

ESTUDO COMPARATIVO DA INTRADERMO-REAÇÃO PRATICADA COM LEPROMINA INTEGRAL E COM LEPROMINA TRATADA POR ULTRA-SOM EM INDIVÍDUOS NORMAIS

Edna Hidemi KARAZAWA¹
Nelson Guimarães PROENÇA²
Igor MIMICA³
Teresa A. E. KLIEMANN⁴
Ednir Wanderley MARTINEZ⁴
Marilda GUEDES⁵
Lucia Rosario FARIAS⁶

RESUMO — Realizou-se um estudo comparativo das reações de Fernandez e de Mitsuda em 104 indivíduos normais, utilizando-se lepromina integral e lepromina tratada por ultra-som. Os resultados obtidos não mostraram diferença estatisticamente significativa, no que se refere a reação de Fernandez. Já em relação à reação de Mitsuda houve diferença significativa; a favor da lepromina integral.

Palavra chave: Reação de Fernandez. Reação de Mitsuda. Lepromina. Ultra-som.

1 INTRODUÇÃO

Desde a introdução da intradermo-reação à lepromina, praticada segundo a técnica de HAYASHI (1933), tem-se procurado obter antígenos melhor homogeneizados do que a lepromina integral. Uma das tentativas utiliza a vibração sônica para desintegrar os bacilos (ABE et al., 1963; KITANO & INOUÉ, 1941; SINHA et al., 1979).

Os resultados obtidos pelos vários autores que empregaram lepromina

integral e lepromina desintegrada são variáveis. Enquanto alguns referem reações equivalentes com os dois tipos de lepromina (ABE et al., 1963), outros obtiveram melhores resultados com a lepromina integral (KITANO & INOUÉ, 1941; SINHA et al., 1979). O objetivo deste trabalho foi determinar se as respostas, precoces e tardias ao antígeno de Mitsuda, eram concordantes utilizando lepromina integral e lepromina tratada pelo ultra-SOM.

-
- (1) Residente de Dermatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil.
 - (2) Professor Pleno de Dermatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil.
 - (3) Professor Pleno de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil.
 - (4) Pesquisador científico do Instituto de Saúde, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brasil.
 - (5) Professor Assistente do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil.
 - (6) Estagiário de Dermatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Material clínico testado*: foi com- posto por 104 indivíduos normais, sem evidência clínica de moléstia orgânica que pudesse afetar os resultados; 64 eram estudantes de medicina da Santa Casa de São Paulo e, os 40 restantes, pacientes internados no Pavilhão Fernandinho da Santa Casa, por motivos ortopédicos. A idade variou entre 14 e 54 anos. Trinta pessoas eram do sexo feminino e 74 do sexo masculino.

O trabalho foi realizado no período compreendido entre 27-4-78 e 7-11-79. 2.2 *Procedência dos lepromas e preparação da lepromina*: o material antigênico foi obtido de lepromas de pacientes virgens de tratamento, atendidos no Ambulatório de Dermatologia da Santa Casa. O processamento do material foi feito no Instituto de Saúde de São Paulo, segundo as técnicas a seguir indicadas :

a) *lepromina integral*: após fervura em "becker", em solução fisiológica a 0,85%, por trinta minutos, a epiderme foi removida e o nódulo pesado (2,9 g). Dividiu-se o material em duas porções que foram preparados segundo o método de HAYASHI (1933). Procedeu-se em seguida A contagem de bacilos, segundo SHEPARD & MCRAE (1968), dando uma taxa de 20×10^6 bacilos por ml ; a primeira porção, que corresponde A lepromina integral, foi autoclavada e distribuída em 21 frascos e estes guardados em geladeira.

b) *lepromina tratada por ultra-som*: a segunda porção do material, após a contagem bacilar, foi congelada a -70 graus centígrados por 48 horas e, quando descongelada, foi submetida A vibração sônica do Disruptor Celular ("Sonifier Cell Disruptor Model W 185-Heat Systems Ultrasonic Inc."). Os tubos contendo a suspensão de bacilos foram colocados em banho de gelo,

usando 80 W, durante 10 minutos, por duas vezes, com um descanso de 5 minutos. Esta operação, desde o congelamento, foi repetida mais de uma vez, conseguindo-se a ruptura de 80% dos bacilos. Todas as fases foram feitas com rigorosa assepsia e sempre acompanhadas por lâminas coradas pelo Ziehl-Neelsen, observadas em microscópio óptico, para verificação da morfologia dos bacilos. As suspensões foram colocadas em 21 frascos auto-clavados e guardados até o momento do USO.

2.3 *Técnica da Intradermo-reação*: a intradermo-reação foi feita utilizando-se seringas do tipo intradérmico. Foi injetado 0,1 ml de cada antígeno: no antebraço direito o antígeno tradicional e, no antebraço esquerdo, o antígeno tratado por ultra-som.

2.4 *Crítérios adotados para a leitura*: foram feitas duas leituras : de 48 horas (reação de Fernandez) e de 30 dias (reação de Mitsuda). Na verdade, a reação de Mitsuda foi lida em um prazo variável entre 30 e 39 dias, com média de 34,5 dias. Os critérios adotados para a leitura foram os formulados em Congressos Internacionais de Leprologia : Madrid, de 1953 e Tóquio, de 1958.

Foram os seguintes:

Reação de Fernandez

- a) Negativa : ausência de reação ou eritema e infiltrações inferiores a 5mm ;
- b) Duvidosa : reação eritemato-infiltrada entre 5-10mm;
- c) Positiva (+) : reação eritemato-infiltrada entre 10-15mm ;
- d) Positiva (++) : reação eritemato-infiltrada entre 15-20mm;
- e) Positiva (+++) reação mato-infiltrada de mais de 20mm de diâmetro.

Reação de Mitsuda

- a) Negativa: ausência de reação;
- b) Duvidosa: infiltração pouco apreciável e menor que 3mm;
- c) Positiva fraca (+) : infiltração entre 3 e 5mm;
- d) Positiva fraca (++) infiltração nodular entre 6-10mm;
- e) Positiva intensa (+++) : infiltração nodular maior do que 10mm ou ulceração.

2.5 *Técnicas de análise estatística empregadas* : para efeito de análise estatística foi empregado o método do X².

Para maior facilidade da análise estatística, os resultados foram separados em dois grupos: os considerados negativos, abrangendo os resultados acima indicados como "duvidosos"; e os positivos que incluíram os itens "c", "d" e "e", independente da intensidade da reação obtida.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram colocados em duas tabelas: Na tabela 1 são apresentados os resultados relativos A reação de Fernandez e, na tabela 2, os da reação de Mitsuda. Os dados foram colocados da seguinte maneira: na coluna vertical os obtidos com o antígeno tratado pelo ultra-som e, na horizontal, os referentes ao antígeno tradicional. Esta distribuição permitiu confrontar os resultados obtidos com ambos os antígenos.

Na tabela 1 procurou-se verificar qual a concordância de resultados, no que se refere à reação de Fernandez:

- a) Foram concordantes em 86 indivíduos, com resultados negativos (92-69%) e em 2, com resultados positivos ++ (1,92%).
- b) Foram discordantes em 5 indivíduos (4,84%).
- c) Não puderam ser avaliados em 11 indivíduos (10,57%).

TABELA 1 - Intradermo-reação de Fernandez em 104 indivíduos são, não comunicantes de hanseníase. Comparação entre 2 antígenos de lepromina: integral (LI) e tratada pelo ultra-som (LUS).

LI \ LUS	LUS				SEM LEITURA	TOTAL
	—	+	++	+++		
—	86(92,69%)	1(0,97%)	0	0	0	87
+	3(2,90%)	0	0	0	0	3
++	0	0	2(1,92%)	0	0	2
+++	1(0,97%)	0	0	0	0	1
SEM LEITURA	0	0	0	0	11(10,57%)	11
TOTAL	90	1	2	0	11	104

TABELA 2 — Intradermo-reação de Mitsuda em 104 indivíduos sãos, não comunicantes de hanseníase. Comparação entre dois antígenos de lepromina: integral (LI) e tratada pelo ultra-som (LUS)

LI \ LUS	LUS				TOTAL
	—	+	++	+++	
—	6(5,77)	0	0	0	6
+	20(19,23)	3(2,88)	0	0	23
++	22(21,16)	27(25,96)	3(2,88)	0	52
+++	5(4,81)	10(9,62)	8(7,69)	0	23
TOTAL	53	40	11	0	104

Os resultados discordantes da reação de Fernandez não são estatisticamente significantes.

Na tabela 2 procedeu-se igual comparação, porém relacionada com a reação de Mitsuda:

a) Foram concordantes os resultados em 6 indivíduos com reação negativa (5,77%) ; em 3 com resultados positivos + (2,88%) e, em 3 com resultados positivos ++ (2,8870):

b) Foram discordantes os resultados em 92 indivíduos (88,47%).

Sob o ponto de vista estatístico, os resultados discordantes da reação de Mitsuda, praticada com antígenos de lepromina integral e tratada pelo ultra-som, são significativos.

4 DISCUSSÃO

O primeiro trabalho a suscitar interesse em torno de antígenos de lepromina submetidos ao ultra-som, foi o de KITANO & INOUE, em 1941. Os autores obtiveram menor grau de positividade da reação de Mitsuda praticada com

esse antígeno, em uma população composta por indivíduos normais, quando comparado com os resultados obtidos com a lepromina integral.

Supondo-se que o antígeno de Mitsuda submetido à vibração sônica contenha todos os elementos bacilares em solução, as respostas ao antígeno integral e ao antígeno desintegrado deveriam ser idênticas. No entanto os resultados obtidos, neste estudo, mostraram que a lepromina integral provocou maior positividade de reações tardias, embora não houvesse diferença significativa entre os dois antígenos na reação precoce.

DHARMENDRA (1978) visando localizar substâncias antigênicas, mostrou ser imprescindível a presença do bacilo íntegro para a reação tardia de Mitsuda. Testou lepromina tradicional e lepromina contendo bacilos fragmentados, em pacientes virchowianos e tuberculóides e comparou as reações precoces e tardias. Concluiu estar a substância antigênica firmemente ligada aos constituintes da parede celular da bactéria mesmo fragmentando os bacilos e submetendo-os a forte pressão

não se consegue remover a fração antigênica do resíduo insolúvel.

KITANO & INOUR (1941) utilizaram ondas supersônicas para a liberação do antígeno solúvel do bacilo de Hansen. Testaram a lepromina tradicional e a lepromina desintegrada e observaram que as reações precoces são mais intensas quando se utilizam bacilos desintegrados. Acreditam que as reações precoces são devidas a componentes bacilares dissolvidos e que os elementos solúveis são incapazes de produzir a reação de Mitsuda, que dependeria de bacilos sólidos.

No presente trabalho, após tratamento por ultra-som restaram aproximadamente 20% de bacilos sólidos e manchas que, quando coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, mostravam um vermelho intenso característico do álcool-ácido-resistência. KITANO & INOUÉ (1941), após a desintegração bacilar, não encontraram indícios de álcool-ácido-resistência.

SINHA *et al.*, (1979) obtiveram 4 frações do antígeno de Mitsuda e do anti-

geno de Dharmendra, por centrifugação e sonificação. Estas frações deram reações precoces positivas, mas as reações tardias só foram obtidas quando utilizaram bacilos íntegros. Estes resultados concordam com os de KITANO & INOUÉ (1941) e com os de DHAR- MENDRA (1978). Neste trabalho foram observadas reações tardias com ambos os antígenos. ABE *et al.*, (1963) observaram que a capacidade de fixação do complemento de lepromina com soros de hansenianos aumentou quando o antígeno foi submetido à vibração sônica, mostrando que esta vibração não destrói a substância ativa. Observaram ainda, que a lepromina com bacilos desintegrados, embora com 50% de bacilos sólidos, da reações precoces fracas ; quanto à reação tardia, pode ser causada não somente pelo bacilo intacto como também pelo bacilo desintegrado.

Concluindo, a técnica de preparação da lepromina, tradicionalmente empregada, embora forneça um antígeno de aparência grosseira, ainda continua a ser a que conduz a resultados mais uniformes.

ABSTRACT — A comparative study on the Fernandez and on the Mitsuda reaction was made in 104 normal people employing whole and sonicated lepromin. Both types of lepromin can induce a good early reaction, and there was no significant difference in the results of the Fernandez reaction. The sonicated lepromin, though it contains all of the components of the original preparation, gives weaker late skin reactions. The results of the Mitsuda reaction were statistically significant.

Key words: Fernandez reaction. Mitsuda reaction. Lepromin. Ultra-sonic waves.

REFERENCIAS

- ABE, M.; NAKAYAMA, T.; TACHIKAWA, N.; OKAMURA, K. 1963. Effect of sonic vibration on the property and potency of lepromin. *La Lepra*, 32(3) :137-140.
- DHARMENDRA. 1978. Studies of the lepromin test. 5. The active principle of lepromin is a protein antigen of the bacillus. *Lepr. India*, 50(1) :64-81.
- HAYASHI, F. 1933 Mitsuda's skin reaction in leprosy. *int. J. Lepr.*, .1(1) :31-38.

- KITANO, H. & INOUÉ, T. 1941. The Mitsuda reaction by vaccines treated with the ultra-super-sonic wave. *Int. J. Lepr.*, 9(1) :29-38.
- SHEPARD, C.C. & McRAE, D.H. 1938. A method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr.*, 36(1) :78-82.
- SINHA, S.; SENGUPTA, U.; RAMU, G.; DESIKAN, K.V. 1979. Assessment of Dharmendra antigen. III. Comparative study with Mitsuda antigen. *Lepr. India*, 51(3) :323-329.

Aceito para publicação em Novembro de 1980.