

SERVIÇO NACIONAL DE LEPROLOGIA — (Diretor: Dr. Orestes Diniz).
INSTITUTO DE LEPROLOGIA — (Chefe: Dr. João Baptista Risi).
RIO DE JANEIRO — BRASIL.

A REAÇÃO LEPROMÍNICA EM COBAIOS APÓS PRÉVIA INOCULAÇÃO DO B.C.G. E DE MYCOBACTERIUM TU- BERCULOSIS MORTO POR IRRADIAÇÃO. (*)

R. D. Azulay (**)

R. G. Neves (***)

J. D. Azulay (****)

A calmetização tem sido usada recentemente em vários países com finalidade profilática na lepra. Os maiores argumentos para esse procedimento residem nos seguintes pontos: 1.º — a lepromino-reação positiva significaria resistência à infecção leprótica; 2.º — O B.C.G. seria capaz de induzir essa positividade. Entretanto, outros autores assim não pensam e entre os argumentos apresentados sobressai a possibilidade dessa viragem correr por conta da inoculação da primeira testagem lepromínica. Sendo esse um ponto de grande importância e estando as experiências "in anima nobili" sujeitas a estímulos os mais diversos e por assim dizer, de difícil controle, achamos por bem, de alguns anos para cá, realizar esse tipo de experimentação "in anima vi-li". Assim é que em uma série de trabalhos experimentais (1, 2, 3 e 4) tivemos a oportunidade de salientar o papel indubitável do BCG no que diz respeito à indução à positividade lepromínica em cobaios e a proteção parcial do BCG frente à infecção leprótica murina. Nos primeiros trabalhos (1 e 2) utilizamos a via subcutânea para a inoculação do BCG, porém, em nosso último trabalho (3) tivemos a oportunidade de utilizar a via oral. Os resultados obtidos nesta última experiência variam de acordo com as doses de B.C.G. utilizados nas inoculações; o maior percentual de positividade foi de 87,5%, obtido com 30 mg. de BCG por Kg. de peso de cobaio, e o menor percentual de positividade (33.3%) foi obtido com a dose de 1 mg. de BCG por kg. de peso de cobaio.

A presente experiência foi dividida em 2 partes: a primeira teve por objetivo verificar se a administração de doses maiores de BCG elevariam a positividade lepromínica; a segunda parte teve por objetivo verificar se o **M. tuberculosis** morto por irradiação segundo técnica do Laboratório Parke Davis também teria a capacidade de induzir positividade lepromínica, em cobaios.

I) — **Detalhes da experiência:** Oitenta cobaios adultos, de ambos os sexos, foram divididos em 4 lotes de 20 animais. Cada cobaio foi pesado e examinado cuidadosamente, sendo os caracteres particulares de pêlo, côr, etc., anotados em ficha própria. A marcação foi feita com contas coloridas presas à orelha direita. Utilizamos 7 gaiolas para cada lote e empregamos uma côr distintiva do lote.

(*) Trabalho apresentado no VII Congresso Internacional de Leprologia realizado em Tóquio, Japão, entre 12 e 19 de Novembro, de 1958.

(**) Encarregado da T.A.P. do Instituto de Leprologia.

(***) e (****) Médicos-Assistentes da T.A.P. do I.L.

Administração do BCG por via oral: O BCG preparado de acôrdo com a técnica de Arlindo de Assis (5) foi introduzido por meio de sonda, segundo a técnica recomendada por Dumas (6). Quarenta cobaios pertencentes a 2 lotes receberam o BCG após um jejum de 12 horas. A distribuição se processou da seguinte maneira:

Lote A (verde) — 20 cobaios receberam a dose correspondente 60 mg. de BCG por kg. de pêso corporal.

Lote B (vermelho) — 20 cobaios receberam a dose correspondente a 120 mg. de BCG por kg. de pêso corporal.

II) — **Administração da vacina de *Mycobacterium tuberculosis* mortos por irradiação:** Essa vacina representada por uma suspensão de *M. tuberculosis* virulentas, mortos por irradiação, foi fornecida pelo Laboratório Parke Davis. Segundo informações fornecidas pelo referido laboratório, a vacina foi preparada do seguinte modo: "As culturas de *M. tuberculosis* foram desenvolvidas na superfície do meio liquido sintético de Won-Weinzirl durante 10 a 12 dias, prazo após o qual a superfície do meio é coberta por uma película de cultura em franco desenvolvimento. A quantidade desejada da massa cultural é transferida assépticamente para um pequeno cálice esteril contendo diversas camadas de papel de filtro. O excesso de umidade da massa cultural é removido por pressão. sendo a massa passada a outro cálice para pesagem. A suspensão da cultura é então transferida para um frasco pyrex de centrífuga contendo pérolas pyrex e algumas gotas de solução salina, o qual é então tampado e centrifugado mecânicamente por 3 horas. Os báculos são mortos por irradiação ultra-violeta. Cada centímetrol cúbico da vacina contém, em pêso, 1 mg. de bacilos semi-úmido. A vacina é fornecida em frascos de 20 cc e pode ser guardada por 1 ano ou mais, sem perder a potência".

Os cobaios submetidos a esta vacina receberam a designação de:

Lote C (amarelo) — 20 cobaios foram inoculados por via intramuscular, na pata posterior direita, face interna, com 0,5 ml. da vacina, 3 vêzes, com intervalos de 7 dias entre as inoculações.

Grupo contrôle: — da mesma população animal que serviu para as experiências retiramos os animais que passaram a constituir o:

Lote D (azul): — 20 cobaios não receberam BCG nem vacina Park Davis e foram mantidos sob o mesmo regime alimentar e sujeitos aos mesmos cuidados dos das experiências.

III) — **Reação lepromínica:** Após a depilação prévia (depilatório Kanitz) do abdômeme praticamos o teste lepromínico em todos os animais: usamos a lepromina integral por via intradérmica na dose de 0,1 ml., com agulhas 10x5 e de bisel curto. Os cobaios dos lotes A e B foram inoculados com a lepromina 24 dias após a administração do BCG. Os cobaios do lote C foram submetidos ao teste lepromínico 10 dias após a última dose de vacina irradiada. No mesmo dia foram inoculados os cobaios do lote D (contrôle).

IV) — **Leitura das reações:** — Todos os animais foram observados, depois da inoculação lepromínica, com intervalos de 48 horas, 96 horas, 7, 14 e 21 dias respectivamente.

Consideramos como **reações positivas** tôdas as que apresentaram um caráter de persistência (alterações macroscópicas ainda presentes com 14 ou mais dias) independentemente do tamanho, apresentando em geral necrose, com determinação de cicatriz perceptível macroscòpicamente. Foram consideradas reações duvidosas as que apresentaram uma pápula em geral com menos de 2 mm. de diâmetro, com involução rápida (antes do 7° ou 14° dia) sem deixar cicatriz. Como **reações negativas** foram consideradas as que não apresentaram modificações locais a não ser as decorrentes do trauma da picada.

V) — **Resultados:** — Chegaram ao fim da experiência 60 animais; 20 morreram por intercorrências. Os resultados encontrados estão catalogados na tabela anexa.

Resultados do teste lepromínico em cobaios inoculados prèviamente com BCG ou vacina tuberculosa morta por irradiação.

L O T E	Positivo		Duvidoso		Negativo	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
(A) BCG: 60 mg. por kg.	8	47,0	7	41,2	2	11,8
(B) BCG: 120 mg. por kg.	3	25,0	4	33,3	5	41,7
(C) Vacina M. tuber- culosis irradiada	—	0,0	3	20,0	12	80,0
(D) Contrôle	—	0,0	2	12,5	14	87,5

Verificamos assim que cobaios inoculados prèviamente, por via oral, com 60 mg. de BCG por kg. apresentaram os seguintes resultados à inoculação de antígeno lepromínico:

Testes positivos	47,0%
" duvidosos	41,2%
" negativos	11,8%

Com dose dupla de BCG (120 m.) por kg. de pêsso, os resultados foram os seguintes:

Testes positivos	25,0%
" duvidosos	33,3%
" negativos	41,7%

Os cobaios inoculados com a vacina Parker Davis de *Mycobacterium tuberculosis* virulento morto por irradiação forneceram os seguintes resultados à inoculação lepromínica:

Testes positivos	0,0%
" duvidosos	20,0%
" negativos	80,0%

O grupo contrôle forneceu os seguintes resultados à inoculação lepromínica:

Testes positivos	0,0%
” duvidosos	12,5%
” negativos	87,5%

Os resultados acima e as experiências anteriores dos AA mostraram:

- 1) — A vacina de *M. tuberculosis* virulento morto por irradiação não foi capaz de induzir a positividade lepromínica em cobaios.
- 2) — O BCG por via oral é capaz de induzir a positividade lepromínica em cobaios.
- 3) — Em experiências anteriores ficou demonstrado que a dose de 30 mg. por kg. de pêso, provocava uma lepromino-positividade maior que as pequenas doses (1,3 e 15 mg) e que, também, as doses mais elevadas (60 e 120 mg.) não foram mais efetivas que aquela de 30 mg.
- 4) — A dose ideal de BCG parece ser a de 30 mg. por kg. de pêso, e é interessante referir que corresponde, aproximadamente, à dos utilizada para vacinação dos recém-natos, no Brasil (28 mgr. por kg. de pêso corporal).

—oOo—

SUMÁRIO

Os autores estudaram nesta experiência a capacidade dos cobaios se tornarem lepromino-positivos; após a inoculação da vacina Parke Davis (*Mycobacterium tuberculosis* morto por irradiação) ou do BCG.

I) — Cobaios inoculados subcutâneamente com a vacina Parke Davis (1 dose de 0,5 ml., semanalmente, durante 3 semanas) e testados com a lepromina integral mostraram os seguintes resultados: 80% de negatividade e 20% de reações duvidosas.

II) — Cobaios inoculados com BCG., por via oral, testados com lepromina integral, forneceram percentuais de positividade variáveis com as doses:

- a) com 60mg. de B.C.G. por kg. de pêso, os resultados foram:

47,0%	reações positivas.
41,2%	” duvidosas
11,8%	” negativas

- b) com 120 mg. de B.C.G. por kg. de pêso, os resultados foram:

25,0%	reações positivas
33,3%	” duvidosas
41,7%	” negativas

- c) o grupo contrôle forneceu os seguintes resultados:

12,5%	reações duvidosas
87,5%	” negativas

Os resultados desta experiência mostram:

- I) — A vacina Parke Davis preparada com *Mycobacterium tuber-*

culosis mortos por irradiação não induz positividade lepromínica, no cobaio.

II) — O B.C.G. administrado oralmente é capaz de provocar a positividade lepromínica, no cobaio.

III) — A julgar pelos resultados de experiências anteriores dos autores mostrando que a dose de 30 mg. de B.C.G. por kg. de pêso provocou, no cobaio, a mais elevada positividade lepromínica (87,5%) e doses maiores e menores do que 30 mg. (experiência anterior e atual) forneceram percentuais mais baixos de positividade, os autores pensam que aquela dose deve ser a ideal.

IV) — É interessante referir que a dose de 30 mg. por kg. de pêso é muito próxima da usada no Brasil (28 mg. por kg. de pêso) para a premunição de recém-nascidos.

—oOo—

SUMMARY

The authors verified in this experiment the capacity of guinea-pigs to become lepromin-positive through the inoculation of either Parke Davis vaccine (Mycobacterium tuberculosis dead by irradiation) or B. C.G.

1) Guinea-pigs inoculated subcutaneously with Parke Davis vaccine (1 dose of 0,5 ml. weekly, during 3 weeks) tested with integral lepromin showed: 80% of negative results and 20% of doubtful tests. No animal showed any positive reaction.

2) Guinea-pigs inoculated with B.C.G. by mouth, showed percentages of positive varying according to the doses:

a) with 60 mg. of BCG by kg. of weight the results were:

47,0%	positive tests
41,2%	doubtful tests
11,8%	negative tests

b) with 120 mg. of B.C.G. by kg. of weight, the results were:

25,0%	positive tests
33,3%	doubtful tests
41,7%	negative tests

c) the control guinea-pigs showed:

12,5%	doubtful tests
87,5%	negative tests

The results of this experiment show:

I) — Parke Davis vaccine prepared with Mycobacterium tuberculosis dead by irradiation does not induce the positivity of lepromin test to guinea pigs.

II) — B.C.G. given by mouth, is able to induce the positivity of lepromin test to guinea pigs.

III) — Judging by the results of previous experiences of the authors showing that the dose of 30 mgr. of B.C.G. by kg. of weight of

guinea pig induced the highest positivity to lepromin test (87,5%) and that lower and higher doses (previous and actual experiences) gave lower percentages of positivity; the authors think that dose must be the ideal one for that purpose.

IV) — It is interesting to refer that the dose of 30 mg. by kg of weight is very approached to that used in Brazil (28 mg. by kg. of weight) for promunization of newborns.

BIBLIOGRAFIA

1. AZULAY, R.D. & AZULAY, J.D. — A viragem da lepromino-reação pela administração do B.C.G. Bol. Serv. Nac. Lepra **12**: 310, 1953.
2. AZULAY, R.D. — Our experience with the lepromin test from 1944 to 1955. New experiments with guinea-pigs. Arq. Mineir. Leprol. **17**: 324-334, 1957.
3. AZULAY, R.D. & NEVES, R.G. — Comportamento do teste lepromínico em cobaios becegeizados por via oral. Bol. Serv. Nac. Lepra **16**: 10-14, 1957.
4. AZULAY, R.D. — The protective role of BCG in murine leprosy Internat. J. Leprosy **22**: 61-64, 1954.
5. ASSIS, A. — Papel da vacinação BCG concorrente na Sexta Reunião de Peritos de Tuberculose da Organização Mundial de Saúde. Hospital **45**: 541-557, 1954.
6. DUMAS, J. Les animaux de laboratoire. Collection de l'Institut Pasteur. Paris, Editions Medicales Flammarion, 1953. pag. 671.

—oOo—