

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 52

Fascículo 1

Março de 1954

**Sôro-reações em leprosos usando como
antígenos extrato de leproma Stefansky e
culturas de bacilos ácido-álcool resistentes***

pelos doutores

H. C. de Souza-Araujo e F. Rocha Lagôa

(Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

Em 1906, logo depois que WASSERMANN, NEISSER, BRUCK e SCHUCHT (1) demonstraram a existência, no sôro de sífilíticos, de uma substância específica capaz de fixar o complemento, na presença de um antígeno preparado com tecidos luéticos, ERNESTO EITNER(2) teve a feliz idéia de preparar com tecido leproso um antígeno que, posto em contacto com o sôro do próprio doente e os demais reagentes da reação de BORDET e GENGOU, também fixou o complemento. EITNER fez essa descoberta na Clínica Dermatológica da Universidade de Innsbruck, em Janeiro de 1906, examinando um leproso austríaco recémchegado de São Paulo (Brasil), onde vivia desde 1888 e onde se infectou. O antígeno foi preparado com lepromas extirpados da face desse paciente, por simples trituração com sôro fisiológico fenicado a 0,5%. Esfregaços desse extrato, corados pelo método de Ziehl-Neelsen e pelo Giemsa, revelaram grande abundância de bacilos de Hansen e ausência do *Treponema pallidum*.

Repetida a reação, que foi positiva no sôro do leproso, com sôros de pacientes de várias outras doenças, EITNER obteve somente resultados negativos, que o levaram a concluir que:

“o sôro de leproso tem um anticorpo específico que desvia o complemento”.

Em comêço de 1908 EITNER(3) repetiu a sua reação no sôro de outro leproso, um russo de 17 anos de idade que adquirira a doença na América do Sul e se achava há dois anos internado na Clínica Derma-

* Trabalho apresentado no VI Congresso Internacional de Leprologia, Madrid, 3-10 de Outubro de 1953.

tológica da Universidade de Viena, com igual resultado ao obtido no primeiro doente. Êle empregou também o antígeno de LANDSTEINER (extrato alcoólico de coração de cobaio normal) usado na reação de WASSERMANN, que produziu igualmente a fixação do complemento, em presença do sôro do leproso.

Usando antígeno leproso E. GAUCHER e P. ABRAMI(4) confirmaram, na França, em 1908, a descoberta de EITNER; em 1909, na Rumania, A. SLATINEANU e D. DANIELOPOLU(5) obtiveram 24 resultados positivos dentre 26 sôros de leproso, e na Grécia, em 1912, G. PHOTINOS e N. MICHAELIDES(6) fizeram as reações de WASSERMANN e de EITNER em sôros de 204 leproso, do Asilo de Spinalonga, obtendo uma positividade global de 56,3%; e de 75,9% na lepra tuberculosa, 75% na mista e 38% na nervosa. Êles usaram o antígeno de fêto sífilítico e o extrato alcoólico de lepromas, concluindo que: "*Les résultats furent les mêmes après l'usage de l'un ou de l'autre antigène*".

Quanto à reação de WASSERMANN a descoberta de EITNER teve maior repercussão mundial e mais ampla confirmação, inclusive no Brasil.

Após um longo período de dúvida sôbre o valôr da reação de WASSERMANN na lepra, hoje se admite, depois da valiosa contribuição de H. E. HASSELTINE(7), que essa reação pôde ser positiva em sôros de leproso independentemente duma infecção treponematósica associada, e que tem grande valôr prognóstico.

Em 1934 M. OTA e T. ISHIBASHI(8) realizaram, no Japão, a reação de fixação do complemento em sôros de leproso, usando como antígenos suspensões de várias culturas de bacilos ácido-álcool resistentes, inclusive uma de SH. ASAMI, designada como *Mycobacterium leprae muris*, que produziu a elevada positividade de 76,5%. Ainda no Japão, M. SATÔ(9) fez em 1938 a reação de fixação do complemento em sôros de ratos e de sêres humanos leproso, empregando vários antígenos que preparou com leproma de STEFANSKY. Nos ratos obteve 14% de resultados positivos com o antígeno colesterinizado e 25% com o aquoso; nos sôros humanos, de leproso cutâneos, obteve as positivities de 36,8; 69,7 e 77,7% respectivamente com os antígenos aquoso, colesterinizado e colesterinizado-alcoólico. As mesmas reações feitas com sôros de ratos e pessoas normais deram resultados negativos.

Um de nós (S.A.) tendo isolado, em 1949, duas amostras de culturas não-cromogênicas de bacilos ácido-álcool resistentes de *Mus musculus* raça negra C-57 das Rockland Farms, U.S.A., inoculados com suspensão de leproma STEFANSKY (Amostra do Instituto Pasteur de Paris, gentilmente fornecida pelo Dr. R. CHAUSSINAND), ambas fortemente positivas à fluoroscopia e à reação de Dubos para virulência, verificadas no Instituto Oswaldo Cruz pelo Dr. LAERTE DE ANDRADE, resolvemos utilizá-las como antígenos, conjuntamente com o extrato de leproma de rato experimentalmente infectado com bacilos de STEFANSKY, numa série de experiências que passamos a relatar.

QUADRO I

N.º	Nome	Idade	Tipo Clínico	Duração	BACILOSC.		Histologia	Mitsuda Teste	STEFANSKY			Cultura José
					Muco	Pele			R. W.	Leproma	Cultura III	
1	A.B.	43	L2N2,r.	20	+	+		-	++	++	++	
2	A.S.	62	L3-N,r.	10	+	+	L	-	++	++	++	-
3	J.E.	26	N1	22	-	-		-	+	++	+	-
4	A.L.	35	L3	8	+	+	L	-	++	+++	+++	+
5	D.L.	32	Nt	2	-	+	T	+	+	++	-	
6	J.F.	53	L3	6	+	+	L	-	++++	++++	+++	
7	M.S.	43	L,T	5	+	+	L,T	-	+	+	-	
8	M.R.	61	L3,r	18	+	+	L	-	+	+	+	+
9	M.N.	18	L3	6	+	+	L	-	+++	+++	+	
10	A.V.	40	Nt	6	+	+	T	+	+	+	-	
11	L.S.	17	L3	4	+	+		-	+++	+++	+++	++
12	E.B.	31	L,T	12	+	+	T,L	+	+	++	++	+
13	A.C.B.	31	N2	25	+	+		-	+	++		
14	D.A.	33	L3	15	+	+		-	+++	+++	++	
15	L.F.	69	L-N2	22	+	+		-	-	++	++	+
16	J.F.	19	L3,r	13	+	+		-	+	++	++	+
17	Z.F.	60	L3-N2	14	+	+		-	+	++	+	+
18	M.F.	30	L2	12	+	+		-	++	++	++	+
19	E.C.	30	L2,r.	10	+	+		-	+	+		
20	E.M.	48	Nt	13	-	+	T	+	-	+	+	-
21	J.S.	50	L2-N,r.	15	+	+	I	-	+	+	+	-
22	R.M.L.	35	L1-N1	28	-	-		+	++	++	-	+
23	L.T.	27	L3,r	19	+	+			-	+	-	+++
24	A.M.	49	L3,r.	16	+	+			++	++	-	
25	A.G.	25	Nt	15	+	+			-	+		
26	C.S.	50	L2-N2,r.	10	+	+			-	-	-	
27	J.C.	24	L2-N1	10	+	+			-	-		+
28	J.A.R.	17	L2,r.	11	+	+			-	+	+	-
29	R.C.	41	L2-N2,r.	20	+	+		-	+	+		+
30	G.X.	43	L2,r.	10	+	+		+	+	+		
31	A.M.	40	L2	15	+	+			+	++	+++	+
32	B.P.	44	L2-N1	15	+	+		-	++	++		
33	C.W.	59	L3,r.	19	+	+			++	++		
34	C.M.	31	L3	9	+	+	L	-	+	++	+	-
35	M.M.	54	L-N	17	-	+	T	+	+	+	-	-
36	A.M.	36	L-N2	16	-	+			-	+	+	+
37	M.D.M.	33	L1-N1	12	-	+			-	+	+	-
38	N.L.	42	L3,r	25	+	+		-	+	++	++	-
Sommas								28	27+	35+	20+	12+
Percentagens de reações positivas									71,1	92,1	69,0	52,1

N. B. Os símbolos dos tipos clínicos e a sua graduação correspondem aos primeiros exames dos pacientes, cuja maioria não apresenta mais lesões lepramatosas ativas, aqueles cujos símbolos são seguidos de um "r", apresentam apenas sinais residuais.

No computo geral todos os casos fracos ou dubiamente positivos foram considerados como negativos. Todos os casos L2 e L3 tiveram repetidos exames baciloscópicos fortemente positivos.

Histologicamente o caso n.º 7 começou como L e acabou como T (L, T), o n.º 12 que era T evoluiu para L (T, L), o n.º 21 que era L regrediu para I (L, I).

Em 28 dos 38 leprosos foi feito o teste de Mitsuda, dos quais foram 7 positivos, resultado correspondendo ao seu estado clínico.

Antígenos empregados — 1.º — *Antígeno leproso aquoso*: Um leproma de rato branco (fig. 1) extirpado no ato da autópsia, pesando 41,5 grs. foi cortado em pedaços, cujo esfregaço corado pelo método de Ziehl-Neelsen revelou grandes massas de bacilos a.a.r. e globias e bacilos isolados (fig. 2), com a morfologia clássica do bacilo de STEFFANSKY. Não havia nenhuma bactéria cianófila. Esses pedaços do tumor foram triturados até à formação duma pasta que foi suspensa em sôro fisiológico fenicado a 0,5%, na proporção duma grama por 20 ml como se faz no fabrico da lepromina, e filtrada em gaze e deixada na geladeira até o momento de usar. Essa suspensão foi usada *in natura* e filtrada em Seitz.

2.º — *Antígenos aquosos de culturas*: Véus e depósitos de culturas de 30 dias de incubação a 37º C, em caldo glicerinado a 5%, das amostras “José” (lepra humana) e STEFFANSKY III e IV (lepra murina), foram triturados e suspensos em sôro fisiológico fenicado a 0,5%, na proporção duma grama de bacilos para 20 ml do líquido e deixados na geladeira.

3.º — *Polisacarídios*: Duas fracções extraídas com acetona e com eter (J. Chem. Soc. London, 1948 p. 1215) da cultura amostra “Chaves I” (lepra humana), pelo Dr. N. G. BOTAFOGO, se mostraram inadequadas para serem usadas como antígenos devido ao seu poder hemolítico natural.

4.º — *Antígeno Bordet-Ruelens*: Classicamente usado na reacção de WASSERMANN.

Sôros usados: — Fizemos as reacções em 62 sôros humanos, sendo 38 de leprosos, 15 de seus comunicantes e 9 de pessoas sadias. No Quadro 1 sumariamos os resultados obtidos com os 38 sôros de leprosos, dos quais 27 (71%) deram R. Wassermann positiva, quatro com 3 e 4 cruces, nos casos L3, como é a regra; 35 (92,1%) fixaram o complemento com o antígeno bruto de leproma Stefansky. Com o filtrado dêsse antígeno a positividade foi de 51,5%.

Todos os 27 sôros que deram Wassermann positivo também deram Eitner positivo (antígeno de lepra murina), dos quais 10 com duas a quatro cruces.

As reacções feitas com as suspensões de bacilos a.a.r. isolados de lepra murina (Stefansky III e IV indiferentemente) deram a positividade de 69% (20 dos 29 pacientes examinados). Essa positividade baixou a 52,1% (12 em 20) usando como antígeno a cultura “José” (lepra humana).

— Estes notáveis resultados, obtidos com sôros de leprosos, na sua grande maioria já muito tratados, sugerem o emprêgo, em larga escala, dos dois antígenos, leproma de rato e cultura Stefansky, em leprosos de várias formas clínicas, sobretudo em lepromatosos não tratados ou pouco tratados, e também nos leprosos que já obtiveram alta por cura pelas Sulfonas.

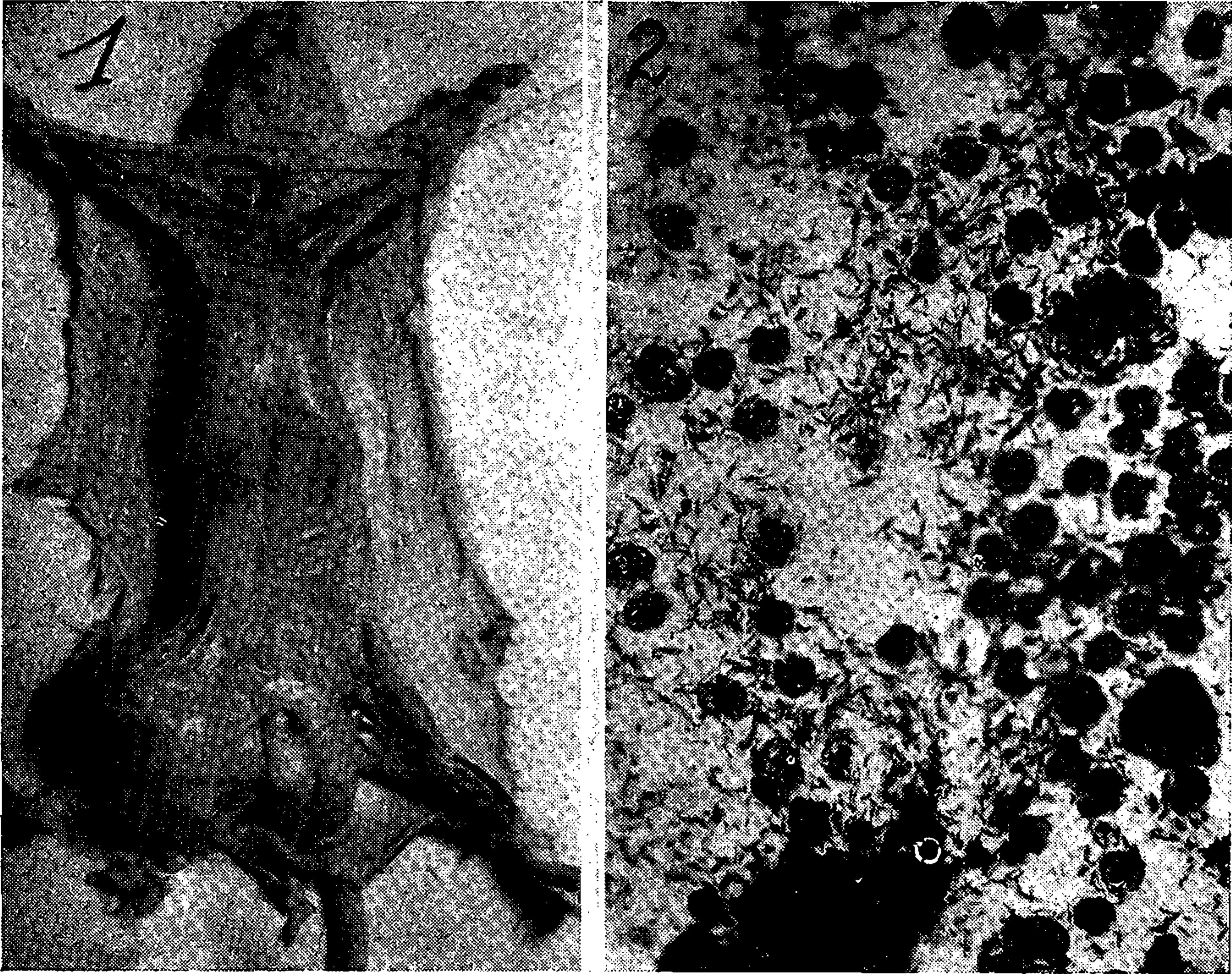


Fig. 1 — Rato branco re-inoculado em 12-11-52 com emulsão de tumor Stefansky de camundongo, passagem do Rhesus 5. Sacrificado a 12-3-53. Tumor pesando 41,5 gr., o qual foi utilizado para o preparo de antígeno.

Fig. 2 — Esfregaço desse tumor corado pelo método de Ziehl-Neelsen, mostrando inúmeras globias e massas características do bacilo de Stefansky.

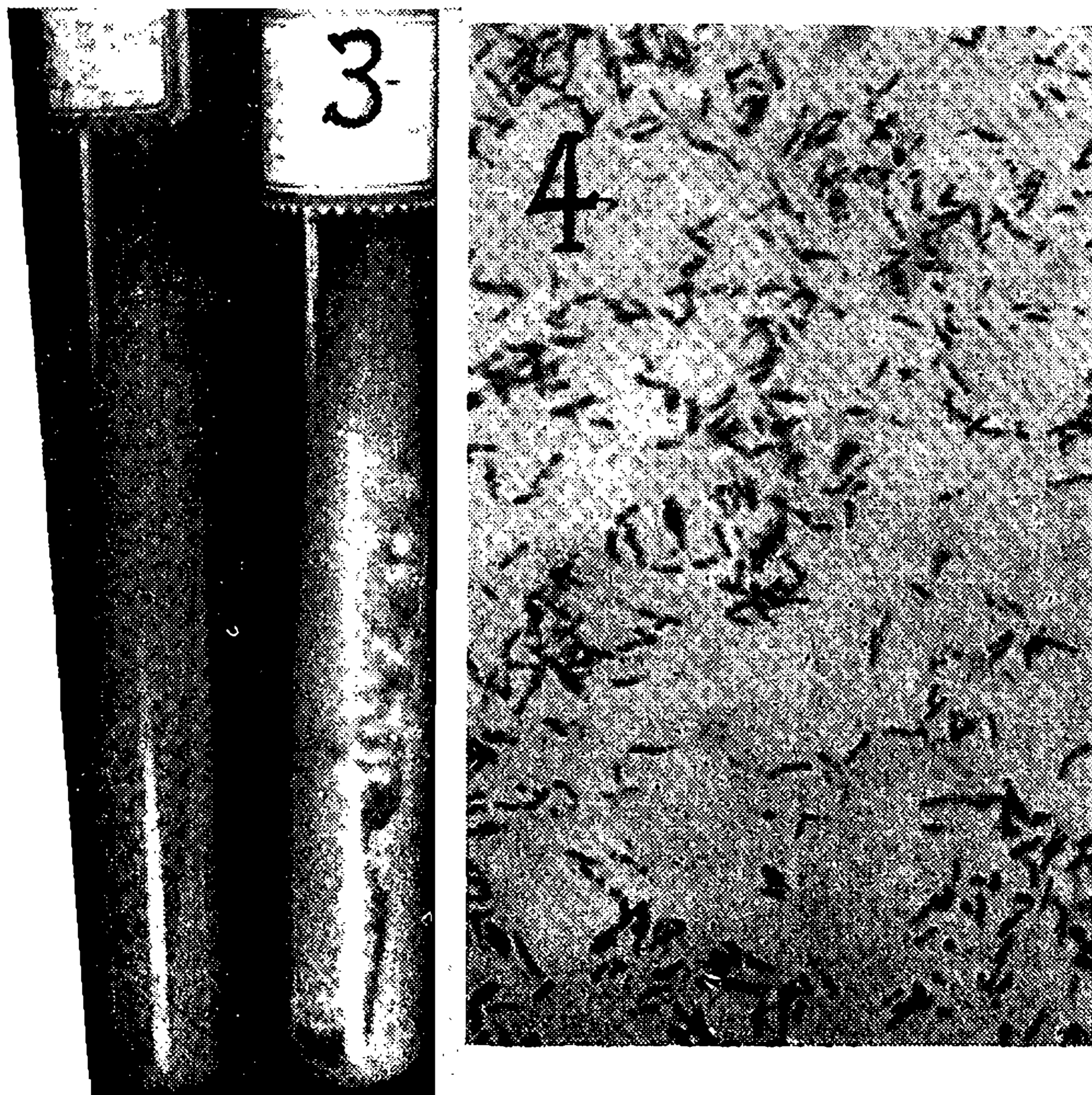


Fig. 3 — Fotos das culturas de bacilos da lepra murina, que, transplantadas para caldo glicerinado a 5%, serviram para o preparo de antígenos.

Fig. 4 — Esfregaço de uma dessas culturas corado pelo método de Fontes para destacar as granulações.

O Dr. ORESTES DINIZ, diretor do Serviço de Profilaxia da Lepra do Estado de Minas Gerais, que dispõe de 4.000 doentes internados, nos prometeu fazer êsse grande trabalho, para o que já lhe fornecemos os antígenos.

Dos 15 comunicantes deram resultados positivos: 8 com o antígeno leproso, 6 com o antígeno Bordet-Ruelens e 3 com o da cultura Stefansky. Tôdas em grau fraco. O único fato importante neste grupo foi a positividade, embora fraca, com 2, 3 ou 4 antígenos, de 4 dentre os 5 (80%) sôros de mães de leproso. Dentre 6 esposos de leproso apenas num as R. W. e R. Eitner foram positivas (+). Uma sobrinha e uma enfermeira de leproso deram essas reações positivas (++), mas se verificou serem ambas sífilíticas. De 9 sôros de pessoas sadias 3 deram RW ++; 4 deram + com os dois antígenos leproso. Como tais resultados foram fracos (+) não têm significação.

CONCLUSÕES

1 — Os sôros dos leproso examinados mostraram possuir a propriedade de fixar o complemento quando misturados com suspensões aquosas de tumor de lepra do rato e culturas Stefansky usadas como antígenos.

2 — A alta positividade de tais reações sugerem a conveniência de se repetirem tais reações, em larga escala, em leproso dos três tipos clínicos e também nos doentes considerados curados pelas sulfonas.

3 — Os resultados obtidos mostraram que os sôros de leproso contêm anticorpos polífixadores, capazes de fixar o complemento na presença de suspensões de tumores de lepra do rato ou de culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados dêsses tumores, com maior intensidade que quando se usa o antígeno de Bordet-Ruelens, empregado na sôro-reação para o diagnóstico da sífilis.

REFERÊNCIAS

1. WASSERMANN, A., NEISSER, A., BRUCK, C. und SCHUCHT, A.
1906 Weitere Mitteilungen ueber den Nachweiss spezifisch-luetischer Substanzen durch Komplementveraenderung. Zeitsch. f. Hygiene und Infekt., LV, 451/77.
2. EITNER, E.
1906 Ueber den Nachweiss von Antikoerpen in Serum eines Leprakranken mittels Komplementablenkung. Wiener klin. Woch., 19. Jahrgang, N.º 51, 1555/57, Dezember.
3. EITNER, E.
1908 Zur Frage der Anwendung der Komplementbindungsreaktion aus Lepra. Ibidem, 21. Jahrgang., N.º 20, p. 729, Mai.
4. GAUCHER, E. et ABRAMI, P.,
1908 Séro-diagnostique de la lèpre. Bull. et Mém. Société Médicale des Hôpitaux, Nov. 1908, pp. 497/502.

5. SLATINÉANU, A. et DANIELOPOLU, D.,
1909 Sur la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des malades atteints de lèpre. *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 48, Heft 4, pp. 480/3.
6. PHOTINOS, G. et MICHAELIDES, N.,
1912 La séro-réaction de Wassermann et la cuti-réaction de von Pirquet dans la lèpre. *LEPRA, Bibliotheca Internationalis*, Vol. 12, F. 4, 1912, pp. 207/9.
7. HASSELTINE, H. E.,
1924 The Wassermann Reaction, Kolmer's new complement fixation test and the Kahn precipitation test in leprosy. *Public Health Bulletin*, N.º 141, July, 1924, pp. 37/54.
8. OTA, M. and ISHIBASHI, T.,
1934 Complement-fixation Reactions of lepers' sera with bacillary antigens. *Internat. Journal of Leprosy*, Vol. 2 (4), 1934, pp. 413/22.
9. SATÔ, M.,
1938 Rattenlepra. 4. Teil: Bakteriologisch-Serologische Untersuchungen. *The Japanese Journal of Dermatology and Urology*, Vol. 43, N.º 1, January 20, 1938, pp. 16/21.

Rio de Janeiro, 5 de Julho de 1953.