

## **ESTUDO DA SENSIBILIDADE TUBERCULÍNICA EM COBAIOS NORMAIS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM *M. LEPRAE*, *M. LEPRAEMURIUM* E *M. TUBERCULOSIS* \***

W. A. HADLER\*\*  
L. M. ZITTI \*\*\*

Em oposição ao grande número de trabalhos de observação clínica sobre a sensibilidade do leproso à tuberculina, são pouco numerosas as contribuições experimentais, realizadas em animais; estas, além disso, são discordantes, não fazem referências à dose de bacilos inoculada e geralmente não indicam a concentração de tuberculina empregada, o que, provavelmente, relaciona-se com as referidas discordâncias. Por analogia com o que se verifica em relação ao *M. tuberculosis*, pode-se supor que a quantidade de bacilos injetada tem importância fundamental na sensibilização tuberculínica, principalmente se as micobactérias não se reproduzem nos tecidos do hospedeiro (bacilos mortos pelo calor, não patogênicos, etc.); o papel desempenhado pela concentração da tuberculina, utilizada na verificação da hipersensibilidade, constitui assunto bem estabelecido.

Foi pouco estudado o comportamento de cobaios inoculados com *M. leprae*, em face da injeção intradérmica de tubérculo-proteínas. Assinalou-se que o referido animal desenvolve sensibilidade à tuberculina quando injetado com esse bacilo (Nitto <sup>44</sup>) ; injeção intradérmica de suspensão rica em *M. leprae*, em cobaios normais tuberculino-negativos, produz, em todos os animais, positividade tuberculínica demonstrável pela injeção de 100,0 mg de tuberculina bruta (O.T.), havendo, certas vezes, lesões necróticas (Melson <sup>42</sup>). Ao contrário, a introdução de fragmentos de lepromas, no tecido subcutâneo de cobaios (Chaussinand<sup>16</sup>), não desenvolve sensibilidade à tuberculina; a injeção de 0,1 ml de "lepromina" por via intradérmica, não suscita sensibilidade tuberculínica no cobaio <sup>27</sup>, o que também ocorre com o cão <sup>24, 25</sup>.

De modo idêntico, são pouco numerosas as referências relacionadas com a observação da sensibilidade de cobaios inoculados com *M. lepraemurium*, quando injetados com tubérculo-proteínas; os resultados discor-

---

\* Trabalho realizado na Secção de Quimioterapia do Instituto Butantan.

\*\* Médico da Secção de Patologia Experimental do Serviço de Pesquisas Científicas do D.P.L., São Paulo, Brasil.

\*\*\* Assistente da Secção de Quimioterapia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

dantes provavelmente dependem também da dose de bacilos e da concentração da tuberculina, empregadas pelos diversos autores. Inoculações repetidas de suspensões de *M. lepraemurium*, no tecido subcutâneo de coelhos e cobaios, torna a maioria dos animais tuberculino-positivos (Tanguy <sup>60</sup>) Estes resultados são infirmados por Chorine, Mauze Grabar <sup>18</sup>, os quais concluem que o *M. lepraemurium* não sensibiliza cobaios aos bacilos tuberculosos, ou seus produtos.

A experimentação animal preenche os requisitos essenciais para o estudo da sensibilidade suscitada pelo *M. leprae* e *M. lepraemurium*; permite a utilização de animais isentos de contatos anteriores com micobactérias, nos quais são injetadas doses conhecidas dos bacilos; além disso, possibilita o emprêgo de via de inoculação que faculta amplo e extenso contato entre os bacilos e as células do hospedeiro e de tuberculina em diluição suficiente para evidenciar as reações de sensibilidade. Uma vez estabelecidos esses elementos torna-se possível não somente observar a ação sensibilizante, como determinar a "curva de sensibilidade" em função do tempo; variações estipuladas da quantidade de inoculum permitem correlacionar-se a dose com o desenvolvimento da hipersensibilidade.

Dados desta natureza poderão fornecer elementos menos criticáveis para o estudo, tanto da relação de "para-alergia", que se admite existir existir entre a tuberculose e a lepra <sup>26, 14, 15, 28</sup>, como das correlações imunológicas muito freqüentes entre as micobactérias; estas últimas são responsáveis pelas respostas cruzadas, proporcionadas por numerosos componentes do gênero *Mycobacterium*, inclusive do *M. leprae* <sup>38, 39, 40</sup>.

## MATERIAL E MÉTODO

Em 173 cobaios (145 fêmeas e 28 machos), com peso compreendido entre 220,0 e 600,0 g e em bom estado de saúde aparente, injetou-se 0,05 ml de tuberculina a 1/10 (5,0 mg de tuberculina bruta), por via intradérmica. Após ter sido verificado que nenhum dos animais apresentava sensibilidade à tuberculina, foram eles divididos em 4 lotes:

*Lote 1* — 59 cobaios injetados com suspensão de *M. leprae*, obtida a partir de lepromas cutâneos triturados e suspensos em solução de cloreto de sódio a 0,85%; a suspensão foi tamisada e conservada em frasco estéril (a 4°C.), sem ter sido submetida à temperatura de ebulição, desde o início até o final da preparação. A partir de uma amostra determinou-se o peso de bacilos contidos em 1 ml da suspensão. A determinação foi feita pelo seguinte processo: 10-20,0 ml da suspensão foram evaporados pelo calor (90-100°C.) e triturados em gral, em presença de 15-20 ml de clorofórmio; este foi aspirado e colocado em funil de separação; a trituração foi repetida por mais 3 ou 4 vezes, até o resíduo tissural mostrar-se livre de bacilos. Todo o clorofórmio reunido em funil de separação, foi

decantado durante 30 minutos e posteriormente centrifugado a 1.000 rpm. por 5 minutos e então separado cuidadosamente. O clorofórmio assim decantado contém bacilos e lípidos. Após evaporação pelo calor (60°C.), o resíduo seco (em presença de ácido sulfúrico), foi pesado; seu peso corresponde à grande maioria dos bacilos e aos lípidos extraídos, da amostra citada, pelo clorofórmio. Por este processo, que corresponde ao de Dharmendra <sup>21</sup>, ligeiramente modificado, consegue-se determinar o peso aproximado de bacilos contido em 1 ml da suspensão; não se trata de um método preciso, porquanto o clorofórmio extrai inclusive os lípidos teciduais (que também são computados no peso) e há pequena retenção de bacilos pelos resíduos de tecidos (após tratamento pelo clorofórmio), impossível de ser controlada pela simples bacterioscopia. Apesar disso, este método deve ser preferido, pois fornece melhores resultados que outros, cujo princípio da separação dos bacilos fundamenta-se em centrifugações repetidas e soluções de densidades diferentes.

Os animais deste lote foram subdivididos da seguinte maneira:

a) 10 cobaios inoculados por via intra-peritoneal com 3,0 ml de suspensão de leproma, contendo aproximadamente 10,0 mg de *M. leprae*;

b) 20 cobaios inoculados por via intra-peritoneal com 0,4 ml de suspensão de leproma, contendo aproximadamente 0,80 mg de *M. leprae*;

c) 10 cobaios injetados por via intradérmica com 0,05 ml de suspensão de leproma, contendo aproximadamente 0,17 mg de *M. leprae*;

d) 19 cobaios injetados por via intradérmica com 0,1 ml de "lepromina"\* (suspensão de lepromas fervida e fenolada a 0,5%), contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*. (A determinação do peso de bacilos foi feita pelo método descrito anteriormente).

*Lote 2* — 38 cobaios injetados com suspensão de *M. lepraemurium*, proveniente de lesões de ratos, trituradas e suspensas em solução de cloreto de sódio a 0,85%, tamisada e conservada em frasco estéril a 4°C.. Foi determinado o peso de bacilos por ml de suspensão, pelo mesmo processo descrito para o *M. leprae*.

Compreende os seguintes animais:

a) 20 cobaios inoculados por via intra-peritoneal com 3,0 ml de suspensão de lepromas de ratos, contendo aproximadamente 10,0 mg de *M. lepraemurium*;

b) 18 cobaios inoculados por via intra-peritoneal com 0,3 ml de suspensão de lepromas de rato, contendo aproximadamente 3,33 mg de *M. lepraemurium*.

---

\* A "lepromina" foi fornecida pelo Dr. M. de Souza Lima e preparada pelo método de Hayashi <sup>35</sup>.

Lote 3 — 51 cobaios injetados com suspensão de BCG.\*, em solução de cloreto de sódio a 0,85%; os animais foram assim divididos:

a) 20 cobaios inoculados por via intra-peritoneal com 3,0 ml de suspensão de BCG., contendo 10,0 mg de bacilos;

b) 31 cobaios injetados por via intra-peritoneal com 2,0 ml de suspensão de BCG., contendo 40,0 mg de bacilos.

Lote 4 — 25 cobaios normais, não inoculados; contrôles.

Todos os cobaios foram pesados periódicamente (cada 10 dias) desde o início da experimentação, cuja finalidade foi verificar possível interferência do estado geral sobre a hipersensibilidade.

Após a inoculação das referidas micobactérias foi repetida a intradermo-reação pela tuberculina, empregando-se 0,05 ml de tuberculina bruta a 1/10 e fazendo-se leituras após 24 e 48 horas; a determinação de sensibilidade tuberculínica foi feita várias vezes, em tempos sucessivos, de modo a permitir a observação do seu comportamento em função do tempo.

Os cobaios que morreram no decorrer da experimentação e os sacrificados especialmente após seu término, foram necropsiados e estudados macro e microscópicamente; o material foi fixado em solução de formol a 10,0%, incluído em parafina e corado pelo método da H.E. e Ziehl-Neelsen modificado.

## RESULTADOS

Lote 1 — Cobaios inoculados com *M. leprae*:

a) 10 cobaios injetados com aproximadamente 10,0 mg de bacilos, por via intra-peritoneal:

Leitura após	Diâmetros médios da reação tuberculínica, em milímetros				
	5 dias após inocul.	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	40 dias após inocul.	60 dias após inocul.
24 horas	4,8 ± 0,23 (σ = ± 0,74)	5,4 ± 0,53 (σ = ± 1,69)	9,6 ± 1,10 (σ = ± 3,48)	8,1 ± 0,90 (σ = ± 2,86)	4,4 ± 0,32 (σ = ± 1,01)
48 horas	3,7 ± 0,24 (σ = ± 0,75)	5,1 ± 0,43 (σ = ± 1,38)	7,8 ± 1,21 (σ = ± 3,82)	6,0 ± 0,76 (σ = ± 2,41)	2,4 ± 0,18 (σ = ± 0,58)

\* O BCG. foi preparado e fornecido pela Dra. Jandyra Planet do Amaral, do Instituto Butantan, a quem agradecemos.

Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura de 48 horas, em milímetros. N° de observações: 10.

Diâmetro em mm	5 dias após inocul.		15 dias após inocul.		30 dias após inocul.		40 dias após inocul.		60 dias após inocul.	
	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%
0,0 — 5,0	10	100,00	5	50,00	2	20,00	3	30,00	10	100,00
5,1 — 10,0	0	0,00	5	50,00	6	60,00	6	60,00	0	0,00
> 10,0	0	0,00	0	0,00	2	20,00	1	10,00	0	0,00

Os resultados expostos revelam que o *M. leprae*, na dose e via empregadas, suscita, no cobaio, hipersensibilidade tuberculínica demonstrável pela injeção intradérmica de 0,05 ml de O.T. a 1/10. A sensibilização se desenvolve gradativamente, atingindo a intensidade máxima no 30° dia após a inoculação; é pouco intensa, apresentando-se nítida em apenas 20,0% dos animais; tende precocemente ao desaparecimento, não sendo mais demonstrada no 60° dia após a inoculação.

b) 20 cobaios injetados com aproximadamente 0,80 mg de *M. leprae*, por via intra-peritoneal:

Leitura após	Diâmetros médios da reação tuberculínica, em milímetros		
	15 dias após inoculação	30 dias após inoculação	110 dias após inoculação
24 horas	6,5 ± 0,62 (σ = ± 2,79)	11,0 ± 0,26 (σ = ± 1,17)	2,1 ± 0,28 (σ = ± 1,28)
48 horas	3,4 ± 0,30 (σ = ± 1,36)	7,9 ± 0,56 (σ = ± 2,54)	0,6 ± 0,17 (σ = ± 0,80)

Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura de 48 horas, em milímetros. N° de observações: 20.

Diâmetro em mm	15 dias após inoculação		30 dias após inoculação		110 dias após inoculação	
	Nº absol.	%	Nº absol.	%	Nº absol.	%
0,0 — 0,5	17	85,00	2	10,00	20	100,00
5,1 — 10,0	3	15,00	13	65,00	0	0,00
>10,0	0	0,00	5	25,00	0	0,00

A injeção de suspensões contendo aproximadamente 0,80 mg de *M. leprae*, na cavidade peritoneal de cobaios normais, também provoca o desenvolvimento de sensibilidade à tuberculina, comparável à verificada nos animais inoculados com 10,0 mg de bacilos. No 30º dia após a inoculação a hipersensibilidade atinge os valores máximos; é pouco intensa na maioria dos animais (65,0%) e nítida em apenas 25,0%. No 110º dia não há mais manifestação de sensibilidade.

c) 10 cobaios injetados com aproximadamente 0,17 mg de *M. leprae*, por via intradérmica.

A reação tuberculínica, feita 40 dias após a inoculação, apresenta os seguintes resultados:

Leitura após	Diâmetro médio da reação tuberculínica, em milímetros
24 horas	4,3 ± 0,28 ( $\sigma = \pm 0,90$ )
48 horas	3,8 ± 0,18 ( $\sigma = \pm 0,57$ )

Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura de 48 horas, em milímetros. Nº de observações: 10.

Diâmetro em mm	Nº absol.	%
0,0 — 5,0	8	80,00
5,1 — 10,0	2	20,00
>10,0	0	0,00

A comparação dos resultados obtidos no 40º dia após a inoculação, com os observados no lote contrôle, revela que a dose de aproximadamente

0,17 mg de *M. leprae*, inoculada por via intradérmica, suscita hipersensibilidade muito discreta, em apenas 20,0% dos cobaios.

d) 19 cobaios injetados por via intradérmica com 0,1 ml de "lepromina", contendo aproximadamente 0,074 mg de *M. leprae*.

A sensibilidade tuberculínica determinada 40 dias após a injeção da "lepromina", forneceu os seguintes resultados:

Leitura após	Diâmetro médio da reação tuberculínica, em milímetros
24 horas	3,6 ± 0,05 ( $\sigma = \pm 0,24$ )
48 horas	2,6 ± 0,07 ( $\sigma = \pm 0,29$ )

Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura de 48 horas, em milímetros. N° de observações: 19.

Diâmetro em mm	N° absol.	%
0,5 — 5,0	19	100,00
5,1 — 10,0	0	0,00
> 10,0	0	0,00

A injeção de cobaios com 0,1 ml de "lepromina", contendo aproximadamente 0,074 mg de bacilos, não suscita sensibilidade às tuberculo-proteínas, em nenhum dos animais, quando a injeção de tuberculina é feita 40 dias após a inoculação.

Verifica-se, portanto, que a injeção intradérmica de uma única dose de "lepromina", não provoca, em cobaios, hipersensibilidade demonstrável por 0,05 ml de tuberculina a 1/10. Suspensão contendo dose 2,3 vezes maior de *M. leprae* (aproximadamente 0,17 mg), injetada pela mesma via, suscita discreta hipersensibilidade em apenas 20,0% dos animais. Suspensões com 0,8 mg de bacilos, ou mais, injetada por via peritoneal, sensibilizam 80,0-90,0% dos cobaios, sendo a sensibilidade geralmente discreta (reação com 5-10 mm de diâmetro em 60,0-65,0% dos casos).

Lote 2 — Cobaios inoculados com *M. lepraemurium*.

a) 20 cobaios injetados com aproximadamente 10,0 mg de bacilos, por via intra-peritoneal.

Leitura	Diâmetros médios da reação tuberculínica, em milímetros				
	5 dias após inocul.	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	40 dias após inocul.	60 dias após inocul.
24 horas	4,5 ± 0,25 (σ = ± 1,12)	7,5 ± 0,70 (σ = ± 3,13)	15,7 ± 0,76 (σ = ± 3,38)	15,6 ± 0,99 (σ = ± 4,42)	19,6 ± 0,78 (σ = ± 3,51)
48 horas	3,2 ± 0,60 (σ = ± 0,27)	6,0 ± 0,50 (σ = ± 2,25)	10,9 ± 0,52 (σ = ± 2,33)	11,5 ± 0,84 (σ = ± 3,76)	16,0 ± 0,63 (σ = ± 2,83)

Distribuição de frequência dos resultados da reação tuberculínica; leitura após 48 horas, em milímetros. N° de observações: 20.

Diâmetro em mm	5 dias após inocul.		15 dias após inocul.		30 dias após inocul.		40 dias após inocul.		60 dias após inocul.	
	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%
0,0 — 5,0	17	85,00	8	40,00	0	0,00	2	10,00	1	5,00
5,1 — 10,0	3	15,00	11	55,00	10	50,00	6	30,00	1	5,00
>10,0	0	0,00	1	5,00	10	50,00	12	60,00	18	90,00

A inoculação de 10,0 mg de *M. lepraemurium* em cobaias, por via intra-peritoneal, produz desenvolvimento de hipersensibilidade demonstrável pela tuberculina, a qual tem início 5 dias após a inoculação, em pequeno número de animais. No 30° dia 50,0% dos cobaias apresenta sensibilidade nítida, percentagem essa que se eleva nos dias subsequentes. A intensidade da sensibilização aumenta progressivamente até o 60° dia; é sensivelmente maior que a verificada nos cobaias inoculados com dose idêntica de *M. leprae*, atinge bem mais elevada proporção de indivíduos e perdura maior tempo.

b) 18 cobaias inoculados, por via intra-peritoneal, com aproximadamente 3,33 mg de *M. lepraemurium*.

Leitura	Diâmetros médios da reação tuberculínica, em milímetros				
	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	110 dias após inocul.	160 dias após inocul.	200 dias após inocul.
24 horas	7,7 ± 0,61 (σ = ± 2,61)	15,1 ± 1,01 (σ = ± 4,31)	19,4 ± 0,58 (σ = ± 2,48)	16,5 ± 0,66 (σ = ± 2,81)	10,0 ± 0,81 (σ = ± 3,47)
48 horas	3,8 ± 0,49 (σ = ± 2,08)	11,6 ± 0,69 (σ = ± 2,94)	15,9 ± 0,41 (σ = ± 1,74)	15,1 ± 0,46 (σ = ± 1,98)	7,1 ± 0,48 (σ = ± 2,06)



Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura após 48 horas após, em milímetros. N° de observações: 18.

Diâmetro em mm	15 dias após inocul.		30 dias após inocul.		110 dias após inocul.		160 dias após inocul.		200 dias após inocul.	
	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%
0,0 — 5,0	14	77,78	0	0,00	1	5,55	1	5,55	9	50,00
5,1 — 10,0	3	16,67	8	44,44	1	5,55	5	27,78	5	27,78
>10,0	1	5,55	10	55,55	16	88,89	12	66,67	4	22,22

A inoculação de *M. lepraemurium*, na dose assinalada, produz hipersensibilidade em cobaios, cujos caracteres são comparáveis aos observados em animais injetados com 10,0 mg de bacilos. A sensibilidade tuberculínica permanece estacionária até o 160° dia, decrescendo nitidamente no 200° dia.

Lote 3 — Cobaios injetados com *M. tuberculosis* (BCG.).

a) 20 cobaios inoculados com 10,0 mg de BCG., por via intra-peritoneal :

Leitura após	Diâmetros médios da reação tuberculínica, em milímetros				
	5 dias após inocul.	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	40 dias após inocul.	60 dias após inocul.
24 horas	$8,3 \pm 0,62$ ( $\sigma = \pm 2,79$ )	$10,7 \pm 0,47$ ( $\sigma = \pm 2,09$ )	$19,8 \pm 0,61$ ( $\sigma = \pm 2,72$ )	$17,9 \pm 0,89$ ( $\sigma = \pm 4,01$ )	$19,7 \pm 0,48$ ( $\sigma = \pm 2,15$ )
48 horas	$6,0 \pm 0,51$ ( $\sigma = \pm 2,27$ )	$9,0 \pm 0,67$ ( $\sigma = \pm 2,99$ )	$16,2 \pm 0,52$ ( $\sigma = \pm 2,31$ )	$15,5 \pm 0,75$ ( $\sigma = \pm 3,39$ )	$16,0 \pm 0,29$ ( $\sigma = \pm 1,32$ )

Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura após 48 horas, em milímetros. N° de observações: 20.

Diâmetro em mm	5 dias após inocul.		15 dias após inocul.		30 dias após inocul.		40 dias após inocul.		60 dias após inocul.	
	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%
0,0 — 5,0	7	35,00	2	10,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
5,1 — 10,0	13	65,00	10	50,00	2	10,00	6	30,00	4	20,00
>10,0	0	0,00	8	40,00	18	90,00	14	70,00	16	80,00

Os cobaios injetados com 10,0 mg de BCG., via intra-peritoneal, constituem termo de comparação no que se refere ao desenvolvimento e ao grau de sensibilidade tuberculínica. A sensibilização é pouco intensa no 5° dia, acentua-se no 15° e é nítida no 30° dia, na grande maioria dos animais (90,0%) ; do 30° até ao 60° dia o grau de hipersensibilidade permanece estacionário.

b) 31 cobaios inoculados com 40,0 mg de BCG., por via intra-peritoneal:

Leitura após	em milímetros Diâmetros médios da reação tuberculínica,				
	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	110 dias após inocul.	160 dias após inocul.	200 dias após inocul.
24 horas	9,2 ± 0,36 (σ = ± 2,01)	19,5 ± 0,31 (σ = ± 1,71)	20,8 ± 0,66 (σ = ± 3,68)	19,4 ± 0,49 (σ = ± 2,78)	9,4 ± 0,54 (σ = ± 3,02)
48 horas	6,5 ± 0,18 (σ = ± 1,01)	15,7 ± 0,29 (σ = ± 1,63)	17,2 ± 0,54 (σ = ± 3,03)	17,8 ± 0,38 (σ = ± 2,14)	6,4 ± 0,40 (σ = ± 2,24)

Distribuição de freqüência dos resultados da reação tuberculínica; leitura de 48 horas, em milímetros. N° de observações: 31.

Diâmetro em mm	15 dias após inocul.		30 dias após inocul.		inocul. 110 dias após		160 dias após inocul.		200 dias após inocul.	
	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%	N° ab.	%
0,0 — 5,0	14	45,16	0	0,00	0	0,00	0	0,00	15	48,39
5,1 — 10,0	9	29,03	10	32,26	2	6,45	2	6,45	9	29,03
> 10,0	8	25,81	21	67,74	29	93,55	29	93,55	7	22,58

Os resultados expostos constituem termo de comparação, principalmente no que se refere à "curva de sensibilidade" à tuberculina; os valores observados no 30° dia mantêm-se estacionários até o 160° dia, decrescendo depois.

Lote 4 — 25 cobaios normais, contrôles:



A injeção de tuberculina, na dose empregada (0,05 ml de O.T. a 1/10), em cobaios normais, produz pequenas reações cujos diâmetros são sempre inferiores a 5,0 mm, na leitura de 48 horas; há pequenas variações individuais. Os valores da média não ultrapassam a 3,5 mm (leitura de 48 horas), sendo geralmente inferiores a 3,0 mm.

O estudo comparado da sensibilidade tuberculínica produzida em cobaios, pelo *M. leprae*, *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis*, está sintetizado nos quadros 1 e 2 e nos gráficos 1 e 2. A inoculação de dose idêntica dos três bacilos (10,0 mg) suscita sensibilidade que se desenvolve com velocidade diferente; é mais precoce nos animais inoculados com BCG.,; o *M. lepraemurium* e principalmente o *M. leprae* suscitam sensibilidade mais lentamente. O grau de sensibilização é inferior para o *M. leprae*, em reação aos outros dois bacilos (observa-se que 15 dias após à inoculação não há reações tuberculínicas com diâmetro superior a 10,0 mm; no 30° dia há 20,0-25,0% de animais com reações nessas condições, percentagem essa que decresce no 40° dia e torna-se igual a zero no 60° dia).

Nos cobaios inoculados com *M. lepraemurium* são verificadas 5,0-5,55% de reações com mais de 10,0 mm no 15° dia após a inoculação; no 30° dia há 50,0-55,55% e no 60° dia 90,0% de reações nessas condições, percentual esse que se mantém até o 110° dia, decrescendo no 160° dia e principalmente no 200° dia. A "curva de sensibilidade" é comparável à produzida pela injeção de BCG., havendo apenas maior lentidão no desenvolvimento da sensibilidade, evidenciada pela fase ascendente da curva.

QUADRO 1 — DIÂMETROS MÉDIOS DA REAÇÃO TUBERCULÍNICA EM COBAIOS INOCULADOS, POR VIA PERITONIAL, COM APROXIMADAMENTE 0,8 MG DE *M. LEPRAE*, 3,3 MG DE *M. LEPRAEMURIUM* E 40,0 MG DE BCG.; COMPARAÇÃO COM CONTRÔLES NORMAIS. LEITURA DE 48 HS.

Cobaios inoculados com	Diâmetro médio da reação tuberculínica, em milímetros				
	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	110 dias após inocul.	160 dias após inocul.	200 dias após inocul.
<i>M. leprae</i> .....	3,4	7,9	0,6	—	—
<i>M. lepraemurium</i>	3,8	11,6	15,9	15,1	7,1
<i>M. tuberculosis</i> .	6,5	15,7	17,2	17,8	6,4
Contrôles .....	2,9	2,4	0,8	2,6	1,6

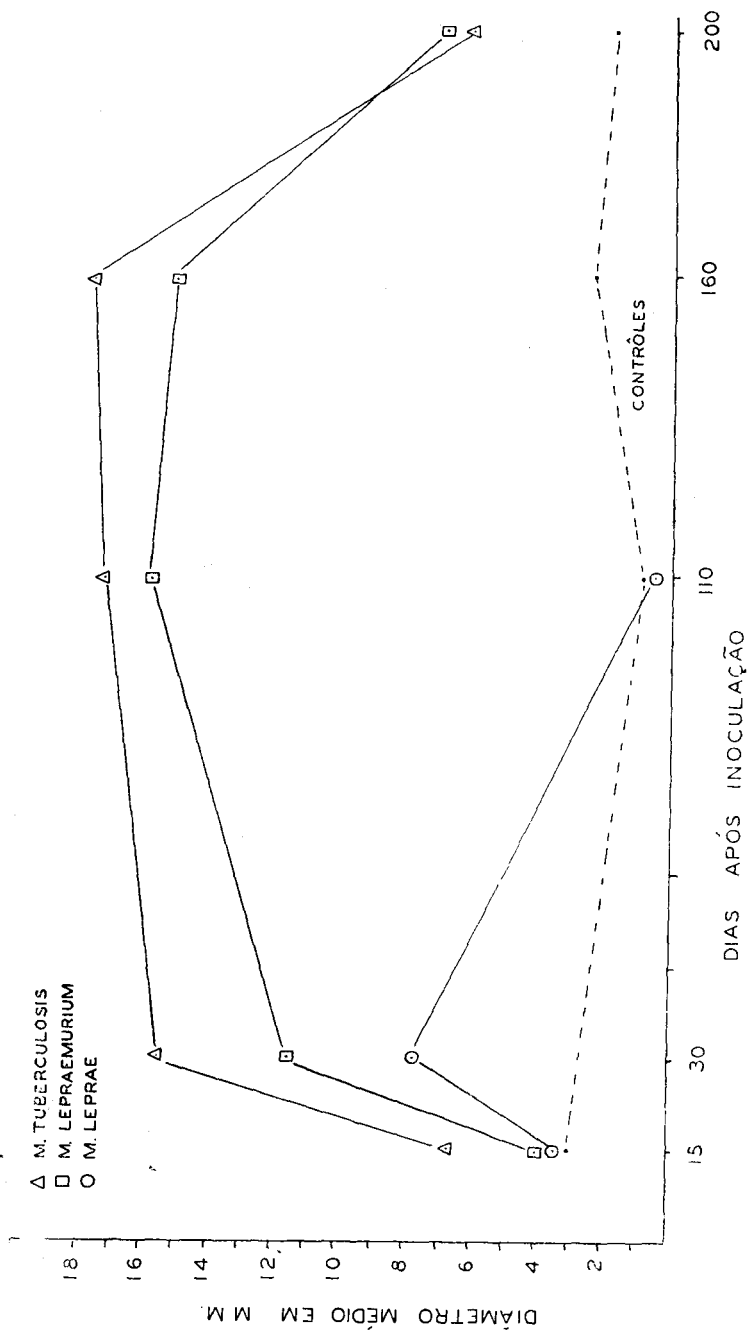


Gráfico 1 — Diâmetros médios da reação tuberculínica em cobaios inoculados, por via peritoneal, com aproximadamente 0,8 mg de *M. leprae*, 3,3 mg de *M. lepraemurium* e 40,0 mg de BCG.; comparação com controles normais. "Curva da sensibilidade tuberculínica"; leituras de 48 horas.

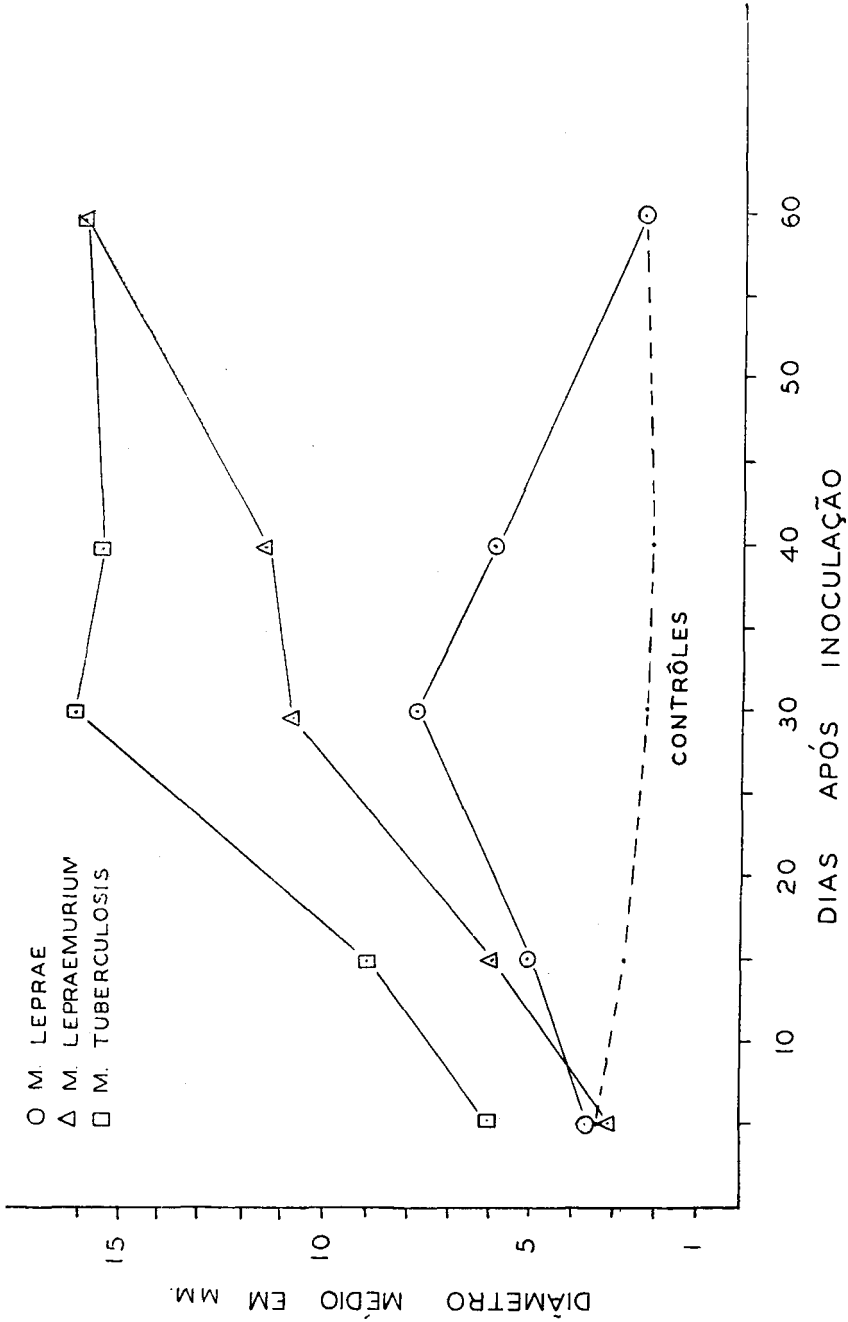


Gráfico 2 — Diâmetros médios da reação tuberculínica em cobaios inoculados com 10,0 mg de *M. leprae*, *M. lepraemurium* e *M. tuberculosis* (BCG.); comparação com controles normais. Desenvolvimento e grau de sensibilidade em animais injetados com ídenticos peso de bacilos. Leitura de 18 horas.

QUADRO 2 — DIÂMETROS MÉDIOS DA REAÇÃO TUBERCULÍNICA EM COBAIOS INOCULADOS COM 10,0 MG DE *M. LEPRAE*, *M. LEPRAEMURIUM* E *M. TUBERCULOSIS* (BCG.) ; COMPARAÇÃO COM CONTROLES NORMAIS. DESENVOLVIMENTO E GRAU DE SENSIBILIDADE EM ANIMAIS INJETADOS COM IDÊNTICO PESO DE BACILOS. LEITURA DE 48 HORAS.

Cobaios inoculados com	Diâmetro médio da reação tuberculínica, em milímetros				
	5 dias após inocul.	15 dias após inocul.	30 dias após inocul.	40 dias após inocul.	60 dias após inocul.
<i>M. leprae</i> . . . . .	3,7	5,1	7,8	6,0	2,4
<i>M. lepraemurium</i>	3,2	6,0	10,9	11,5	16,0
<i>M. tuberculosis</i> .	6,0	9,0	16,2	15,5	16,0
Contrôles . . . . .	3,5	2,9	2,4	2,2	2,4

A sensibilidade tuberculínica suscitada pelo *M. leprae* tende precocemente ao desaparecimento (no 60º dia não é mais demonstrável), ao contrário do que sucede com as outras duas micobactérias.

## DISCUSSÃO

*M. leprae* e o *M. lepraemurium* não são patogênicos para o cobaio; êsse fato não impede, porém, o estudo experimental da hipersensibilidade suscitada por essas duas micobactérias, no referido animal. Foi demonstrado por grande número de autores que diversos bacilos aar., não patogênicos para o cobaio, têm a propriedade de desenvolver sensibilidade demonstrável pela injeção intradérmica de tuberculina; apenas é necessário que a dose inoculada, a dispersão da suspensão e a via de inoculação, proporcionem amplo e intenso contato entre os bacilos e os tecidos do animal.

A simples introdução de micobactérias, no interior do organismo, não é suficiente para o desenvolvimento de hipersensibilidade tipo tuberculina; evitando-se contato íntimo entre os bacilos e as células do hospedeiro, mesmo através de artefatos experimentais, a sensibilização não se produz. Baldwin <sup>10</sup> demonstrou que a introdução de cápsulas porosas contendo *M. tuberculosis*, nos tecidos de animais, não suscita sensibilidade tuberculínica, apesar das cápsulas permitirem a difusão de substâncias de diversas naturezas, retendo apenas os corpos bacilares.

Por essa razão, para haver desenvolvimento de sensibilidade, nas infecções micobacterianas, julgou-se indispensável a formação do granuloma tuberculóide <sup>37, 63</sup>.

O granuloma tuberculóide é a conseqüência da lise bacilar no interior dos macrófagos; constitui a reação tecidual que sobrevém após a lise, devido ao estímulo proporcionado pelas substâncias libertadas pelos bacilos lisados <sup>32</sup>. A atuação do macrófago, isto é, a destruição dos bacilos no seu interior, parece constituir condição essencial para o desenvolvimento da hipersensibilidade. Ao contrário, a reação granulomatosa (com células epitelióides) constitui dependência principalmente da constituição química dos produtos libertados pela lise (que atuam como estímulos químicos); esta não parece essencial para o desenvolvimento da sensibilidade. Apenas há coincidência entre os dois fenômenos, nas lesões produzidas por micobactérias, porquanto a destruição dos bacilos pelo macrófago parece ao mesmo tempo responsável pelo desenvolvimento da hipersensibilidade e pela reação granulomatosa.

O papel desempenhado pelo macrófago no desenvolvimento da hipersensibilidade é corroborado pela verificação de que a tuberculina conjugada com lipo-polisacárides das cêras do *M. tuberculosis*, adquire a propriedade de suscitar sensibilidade tuberculínica <sup>19, 49</sup>; a tuberculina assim conjugada com substâncias insolúveis nos líquidos teciduais e de difícil eliminação, requer a intervenção direta do macrófago, em cujo citoplasma tem início a degradação da substância injetada; esta intervenção provavelmente está relacionada com a sensibilização <sup>33</sup>.

O macrófago do cobaio possui aptidão de lisar tanto o *M. tuberculosis* como o *M. leprae* e o *M. lepraemurium*; essas três micobactérias, quando inoculadas na cavidade peritoneal do referido animal, são fagocitadas por "macrófagos fixos" do peritônio e dos órgãos ricos em S.R.E <sup>33</sup> (principalmente fígado, baço e gânglios linfáticos); após a fagocitose os bacilos são lisados nos vacúolos citoplasmáticos do macrófago, sobrevivendo posteriormente a transformação em "células epitelióides". A injeção intradérmica dessas micobactérias também revela atuação direta do macrófago, que culmina com a destruição dos bacilos e a libertação dos seus constituintes químicos <sup>32</sup>.

Provavelmente devido às semelhanças apresentadas pelos radicais químicos (principalmente protéicos) que constituem as frações antigênicas das três micobactérias em estudo, a hipersensibilidade suscitada por qualquer delas pode ser evidenciada pela injeção intradérmica de tuberculina (sensibilidade cruzada) \*. Porém, cobaios inoculados com dose idêntica das referidas micobactérias, não se comportam da mesma maneira, em face da tuberculina; há diferenças de comportamento, cujas principais são as seguintes:

---

\* Relações antigênicas entre o *M. leprae* e o *M. tuberculosis* são também observadas quando se procede à reação de hemaglutinação em soros de leprosos, empregando-se a tuberculina como antígeno (Levine <sup>38</sup>).



a) *tempo que decorre entre a inoculação e as primeiras manifestações de sensibilidade*: este período ("Período ante-alérgico") é mais breve nos cobaios injetados com *M. tuberculosis* e mais longo nos animais inoculados com *M. leprae*; os cobaios injetados com *M. lepraemurium* aproximam-se dos primeiros;

b) *intensidade máxima da hipersensibilidade*: é atingida mais precocemente quando é injetado o *M. tuberculosis*, em relação aos outros dois bacilos;

c) *grau de sensibilização*: é comparável nos animais injetados com BCG. e *M. lepraemurium* e nitidamente inferior nos cobaios que receberam *M. leprae*;

d) *duração do período de hipersensibilidade*: é breve nos animais inoculados com *M. leprae*, nos quais não há sensibilidade tuberculínica demonstrável, 60 dias após a inoculação (essa ocorrência verifica-se quando ainda não existem lesões histológicas nos órgãos internos, produzidas pelos bacilos injetados <sup>33</sup>); o *M. tuberculosis* e o *M. lepraemurium* produzem sensibilidade que perdura maior tempo, declinando após o 160º dia (Tanguy <sup>60</sup> verificou declínio da sensibilidade, nos cobaios inoculados com *M. lepraemurium*., após o 3º mês, o que não confirmamos).

A reação tuberculínica é uma "reação de grupo", que abrange representantes do gênero *Mycobacterium*; porém, entre os componentes do gênero há variações de comportamento, responsáveis por diferenças idênticas às assinaladas na sensibilidade tuberculínica suscitada pelos três bacilos em estudo; elas não apresentam valor, isoladamente, para a classificação dos elementos pertencentes ao gênero. Por outro lado, o desenvolvimento de sensibilização cruzada, demonstrável pela tuberculina, permite apenas supor semelhanças nos radicais químicos de alguns constituintes antigênicos.

Chaussinand <sup>16</sup>, baseado no desenvolvimento de sensibilidade tuberculínica em cobaios, concluiu que o *M. lepraemurium* possui "propriedades antigênicas" próximas às do *M. tuberculosis*, ao contrário do *M. leprae*; por essa razão julga que a "alergia da lepra" difere da "alergia da tuberculose, para-tuberculose e lepra murina" e a lepra do rato melhor seria chamada "para-tuberculose do rato". Nossos resultados não confirmam o autor citado, porquanto as três micobactérias, *quando inoculadas em dose conveniente*, suscitam, em cobaios, sensibilidade demonstrável pela tuberculina.

A necrópsia realizada nos cobaios que morreram ou foram especialmente sacrificados, terminada a experimentação, mostrou sempre ausência macro e microscópica de lesões tuberculosas, inclusive nos animais inoculados com *M. leprae* e *M. lepraemurium* que haviam reagido fortemente à

tuberculina; esta verificação afasta a possível interferência de infecção tuberculosa nos resultados obtidos.

Em relação à lepra humana fôra observado, há mais de 60 anos, que os leprosos, em ausência de tuberculose, reagiam positivamente à injeção subcutânea de tuberculina <sup>8</sup>, que produzia reação geral e local, na maioria dos casos de lepra <sup>5</sup>; a reação geral apresentava-se com os caracteres clínicos da "reação leprótica" <sup>5,6,7</sup>. Esta verificação foi confirmada pela oftalmo-reação <sup>7</sup>, cuti-reação <sup>11</sup> e intradérmo-reação <sup>20</sup>, as quais geralmente mostravam-se positivas nos leprosos. Julgou-se permitido concluir que infecção pelo *M. leprae*, suscitaria, no homem, sensibilidade demonstrável pela tuberculina; essa ocorrência seria devido ao íntimo parentesco químico e biológico entre o *M. leprae* e o *M. tuberculosis* <sup>11</sup>, o qual seria responsável pela "co-sensibilização anafilática" por êles desenvolvida <sup>31</sup>.

Concomitantemente averiguou-se o papel desempenhado pela infecção tuberculosa, na reatividade dos leprosos à tuberculina; os resultados obtidos deram margem a conclusão bem diversa: a tuberculina produziria reação geral, ou local, em leprosos somente quando havia concomitante infecção (ou contato) tuberculosa <sup>43, 61, 56, 57, 58, 2, 46, 41,47</sup>. Concluiu-se que o *M. leprae* deveria ser excluído como causa da positividade da reação tuberculínica, sendo considerado o *M. tuberculosis* como único responsável pela reação, assinalada nos doentes de lepra.

A verificação de sensibilidade tuberculínica em coletividades leprosas, em comparação com coletividades não leprosas, com idade, *habitat*, etc., correspondentes, mostrou identidade de percentuais de positividade nos dois grupos <sup>34,12, 36, 23, 54, 22, 1, 3, 52, 30, 55, 13, 62, 59</sup>; estes resultados constituíram novo e forte argumento favorável à importância do *M. tuberculosis* e contrário à participação do *M. leprae* na reatividade do leproso à tuberculina. A observação clínica teria assim afastado, definitivamente, a infecção leprosa como fator responsável pela sensibilização às tubérculo-proteínas, qualquer que fôsse a forma clínica da lepra\*.

Segundo conceito atualmente dominante, a lepra, qualquer que seja sua forma clínica, não parece suscitar sensibilidade à tuberculina; isto é, o contato do organismo humano com o *M. leprae*, mesmo quando sobrepõe infecção clinicamente evidenciável, provavelmente não produz hipersensibilidade às tubérculo-proteínas. Este conceito, estabelecido pela observação clínica da maioria dos autores, não deve ser considerado como definitivo; é passível de críticas também fundamentadas na observação clínica, ou seja, não explica a verificação de reação geral (do tipo da "reação leprótica") e focal, nos casos de lepra injetados com tuberculina por

---

Em relação às duas "formas polares" da lepra (formas T e L), alguns AA. não assinalaram diferenças nos percentuais de positividade da reação tuberculínica a elas relacionada <sup>23, 26, 52 e 53</sup> outros observaram maior percentagem de reações positivas na forma T <sup>54, 50, 9 e 4</sup>, ou na forma L <sup>45</sup>.

via subcutânea <sup>43, 5, 31, 62</sup> ou intradérmica <sup>48,51</sup>. Relações de "para-alergia", ou de "alergia cruzada", entre a lepra e a tuberculose, são admitidas <sup>14, 15, 17, 29, 51</sup> baseadas principalmente na observação clínica.

Os resultados obtidos em cobaias revelam que o *M. leprae* suscita sensibilidade demonstrável pela tuberculina; talvez eles não sejam passíveis de transposição direta para o homem, porém devem ser considerados, principalmente por serem menos criticáveis.

#### SUMMARY

The tuberculin sensitivity of 173 guinea-pigs was determined by testing with 0.05 ml of 1/10 O.T.. These animals were inoculated with known doses of *M. leprae* or *M. lepraemurium* and the results were compared with reactions obtained in inoculated BCG., an in normal non-inoculated (control) guinea-pigs.

The bacillary contents of the *M. leprae* and *M. lepraemurium* suspensions were estimated by weighing the bacilli contained in 10-20 ml of the suspension, after chloroform separation.

The guinea-pigs were divided in four groups:

- Group 1 — 59 guinea-pigs inoculated with *M. leprae* suspensions as follows:
- a — 10 inoculated with suspension containing nearly 10.0 mg of bacilli by peritoneal route;
  - b — 20 inoculated with suspension containing nearly 0.8 mg of bacilli by peritoneal route;
  - c — 10 inoculated with suspension containing nearly 0.17 mg of bacilli by intra-cutaneous route;
  - d — 19 inoculated with "lepromin" containing 0.074 mg of bacilli (in 0.1 ml) by intra-cutaneous route.
- Group 2 — 38 guinea-pigs inoculated with *M. lepraemurium* suspensions as follows:
- a — 20 inoculated with suspensions containing nearly 10.0 mg of bacilli by peritoneal route;
  - b — 18 inoculated with suspensions containing nearly 3.33 mg of bacilli by peritoneal route.
- Group 3 — 51 guinea-pigs inoculated with BCG. suspensions as follows:
- a — 20 inoculated with suspension containing 10.0 mg of bacilli by peritoneal route;
  - b — 31 inoculated with suspension containing 40.0 mg of bacilli by peritoneal route.

Group 4 — 25 normal, non-inoculated, guinea-pigs (control-group) .

After inoculation tuberculin reaction was made periodically by intra-cutaneous injection of 0.05 ml of 1/10 O.T..

The results show that the inoculation of 0.8 mg and 10.0 mg of *M. leprae*, by peritoneal route, suscitated tuberculin hypersensitivity in guinea-pigs, which presents the following characteristics:

- 1 — slow development attaining its maximum 30 days after inoculation;
- 2 — weak tuberculin reactions in 60.0-65.0 per cent of the animals and well-established in only 20.0-25.0 per cent;
- 3 — short duration, waning after the 30th day and disappearing on the 60th day;
- 4 — the degree of tuberculin sensibility suscitated by *M. leprae* is weaker compared with the degree of sensibility suscitated by the same dose of *M. lepraemurium* or BCG.

The intra-cutaneous injection of suspensions containing nearly 0.17 mg of *M. leprae* shows weak tuberculin hypersensitivity 40 days after inoculation in only 20.0 per cent of the animals; the intra-cutaneous injection of 0.1 ml of "lepromin" containing nearly 0.074 mg of bacilli did not suscite any tuberculin hypersensitivity.

The peritoneal inoculation of suspensions containing nearly 3.33 mg and 10.0 mg of *L. lepraemurium*, suscitated tuberculin hypersensitivity in guinea-pigs showing the following characteristics:

- 1 — slow development, increasing the size of reactions up to the 60th day after inoculation;
- 2 — well-established sensibility in 90.0 per cent of the animals and weak in only 5.0 per cent;
- 3 — the intensity of sensibility remains unalterable up to the 160th day after inoculation, waning at the 200th day;
- 4 — the tuberculin hypersensitivity suscitated in guinea-pigs by *M. lepraemurium* reaches identical degree as compared with the one suscitated by the same dose of BCG.

The tuberculin hypersensibility shown by guinea-pigs inoculated with *M. leprae* and *M. lepraemurium* depends on two factors:

- a — the macrophage ability to destroy these bacilli, which has great importance in the establishment of the state of hypersensibility (this state and the special type of tissue cellular reaction seem to be consequences of the bacillary lysis by the macrophages) ;

- b — the similarity of chemical composition of some antigenic fractions of *M. leprae* and *M. lepraemurium*, as compared with *M. tuberculosis* (this similarity is responsible by co-sensitization).

The microscopic pictures of guinea-pigs examined after the end of experimentation never show tuberculous lesions.

The clinical observations of the tuberculin sensitivity in human leprosy do not allow definite conclusions to be drawn, because there are many discordances. Experimental studies in guinea-pigs perhaps are not directly applicable to human beings, but they are subject to less criticism because: it is possible to work with animals without previous contact with Mycobacteria, to inoculate them with known dose of bacilli and to use concentrated tuberculin to verify the sensibility.

#### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Adant, M. — La cuti-réaction à la tuberculine chez les lépreux. Compt. rend. Soc. Biol. 108:447, 1931
2. Amaral, E. & Paranhos, U. — L'ophtalmo-réaction par la tuberculine dans la lèpre. Bull. Inst. Pasteur 6:210, 1908
3. Ambrogio, A. — Alcune osservazioni cliniche e sperimentali sui fenomeni allergici nell'infezione lebbrosa. Pathologica 25:514, 1933
4. Austin, C. J. — The tuberculin reaction in patients of the Fiji Leprosy Hospital. Internat. J. Leprosy 19:45, 1951
5. Babes, V. — Au sujet de la réaction des lépreux à la tuberculine. Compt. rend. Soc. Biol. 67:411, 1909
6. Babes, V. — Sur la signification de la réaction des lépreux à la tuberculine. Compt. rend. Soc. Biol. 66:641, 1909
7. Babes, V. — Sur des réaction réputées comme spécifiques dans la lèpre. II Conf. Internat. de la Lèpre 3:321, 1909. Lepra 11:321, 1910
8. Babes, V. & Kalindero, N. — Ueber die wirkung des Kochschen Heilmittels bei Lepra. Deutsch. med. Wchnschr. 17:115, 1891
9. Badger, L. F., Patrick, D. W., Fite, G. L. & Wolfe, D. — Leprosy: two strains of acid-fast bacilli isolated from a case of human leprosy. A comparison with other strains of acid-fast organisms with particular reference to the Lleras bacillus. Natl. Inst. Health Bull. 173:1, 1940
10. Baldwin, E. R. — Investigation into the nature of tuberculin sensitiveness. Trans Natl. Tuberc. Assoc. 7:351, 1911
11. Brinkerhoff, W. It. — The reaction of lepers to Moro's "percutaneous" test. Publ. Health Bull. 26:15, 1908
12. Bruusgaard, E. — Beitrag zur Kenntnis der tuberculoiden Lepra. Arch. f. Dermat. Syph. 129:225, 1921
13. Budiansky, E. — Comportamento da alergia tuberculínica em filhos de leprosos, após calmetização. Rev. Brasil. Leprol. 17:27, 1949

14. Chaussinand, R. — Para-allergies bactériennes dans la tuberculose. Ann. Inst Pasteur 73:814, 1947
15. Chaussinand, R. — Une nouvelle réaction d'allergie dans la tuberculose Ann. Inst. Pasteur 73:811, 1947
16. Chaussinand, R. — L'infection murine due au bacille de Stefansky n'est pas une "lèpre". Bull. Acad. Med. 132:486, 1948
17. Chaussinand, R. — La réaction de Mitsuda, indice de l'immunité relative anti-lépreuse. Acta Tropica 5:160, 1948
18. Chorine, V., Mauze, J. & Grabar, P. — Pouvoir toxique comparatif des extraits obtenus après l'action des ultra-sons sur les bacilles de Koch et de Stefansky. Bull. Soc. Path. Exot. 40:428, 1947
19. Choucroun, N. — Tuberculosis allergy induced in human with chemical constituent of tubercle bacillus. Fed. Proc. 11:464, 1952
20. Cummins, S. L. & Le Roux, J. J. P. — Intradermal tests with extract of leprosy skin in cases of leprosy and in non-lepers. Tubercle 11:299, 1930
21. Dharmendra — Studies of the Lepromin test. III. Preparation and standardization of lepromin. Leprosy in India 13:77, 1941
22. Dubois, A. — La cuti-réaction à la tuberculine chez les lépreux. Notice préliminaire. Ann. Soc. Beige Med. Trop. 12:1, 1932
23. Evans, K. L. — The tuberculin reaction in leprosy. Brit J. Dermat. Syph.42:443, 1930
24. Feldman, W. H., Karlson, A. G. & Grindlay, J. H. — The Mitsuda reaction in dogs from a non-leprosy area. Mem. V Cong. Internat. Lepra, La Habana, 1949, pág. 621.
25. Feldman, W. H., Karlson, A. G. & Grindlay, J. H. — Mitsuda's reaction with experimental observations in dogs. Ann. New York Acad. Sci. 54:53, 1951
26. Fernandez, J. M. M. — Estudio comparativo de la Reacción de Mitsuda con las reacciones tuberculínicas. Rev. Argentina Dermatosif. 23:425, 1939
27. Fernandez, J. M. M. — Relaciones inmuno-alérgicas entre tuberculosis y lepra. Actas Dermato-sifil. 43:471, 1952
28. Floch, H. — Rapport sur fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de la Guyane Française et du Territoire de l'Inini pendant l'année 1951. Lèpre-Phylaxie antilépreuse par la vaccination B.C.G. Arch. Inst. Pasteur Guyana Franç. et Inini, Publ. n° 262:149, 1952
29. Floch, H. & Destombes, P. — Reaction de Mitsuda et de von Pirquet. Rev. Brasil. Leprol. 18:181, 1950
30. Floch, H. & Lajudie, P. — Cuti-réaction à la tuberculine. Vaccination sous-cutanée par le B.C.G. chez les lépreux. Arch. Inst. Pasteur Guyana Franç. et Inini, Publ. n° 44:3, 1942
31. Gougerot, M. — Anaphylaxie lépreuse. Lepra 13:211, 1913
32. Haller, W. A. — Comportamento do cobaio e do rato, normais, injetados com "lepromina" por via intradérmica. Rev. Brasil. Leprol. 21:165, 1953
33. Hadler, W. A. & Ziti, L. M. — Trabalho em publicação
34. Hall, F. — Ann. Med. Report, Figi, 1917; Suva, 1918; citado por Austin, loc. cit

35. Hayashi, F. — Mitsuda's skin reaction in leprosy. *Internat. J. Leprosy* 1:31, 1933
36. Igarashi, M. — The Pirquet's reaction in cases of leprosy. *La Lepra* 1:141, 1930
37. Krause, A. K. — The nature of resistance of tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 1:65, 1917
38. Levine, M. — Hemagglutination of tuberculin sensitized sheep cells in Hansen's disease (leprosy). *Internat. J. Leprosy* 19:199, 1951
39. McKinley, E. B. — (Committee) Summary report on antigenic skin tests in leprosy. *Month. Bull. Bur. Health (Manilla)* 17:265, 1937
40. McKinley, E. B. — The present status of diagnostic skin tests in leprosy. *Internat. J. Leprosy* 6:83, 1938
41. Meier, G. — Serologische Untersuchungen bei Lepra. *Lepra* 11:334, 1910
42. Melson, R. — Experiments in inoculating guinea-pigs With leprosy material. *Acta Dermato-venereal.* 20:451, 1939
43. Nicolle, C. — Réaction à la tuberculine dans la lèpre. Inoculation souscutanée, dermique et conjonctivale. *Comp. rend. Acad. Sci.* 145:394, 1907
44. Nitto, S. — Studien ueber die Hautreaktion and Allergie bei Lepra. II. Beitrage zur experimentellen Untersuchung ueber die Allergie zwischen den Leprabazillen, Alttuberkulin and den anderen säurefesten Bazillen. *La Lepro* 8:35, 1937
45. Oliveira Lima, S. de & Fontes Magarão, M. — Cutirreação à tuberculina em doentes de lepra. *Clin. Tisiol.* 7:65, 1952
46. Perrin, L. — La lèpre à Marseille. *Lepra* 11:69, 1910
47. Photinos, G. & Michaelides, N. — La séro-réaction de Wassermann et la cutiréaction de Pirquet dans la lèpre. *Lepra* 12:207, 1912
48. Rabello Jr. — Novas observações sôbre a infecção tuberculosa na lepra. *Rev. Brasil. Leprol.* 5:465, 1937
49. Raffel, S. — Chemical factors involved in the induction of infectious allergy. *Experientia* 6:410, 1950
50. Rai, S. — Tuberkulose infektion Leprakranker im Lichte der Mantoux' schen Reaktion. *La Lepro* 9:35, 1938
51. Rosemberg, J., Souza Campos, N. & Aun, J. N. — Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. VIII. Positivização remota do Mitsuda por efeito da vacinação BCG. oral. *Rev. Brasil. Leprol.* 20:84, 1952
52. Rotberg, A. — Estudos sôbre as reações tuberculínicas na lepra. *Rev. Brasil. Leprol.* 6:245, 1938
53. Rotberg, A. & Bechelli, L. M. — Tratado de leprologia. Etiopatogenia e Anatomia patológica. *Publ. Serv. Nacional Lepra, Rio de Janeiro*, 2:189, 1944
54. Sakurai, H. — Tuberculin reaction in lepers. *La Lepra* 2:73, 1931
55. Sayago, G. — Resultados de provas tuberculínicas em filhos de leproso do Preventório "Amparo Santa Cruz" de Porto Alegre, Brasil. *O Hospital* 32:163, 1947
56. Slatineanu, A. & Danielopolu, D. — Réction des lépreux à la tuberculine. Injection sous-cutanée et ophtalmo-réaction. *Compt. rend. Soc. Biol.* 65:528, 1908

57. Slatineanu, A. & Danielopolu, D. — Sur la reaction des lépreux à la tuberculine. *Compt. rend. Soc. Biol.* 64:149, 1907
58. Slatineanu, A. & Danielopolu, D. — Sur la reaction des lépreux à la tuberculine. Réponse à la critique de M. Babes. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 67:149, 1909
59. Souza Campos, N., Rosemberg, J. & Aun, J. N. — Da relação imunobiológica entre tuberculose e lepra. II. Da interrelação entre reações tuberculínicas e lepromínicas em filhos de doentes de lepra. *Rev. Brasil. Leprol.* 18:117, 1950
60. Tanguy, Y. — Réaction à la tuberculine chez le cobaye et le lapin inoculés avec des bacilles de Stefansky. *Bull. Soc. Path. Exot.* 30:836, 1937
61. Uriarte, L. — Dos nuevos métodos biológicos para el diagnóstico de la tuberculosis. *La Semana Med.* 33:233, 1907
62. Wade, H. W. — Reactions to tuberculin in leprosy. A review. *Internat. J Leprosy* 18:373, 1950
63. Zinsser, H. & Bayne-Jones, S. — *A Testbook of Bacteriology*. D. Appleton-Century Co., New York, 1939