

LEPROMINA (*)

Estudos experimentais

MOACIR DE SOUZA LIMA

**Chefe do Laboratório de Microbiologia do
Serviço de Profilaxia da Lepra de S. Paulo**

No estudo da reação de Mitsuda, a maioria dos autores tem se preocupado com os seus resultados na clínica, deixando de lado o estudo do antígeno.

Empregado o test de Mitsuda, na rotina, desde 1924, entretanto até hoje, a técnica na preparação do antígeno não foi uniformizada, a sua padronização não foi conseguida e a interpretação dos seus resultados varia de autor para autor. Que a uniformidade na técnica de preparação do antígeno é necessária, basta citar o seguinte: quanto maior é o tempo de trituração do tubérculo, melhor é a qualidade do antígeno. Um tubérculo dividido em 2 partes, se uma das partes é triturada durante 1/2 hora e a outra, 1 hora; esta última porção dá um antígeno mais ativo que a primeira. Dependendo a reação do número de germes existentes, segundo a opinião de muitos autores, é óbvio, que um antígeno com uma grande quantidade de germes dê melhores resultados que um outro em que a quantidade de germes seja menor. Infelizmente, a padronização do antígeno, seguindo a técnica atual no seu preparo, é impossível.

O método de comparação usado para contagem de germes nas vacinas de Wright, preconizado por GIL E MENDES, em trabalho recente, não pode servir de base para a padronização do antígeno. Não é possível contar os bacilos de Hansen existentes na globias, sendo já difícil contá-los nos aglomerados. Este método pode dar até 40% de erro, na contagem dos bacilos. A quantidade de soro fisiológico usada para fazer a suspensão da massa triturada do tubérculo, tam-

(*) Trabalho apresentado à Reunião dos Médicos do Serviço de Profilaxia da Lepra de São Paulo, de 1939.

bém varia segundo os autores. Uns usam o sôro fisiológico na proporção de 1 gr. de tubérculo para 20 cc. de sôro-5% (MITSUDA-HAYASCHI), outros na porpoção de 1/2 gr. de tubérculo para 100 cc. de sôro fisiológico-1/2% (MUIR).

E' claro, que, partindo-se do mesmo material o antígeno feito na base de 5% terá mais germes por cc. que o feito na base de 1/2%, sendo assim mais ativo.

Dada a grande dificuldade de padronização do antígeno da reação de Mitsuda procurei separar as substâncias ativas do antígeno. A técnica foi a seguinte: o tubérculo, depois de seco em vácuo e finamente triturado, foi tratado em Soxhlet pelo alcool, éter, clorofórmio e acetona.

O solvente foi filtrado, evaporado e o solvido suspenso em sôro fisiológico e injetado, de acôrdo com a técnica usada nas intradermo reações na dose de 0,1 cc. As substâncias dissolvidas foram diluídas em sôro fisiológico na base de 1/2%, acompanhando a diluição da lepromina usada atualmente no S. P. L.

Nesta série de experiências observei os seguintes fatos.

1.º — A parte alcool-solúvel do tubérculo dá as mesmas reações que a lepromina total, isto é, positiva quando a reação à lepromina é positiva ; apenas a intensidade da reação é menor, havendo concordância nas reações fortemente positivas.

2.º — A parte éter-solúvel não acompanha a reação à lepromina.

3.º — A parte acétono-solúvel também não acompanha o test. Interessante que com a parte acétono-solúvel, os doentes apresentam na 1.ª semana e às vêzes na 2.ª, reações locais intensas.

4.º — A parte que se solubiliza no clorofórmio é a mesma que se dissolve no alcool. Os resultados obtidos são mais ou menos idênticos aos observados com a parte alcool-solúvel.

5.º — Por mais demorada que seja a extração a quente pelos solventes acima, o residuo ainda apresenta raros bacilos de Hansen e o antígeno feito com êste residuo, em alguns casos de Mitsuda positivo, dá reações positivas fracas.

N.º	Nome	Mitsuda	Alcool	Cloro- fórmio	Êter	Acetona	Residuo
1	J.M.P.	—	—	—	—	—	—
2	A.P.	—	—	—	—	—	—
3	I.F.	++	+	+	—	—	—
4	B.P.	+	±	—	—	—	—
5	J.Z.	—	—	—	—	—	—
6	R.P.	++	+	+	—	—	+
7	N.G.	+	+	+	—	—	—
8	L.A.	—	—	—	—	—	—
9	M.P.	++	++	++	—	—	—
10	H.C.	+++	+++	++	—	—	+
11	B.R.	++	+	—	—	—	±
12	A.G.	+++	+++	++	—	—	—
13	M.T.	—	—	—	—	—	—
14	F.D.	+	+	+	—	—	—
15	S.P.M.	++	+	+	—	—	+
16	M.R.	+	+	—	—	—	—

6.º — Tratando-se o tubérculo pela glicerina a quente (1 parte de tubérculo para 10 partes de glicerina) e reduzindo-se em seguida o seu volume ao décimo, fazendo-se depois unia diluição desta glicerina em sôro fisiológico, na mesma proporção que a usada por MUIR obtem-se um antígeno que dá reações idênticas às obtidas com a lepromina, apenas com intensidade menor, acompanhando as reações obtidas com a parte alcool-solúvel.

N.º	Nome	Glicerina	Mitsuda
1	N.L.	—	+
2	A.F.	+	+++
3	G.B.	+++	+++
4	R.T.	—	—
5	R.P.	±	+
6	A.P.	—	±
7	J.M.	±	±
8	L.M.	—	—
9	A.C.	±	—
10	L.T. II	+	++
11	F.R.	—	—
12	P.B.O.	—	+
13	L.T.	+	+++
14	O.Z.	—	—
15	A.M.	+	±

7.º — Tratando-se o tubérculo pela piridina, as reações obtidas com o antígeno assim feito não acompanham o Mitsuda.

E' sabido que os bacilos ácido-resistentes são constituídos das seguintes substâncias: sais minerais, substâncias orgânicas e água. Entre as substâncias orgânicas encontram-se proteínas, hidratos de carbono e substâncias gordurosas. As substâncias gordurosas são constituídas de ácidos graxos livres, lipoides e cêra insolúvel. Dentre os constituintes químicos do b. de Hansen só interessam as proteínas e os lipoides. A porcentagem destas substâncias é mais ou menos a seguinte: proteínas 75%; lipoides totais 23%, dêstes as fosfatides constituem 6%.

Dos diversos solventes das matérias gordurosas, o xylol é o que dissolve inteiramente a parte gordurosa do bacilo fazendo-o perder a sua característica mais importante que é a ácido-resistência, sem alterar o corpo bacilar, tanto que a sua propriedade tinctorial de ácido-resistência pode voltar quando impregnado novamente por uma substância gordurosa.

8.º — Tubérculo finamente triturado, tratado em Soxhleht pelo xylol, a substância que envolve o bacilo fica dissolvida por êste reativo, permanecendo, entretanto no residuo os corpos bacilares. Êste fato é de fácil constatação, pois as lâminas feitas com o material depois de tratado pelo xylol não mostram a existência de b. ácido resistentes, que se tornam numerosos depois da impregnação pela banha de galinha de acôrdo com a técnica de José Faraco.

9° — Êste resíduo contendo os corpos bacilares foi tratado a quente pelo álcool etílico, que de acôrdo com o que já foi dito dissolve as substâncias que produzem as reações positivas na lepromina.

As substâncias dissolvidas no xylol, depois da evaporação dêste, foram diluídas em sôro fisiológico, sempre na mesma diluição adotada. Usadas como antígeno, não dão reações positivas nos casos francamente positivas a lepromina.

As substâncias dissolvidas no álcool etílico, depois do tratamento pelo xylol, também não dão reações positivas.

Reunindo-se êstes dois antígenos em um só, isto é, o antígeno obtido com as substâncias solúveis no álcool depois de prévio tratamento pelo xylol, obtêm-se reações positivas que acompanham "pari-passu" as reações da lepromina.

N.º	Nome	Subst. solúveis em xylol (a)	Subst. solúveis em alc. depois de prévio trat. pelo xylol (b)	Antígeno obtido com a reunião a+b	Mitsuda
1	J.S.	—	—	—	—
2	A.G.	—	—	—	—
3	G.K.	—	—	—	—
4	A.D.	—	—	—	—
5	I.M.	—	—	+	+
6	A.M.	—	—	—	—
7	D.L.	—	—	+	+
8	J.C.	—	—	—	—
9	Y.D.	—	—	++	++
10	A.A.	—	—	+	+
11	E.P.	—	—	—	—
12	M.M.	—	—	—	—
13	A.B.	—	—	+++	+++
14	M.G. II	—	—	++	++
15	J.D.	—	—	+	+
16	J.C.S.	—	—	+	+
17	S.D.	—	—	—	—
18	H.G.	—	—	+	+

Para augmentar a intensidade das reações positivas obtidas com a porção álcool-solúvel, juntei várias substâncias ao antígeno; colessterina, lecitina.

10.º — Tratando-se um tubérculo pelo álcool-etílico, de acôrdo com a experiência n.º 1, cujas reações acompanham as reações da lepromina e juntando-se lecitina do ovo na proporção de 1%, obtem-se um antígeno cujas reações foram perfeitamente idênticas em intensidade às da lepromina e em alguns casos foram mesmo mais intensas.

11.º — Tratando-se um tubérculo pelo xylol, para retirar as gorduras próprias do bacilo, extraíndo-se depois a parte solúvel no alcool, o antígeno obtido não apresenta as reações da lepromina, mas juntándose lecitina na proporção de 1%, o antígeno provoca as mesmas reações que a lepromina.

N.º	Nome	Subs. alcool-solúveis + 1% lecitina	Subs. alc.-sol. depois trat. xylol-1% lecit.	Mitsuda
1	E.C.	—	—	—
2	P.M.J.	—	—	—
3	L.A.A.	—	—	—
4	R.P.	++	++	++
5	S.D.	++	+	++
6	P.B.O.	+	+	+
7	A.S.	+++	++	+++
8	A.F.	+++	++	+++
9	N.L.	—	—	—
10	S.S.	—	—	—
11	C.C.	—	—	—
12	A.G.	+++	+++	+++
13	B.R.	+++	++	++
14	L.A.	—	—	—
15	J.Z.	—	—	—
16	H.C.	+++	+++	+++
17	A.P.	—	—	—
18	I.F.	+	+	++

12.º — Uma suspensão de lecitina, em soro fisiológico na dose 1/2% dá os mesmos resultados que o test de Mitsuda, apenas a intensidade da reação é bem menor.

N.º	Nome	Sol. de lecitina	Misuda
1	E.C.	—	—
2	P.M.J.	—	—
3	L.A.A.	—	—
4	R.P.	+	++
5	S.D.	—	+
6	P.B.O.	—	+
7	A.S.	+	+++
8	A.F.	+++	+++
9	N.L.	—	—
10	S.S.	—	—
11	C.C.	—	—

As reações positivas obtidas com o antígeno de lecitina, (leitura feita na 3.^a semana) não são duradouras, não apresentando sinais de positividade no fim da 6.^a semana; ao passo que a reação de Mitsuda francamente positivas duram meses.

N.º	Nome	Reações	1. ^a semana	2. ^a semana	3. ^a semana	6. ^a semana
3	L.A.A.	{ Mitsuda	—	+ → +	—	—
		{ Lecitina	—	± → +	—	—
4	R.P.	{ Mitsuda	+ → ++	++	++	++
		{ Lecitina	± → ++	± → +	+	—
7	A.S.	{ Mitsuda	+++	+++	+++	+++
		{ Lecitina	+	+ → +	+	—
8	A.F.	{ Mitsuda	+++	+++	+++	+++
		{ Lecitina	++	++	++	—

13.º — Uma cultura de 20 dias de b. tuberculose r. humana, sendo tratada pelo xylol para retirar a matéria gordurosa, feita a suspensão em soro fisiológico acrescentando 1% de lecitina acompanha a reação de Mitsuda em mais de 70% dos casos.

N.º	Nome	Mitsuda	B. de Koch + 1% lecitina
1	C.P.	+	—
2	N.A.C.	—	±
3	M.P.	+	+++
4	R.R.	++	+++
5	M.P.	++	++
6	A.G.	+++	—
7	M.R.	+	—
8	H.C.	++	±

COMENTÁRIOS

Esta série de experiências pode ser classificada em 3 grupos — um, compreendendo as 9 primeiras experiências, em que trabalhei exclusivamente com as substâncias retiradas da lepromina; um segundo grupo, compreendendo as experiências 10 e 11 em que às substâncias retiradas da lepromina juntaram-se outras não específicas e final-

mente o terceiro grupo compreendendo a experiência feita com substâncias outras que as encontradas na lepromina.

I grupo — Os fatos revelados com as experiências do primeiro grupo são os seguintes:

a) As substâncias existentes na lepromina e que dão a reação de Mitsuda positiva são solúveis no álcool etílico, clorofórmio e glicerina;

b) Estas substâncias pertencem ao grupo das proteínas e dos lipoides, principalmente fosfatides.

c) Quer as substâncias proteicas, quer os lipoides isoladamente não produzem uma reação de Mitsuda positiva. Precisam estar associados para que o antígeno tenha valor.

II grupo — Com as experiências dêste grupo pode-se estabelecer os seguintes princípios:

a) O antígeno de Mitsuda torna-se mais sensível se se lhe juntar um lipóide. Neste meu estudo, êsse lipóide foi a lecitina do ovo — fosfatide muito semelhante às fosfatides existentes nos corpos dos bacilos ácido-resistentes;

b) No complexo proteína-lipóides que constitue a lepromina, a porção lipóide não precisa ser específica, isto é, não precisa pertencer ao bacilo de Hansen. A lecitina do ovo produz os mesmos efeitos que as fosfatides encontradas no b. de Hansen.

III grupo — Neste grupo uma única conclusão: no complexo proteína-lipóides, também as proteínas do antígeno não precisam ser específicas, isto é, não precisam pertencer ao bacilo de Hansen.

De acôrdo com a experiência n.º 12 as proteínas do b. de Koch produzem os mesmos efeitos que as proteínas específicas do b. de Hansen.

Vários pesquisadores usaram como antígenos para a r. de Mitsuda não só outros bacilos ácido resistentes como bacilos não ácidos resistentes, e as conclusões variam.

NAGUI (La Lepro, 1938. Vol. 9 pag. 25) empregou como antígeno bacilos não ácido resistentes (coli, proteus) juntamente com lecitina a 1% obtendo os mesmos resultados que a lepromina mas com uma intensidade mais fraca.

MUIR usando um antígeno feito com bacilos de Stefansky nos indivíduos são obteve os mesmos resultados (Mula — Leprosy in Índia (5.1933-204-218).

Souza Lima inoculando culturas de B. de Koch (Vallée) preparadas como antígeno de Mitsuda, obtém em alguns casos de lepra tuberculóide, reações positivas (Revista Brasileira de Leprologia — Vol. VI-XII — 1938. pag. 443).

FERNANDEZ (Rev. Arg. De Dermatologia XXIII — 1939) refazendo as experiências de Arning e Williams empregando uma

suspensão de B. Koch mortos pelo calor, em 24 reações encontrou 11 casos de reações concordantes e 2 casos discordantes; concluindo entretanto pela especificidade de leprominas, visto os casos de reação positiva com o antígeno do B. Koch apresentarem também a reação de Mantoux positiva.

Experiências mais numerosas necessitam serem feitas neste terceiro grupo. Algumas causas de erro precisam ser afastadas. Alguns fatos já conhecidos precisam ser estudados novamente, pois se se confirmar que o antígeno da r. de Mitsuda não precisa nem das substâncias proteicas e nem dos lipoides específicos, toda a concepção atual da r. de Mitsuda deve ser modificada.