	2	0.
Total.....	47	33	14	70.21

Como se ve en el cuadro anterior, la primera forma, la tuberosa, da un porcentaje de reacciones positivas de 84.21; la mixta, un 70 por ciento; y la nerviosa, un 62.5 por ciento. En la forma máculo-anestésica solamente tenemos dos casos, ambos negativos, uno de ellos casi curado y sin bacilos de Hansen en el moco nasal.

De los casos procedentes del Leprocomio de la República Dominicana, 2 están casi curados, persistiendo en uno de ellos la reacción.

En la Tabla II se exponen los resultados obtenidos con la reacción de Rubino por algunos investigadores en las distintas formas clínicas de lepra.

TABLA II  
PORCENTAGE EN LOS DIFERENTES TIPOS DE LEPROA ENCONTRADOS POR  
ALGUNOS INVESTIGADORES

Nombres	Tipo de lepra	Número de casos	Positivos	%
Rubino (6)	Tuberosa	18	16	88.88
	Mixta	10	8	80.
	Nerviosa	8	3	37.5
Lepine, Markianos y Papayoannou (7)	Tuberosa	70	49	70.
	Mixta	17	6	35.29
	Nerviosa	24	3	12.5
	Maculosa	7	1	14.28
Besta y Mariani (10)	Tuberosa	14	4	28.57
	Mixta	20	18	90.
	Nerviosa	12	2	16.66
Pimentel Imbert	Tuberosa	19	16	84.21
	Mixta	10	7	70.
	Nerviosa	16	10	62.5
	Maculosa	2	0	00.

A continuación damos una lista de diferentes investigadores y el porcentaje de reacciones positivas que han obtenido:

Nombres	Porcentaje de reacciones positivas
Marchoux y Caro	50.
Monacelli	92.3
M. Peltier	22.22
Rubino	75.
Zevallos	79.
Lepine, Markianos y Papayoannou	50.
Benetazzo	55.
Landeiro	98.
Rubino	61.9
Besta y Mariani	52.17
Pimentel Imbert	70.21

#### SUEROS UTILIZADOS COMO CONTROL

Hemos controlado la reacción en un total de 231 sueros pertenecientes a sujetos padeciendo diferentes enfermedades,

menos 17 en aparente estado de salud. La proporción entre los diferentes sueros examinados es la siguiente:

Suero de sujetos que padecían de tuberculosis.....	55
Sífilis (Kahn + + + +) sin tratamiento.....	31
Sífilis (Kahn + + + +) bajo tratamiento.....	57
Carcinomas .....	8
Uncinariasis .....	11
Esquistosomiasis.....	4
Cromoblastomycosis .....	2
Eczemas .....	6
Lupus eritematoso.....	4
Dermatomicosis diversas.....	7
Esprú .....	3
Gastroenteritis.....	6
Artritis.....	3
Leucemia linfoide .....	1
Cirrosis del hígado.....	1
Filariasis .....	1
Filaria .....	1
Arteriosclerosis.....	1
Embarazo normal.....	3
Otras enfermedades.....	9
Suero de sujetos normales.....	17

Los casos de tuberculosis, 51 procedían del Dispensario Antituberculoso de San Juan de Puerto Rico. Los casos de sífilis, 84 procedían del Dispensario de Enfermedades Venéreas (Puerta de Tierra, San Juan, Puerto Rico). Los tres de embarazo normales, de la Clínica San José, Santurce, Puerto Rico. Los demás sueros fueron obtenidos en los enfermos del Hospital de la Escuela de Medicina Tropical. Todos estos sueros fueron negativos a la reacción.

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

Hemos ensayado la reacción de Rubino en 278 sueros: 47 en sujetos leprosos confirmados, 214 en diversas enfermedades y 17 en individuos aparentemente en estado normal de salud.

La aglutino-sedimentación de los glóbulos rojos de oveja formolados, o reacción de Rubino, con su última modificación, nos ha dado un porcentaje de 70.21 por ciento en la totalidad de los casos de lepra que hemos estudiado.

En la forma tuberosa de la enfermedad la reacción es positiva en un 84.21 por ciento de todos los casos.

En la forma mixta hemos encontrado un 70 por ciento de positividad.

En la nerviosa hemos obtenido un 62.5 por ciento reacciones positivas.

La reacción fué siempre negativa en los casos que no padecían de lepra.

TABLA III  
CASOS PROCEDENTES DEL LEPROCOMIO DE SANTO DOMINGO (REP. DOM.)

No.	Iniciales	Edad	Sexo	Raza	Forma de lepra	Aglutino-Sedimentación
1	L. M. S.	30	M.	M.	Tuberosa	+++
2	L. M.	27	M.	M.	Tuberosa	+++
3	R. E. G.	31	M.	M.	Tuberosa	+++
4	J. B.	44	M.	N.	Nerviosa	+++
5	F. E. E.	52	M.	M.	Tuberosa	+++
6	L. A. C.	24	M.	N.	Mixta	---
7	M. C.	50	M.	N.	Mixta	+++
8	D. M.	31	M.	B.	Mixta	+++
9	N. U.	14	F.	B.	Tuberosa	+++
10	E. P.	65	M.	N.	Mixta	+++
11	J. S.	50	M.	M.	Mixta	---
12	S. A.	15	M.	B.	Nerviosa	---
13	R. R.	19	M.	M.	Mixta	---
14	M. M.	29	M.	N.	Mixta	+++
15	A. L.	42	M.	B.	Nerviosa	---
16	J. M.	24	M.	M.	Tuberosa	+++
17	M. A. F.	23	F.	N.	Tuberosa	+++
18	E. S. A.	33	F.	M.	Tuberosa	---
19	E. C.	39	F.	M.	Mixta	+++
20	J. F.	55	M.	M.	Nerviosa	+++
21	A. C.	17	F.	M.	Nerviosa	+++
22	J. S.	18	M.	M.	Tuberosa	+++
23	J. F.	50	M.	M.	Nerviosa	+++
24	L. A. T.	18	M.	M.	Nerviosa	+++
25	M. R. A.	35	F.	N.	Tuberosa	+++
26	E. M.	12	M.	N.	Nerviosa	---
27	E. M. O.	53	F.	N.	Mixta	+++
28	C. G.	52	F.	N.	Nerviosa	+++
29	L. F.	36	M.	N.	Tuberosa	+++
30	F. M.	35	M.	M.	Nerviosa	+++
31	C. R.	14	M.	N.	Nerviosa	---
32	R. R.	17	M.	M.	Nerviosa	+++
33	J. A. R.	24	M.	M.	Mixta	+++
34	F. G.	28	F.	N.	Nerviosa	+++

\*Caso clínicamente curado.

TABLA IV  
CASOS PROCEDENTES DEL LEPROCOMIO DE PUERTO RICO

No.	Iniciales	Edad	Sexo	Raza	Forma de lepra	Aglutino-Sedimentación
1	M. S.	40	M.	B.	Tuberosa	+++
2	R. P. P.	56	M.	B.	Nerviosa	---
3	V. A.	30	M.	B.	Tuberosa	---
4	M. R.	58	M.	B.	Tuberosa	---
5	P. E.	32	M.	B.	Nerviosa	---
6	M. M.	36	M.	B.	Tuberosa	+++
7	F. C.	23	F.	B.	Tuberosa	+++
8	E. O.	23	M.	B.	Tuberosa	+++
9	E. R. L.	51	F.	N.	Nerviosa	+++
10	C. S.	33	M.	B.	Tuberosa	+++
11	R. T.	24	M.	B.	Tuberosa	+++

DE LA CLINICA DERMATOLOGICA DEL HOSPITAL DE LA ESCUELA DE MEDICINA TROPICAL

1	G. R.	58	F.	B.	Maculosa	---
2	G. G*	36	F.	M.	Maculosa	---

\*Casi curada; Hansen negativo en el mucus nasal.

REFERENCIAS

1. RUBINO, M. C.: Arch. Urug. de Med. Cir. y Especialid., 5:414. 1934.
2. MARCHOUX, E. y CARO, J.: Ann. Inst. Pasteur, 42:542. 1928.
3. PELTIER, M.: Bull. Soc. Path. Exot., 21:836. 1928.
4. MARKIANOS, J.: Bull. Soc. Path. Exot., 22:152. 1929.
5. CERQUEIRA LUZ, A.: Brasil Med., 43:1526. 1929.
6. RUBINO, M. C.: Ann. Inst. Pasteur, 47:147. 1931.
7. LEPINE, P., MARKIANOS, J. y PAPAYOANNOU, A.: Bull. Soc. Path. Exot., 25:543. 1932.
8. SPANEDDA, A.: Rev. Sud-Americana de Endocrinol., 15:508. 1932.
9. BIER, O. y ARNOLD, K.: Arch. f. Schiffs-u. Trop. Hyg., 39:231. 1935.
10. BESTA, B. y MARIANI, G.: Gior. Ital. di. Mal. Esot. e Trop., 9:11. 1936.