

OS DIFERENTES TESTES CUTÂNEOS EXISTENTES PARA ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES COM HANSENÍASE

João Renato Rebello Pinho¹
Heitor Franco de Andrade Júnior²
Ana Clara Guerrini Schenberg³

RESUMO - Testes cutâneos são utilizados para o acompanhamento de casos de hanseníase, pois constituem um dos parâmetros para a classificação da forma clínica da doença, prognóstico e mesmo para indicação e acompanhamento do tratamento. Estes testes foram desenvolvidos no início do século e utilizam suspensões de bacilos extraídos de lepromas humanos ou de tatus infectados. Neste artigo, revemos as características do teste da lepromina ou de Mitsuda e dos testes alternativos que foram desenvolvidos. Discutimos também o potencial da utilização de antígenos recombinantes como uma possibilidade futura para a obtenção de testes cutâneos mais específicos e mais padronizáveis em relação àqueles obtidos a partir de seres humanos ou de tatus.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. Testes cutâneos. Lepromina. Antígeno de Mitsuda. Antígenos recombinantes.

INTRODUÇÃO

Testes cutâneos, que medem a resposta celular individual de cada paciente, são bastante importantes para o acompanhamento de casos de hanseníase. Tais testes constituem um dos parâmetros para a classificação da forma clínica da doença²⁰, sendo também utilizados para o prognóstico e acompanhamento do tratamento⁵.

Os testes foram desenvolvidos no início do século por Hayashi (1918)⁶ e Mitsuda (1919)¹⁴ e utilizam suspensões de bacilos extraídos de lepromas humanos ou, a partir dos anos 70, de tatus infectados. Depois que *M. leprae* foi obtido em grande quantidade a partir de tatus, a inativação desta micobactéria começou a ser realizada preferencialmente por irradiação na dose

de 2,5 Mrad, em substituição ao tratamento pelo calor, utilizado na preparação do antígeno extraído de lepromas humanos²⁷. Estudos realizados em seres humanos confirmaram que estes dois antígenos eram equivalentes em testes cutâneos e ambos se tornaram aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para este fim^{9,13}.

A preparação utilizada para os testes cutâneos, conhecida como reagente de Mitsuda ou lepromina integral, consiste de um antígeno bruto, não purificado, preparado a partir de materiais biológicos de diferentes origens e com diferentes quantidades de bacilo. Portanto, torna-se muito difícil a padronização de antígenos preparados em diferentes locais, às vezes, por métodos e protocolos diferentes²¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Adolfo Lutz - São Paulo - SP. E-mail: jrpinho@vsp.br

²Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo.

³Centro de Pesquisas em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de S. Paulo.

DISCUSSÃO

A OMS sugeriu um protocolo padrão para a produção deste antígeno, envolvendo inativação dos bacilos por autoclavagem, homogeneização mecânica dos tecidos, filtração, diluição final numa solução contendo 5% fenol, seguida por nova autoclavagem²⁷. Como controle de qualidade, o produto tem que ser submetido a: 1 - testes de esterilidade, 2 - testes de inocuidade por inoculação intraperitoneal em camundongos e cobaias, 3 - testes cutâneos em cobaias (não deve induzir necrose), 4 - verificação da concentração protéica (não deve ser maior do que aquela encontrada em lotes sabidamente seguros para uso humano), 5 - verificação do conteúdo de fenol (não deve ser maior que 5,5 g por litro), 6 - contagem de bactérias (deve estar entre $4,0 \times 10^7$ e $1,6 \times 10^8$ bacilos por ml)²⁷. É importante notar que existe apenas uma exigência quantitativa em relação à concentração protéica; conseqüentemente, os preparados finais podem variar bastante quanto às diferentes espécies antigênicas presentes.

Os testes de Mitsuda e de Montenegro (utilizado para leishmaniose) são os únicos testes de imunidade celular nos quais a leitura não é feita em 24 e 48 horas, mas após 28 dias e 72 horas, respectivamente, quando ocorre a formação de um granuloma e hipersensibilidade¹. De fato, existe também a reação de Fernandez (1940)¹, na qual a leitura é feita 48 horas após a inoculação do antígeno de Mitsuda, mas os resultados deste teste são bastante irregulares, provavelmente porque a composição das proteínas solúveis nesta preparação é também irregular³.

Assim, o teste de Mitsuda não só mede a resposta de hipersensibilidade tardia pré-existente, como também pode funcionar como uma imunização em doses muito baixas^{30,10,26}. Ademais, pode-se encontrar resposta cruzada provocada por antígenos semelhantes de outras micobactérias". Por todas estas razões, o teste não é específico para *M. leprae* e pode se encontrar positividade mesmo em populações não endêmicas¹⁵.

Para preservar a imunogenicidade do

antígeno, o protocolo de sua preparação envolve a aplicação de técnicas não muito agressivas^{22,23}. Em decorrência, proteínas derivadas de tatu ainda estão presentes na preparação, como foi recentemente comprovado¹⁶, confirmando dados prévios, que referiam a presença de proteínas não pertencentes à *M. leprae* nestas preparações. Estas proteínas do hospedeiro podem interferir com o resultado dos testes cutâneos, como observado anteriormente, tanto com o antígeno preparado a partir de lesões humanas^{7,8,11}, como com o antígeno preparado a partir de tatus infectados¹³.

Como alternativa ao antígeno de Mitsuda, foram desenvolvidos extratos de antígenos solúveis, preparados a partir de *M. leprae* irradiados extraídos de tatu¹⁹. Em relação ao antígeno de Mitsuda, esta preparação apresentaria duas vantagens: 1 - indução de resposta de hipersensibilidade tardia local, cuja leitura é feita 48 horas após o desafio, de forma mais reprodutível do que a reação de Fernandez^{1,24,25}; 2 - incapacidade de imunização do indivíduo submetido ao teste cutâneo, permitindo a avaliação da eficácia vacinal sem interferência de efeitos induzidos pelo próprio teste cutâneo⁴. Entretanto, foi demonstrado que a realização prévia de um teste cutâneo com antígenos solúveis pode interferir no resultado de outro teste posterior¹⁷. A falta de padronização destes antígenos leva a resultados divergentes quando o mesmo indivíduo é avaliado por dois antígenos diferentes¹⁸.

Neste contexto, a pesquisa de antígenos recombinantes de *M. leprae* que possam ser utilizados em testes cutâneos para a monitorização da imunidade celular contra *M. leprae*, é uma das prioridades da OMS²⁸. A obtenção destes antígenos deve permitir o preparo de quantidades maiores de reagentes, com purificação simples, com menores riscos de contaminantes e com padronização mais fácil entre os diferentes preparados. Além disso, através da escolha cuidadosa dos antígenos, poderiam ser preparados testes específicos para o *M. leprae*, que pudessem ser realizados repetidamente, sem interferência substancial em testes posteriores.

SUMMARY .Skin tests are utilized in the follow up of leprosy patients, constituting one of the parameters for the classification of the clinical forms of this disease, its prognosis and even for treatment indication and follow up. These tests have been developed in the first quarter of this century and are based on bacilli suspensions obtained from human lesions or from infected armadillos. In this paper, we review the characteristics of lepromin or Mitsuda antigen and other alternative tests. The potential of recombinant antigens in the preparation of skin tests is also highlighted as a future perspective for the preparation of improved, standardized and more specific reagents, in comparison from those tests obtained from human lesions or armadillos.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Skin tests. Lepromin. Mitsuda antigen. Recombinant antigens.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado por World Health Organization/ Tropical Diseases Research Programme / World Bank, Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, LIMHCMUSP e CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONVIT, J., PINARI, M.E., AVILA, J.L. et al. Specificity of the 48 hour reaction to the Mitsuda antigen. **Bull. WHO**, v.52: 187-191, 1975.
2. FERNANDEZ, J.M.M. The early reaction induced by lepromin. **Int. J. Leprosy**, v.8, p.1-14, 1940.
3. GILL, H.K., MUSTAFA, A.S., GODAL, T. Vaccination of human volunteers with heat - killed *M. leprae*: local responses in relation to the interpretation of the lepromin reaction. **Int. J. Leprosy**, v. 56. p.36-44, 1988.
4. GUPTA, M.D., VALLISHAYEE, R.S., ANATHARAMAN, D.S. et al. Effect of skin test with *M. leprae* soluble antigen on reaction to a subsequent test with the same antigen. **Int. J. Leprosy**, v.60, p.54-60, 1992.
5. HASTINGS, R.C., GILLIS, T.P., KRAHENBUHL, J.L. et al. **Leprosy. Clin. Microbial. Rev.**, v.1, p.330- 348, 1988.
6. HAYASHI, Y. On a pure culture of leprosy bacilli and skin reactions by means of the pure culture suspensions. Saikin-qaku Zasshi J. Bacteriol., v.272, p.51-53, 1918. Republicado em **Int. J. Leprosy**, v.21, p.370-372, 1953.
7. KOUIJ, R., GERRITSEN, T. Positive 'lepromin' reactions with suspensions of normal tissue particles. **Int. J. Leprosy**, v.24, p.71-181, 1956.
8. KOUIJ, R. The nature of the Mitsuda reaction. **Leprosy Rev.**, v.30, p.137-139, 1959.
9. KUMAR, B., KAUR, S., SHARMA, V.K. et al. Lepromin-H versus lepromin-A. **Ind. J. Leprosy**, v.56, p.50-57, 1984.
10. LARA, C.B., NOLASCO, J.O. Self - healing, or abortive, and residual forms of childhood leprosy and their probable significance. **Int. J. Leprosy**, v. 24, p.245-263, 1956.
11. LEIKER, D.L. Studies on the lepromin test: I. influence of the bacillary and tissue components in dilutions of lepromin. **Int. J. Leprosy**, v.29, p.157-167, 1961.
12. MEHRA, V.L., SALGAME, P., SNAPPER, S.B. et al. Vaccines against leprosy. In: PLATKIN, S.A., MORTIMER JR., E. A. eds. **Vaccines**. Philadelphia: WB Saunders, 1988.
13. MEYERS, W.M., KVERNES, S., BINFORD, C.H. Comparison of reactions to human and armadillo lepromins in leprosy. **Int. J. Leprosy**, v.43, p.128-225, 1975.
14. MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. Hifuka Hinyōka Zasshi. Japanese Journal of Dermatology and Urology, v.19, p.697-708, 1919. Republicado e traduzido em: **Int. J. Leprosy**, v.21, p.347-358, 1953.

15. NEWELL, K.W. An epidemiologist's view of leprosy. **Bull. WHO**, v.34, p.827-857, 1966.
16. PESSOLANI, M.C.V., HUNTER, S.W., BRENNAN, R. Relationship between host histones and armadillo. derived *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Leprosy**, v. 61, p.381-388, 1993.
17. PINTO, M.R.M., ERIYAGAMA, N.B., PEMAJAYANTHA, V. Immunological effects of lepromin testing in sri Lankan population groups. II. Effect on reactivity to a soluble protein antigen of *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Rev** v.58, p.227-232, 1987.
18. PONNINGHAUS, J.M., FINE, P.E.M. Sensitization studies with potential leprosyvaccine preparations in Northern Malawi. **Int. J. Leprosy**, v.54, p.25-37, 1986.
19. REES, R.J.W. Progress in the preparation of an antileprosy vaccine from armadillo-derived *Mycobacterium leprae*. **Int. I. Leprosy**, v.51, p.515-518, 1983.
20. RIDLEY, D.S., JOPLING, W.B. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. **Int. J. Leprosy**, v.34, p.255-273, 1966.
21. SENGUPTA, U. Studies on lepromin and soluble antigens of *M. leprae*: their classification, standardization and use. **Indian. J. Leprosy**, v.63, p.457-463, 1991.
22. SHEPARD, C.C., DRAPER, P., REES, R.J.W. et al. Effect of purification steps on the immunogenicity of *Mycobacterium leprae*. **Br.J. Exp. Pathol.**, v.61, p. 376-379, 1980.
23. SHEPARD, C.C., MINAGAWA, F., VAN LANDIGHAM, R.V. et al. Foot pad enlargement as a measure of induced immunity to *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Leprosy**, v.48, p.371-381, 1980.
24. SHIELD, M.J., STANFORD, J.L., GARBAJOSA, G. et al. The epidemiological evaluation, in burma, of the skin test reagent LRA6; a cell free extract from armadillo derived *Mycobacterium leprae*. Part 1: leprosy patients. **Int. J. Leprosy**, v. 50, p.436-445, 1982.
25. SHIELD, M.J., STANFORD, J.L. The epidemiological evaluation, in burma, of the skin test reagent LRA6: a cell free extract from armadillo derived *Mycobacterium leprae*. Part 2: close contacts and non-contacts of bacilliferous leprosy patients. **Int. J. Leprosy**, v.50, p.446-454, 1982.
26. WADE, H.W. Induction of lepromin reactivity by repeated lepromin testing. **Int. J. Leprosy**, v.23, p. 310-315, 1955.
27. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommended safety requirements for the preparation of lepromin: a WHO memorandum. **Bull. WHO**, v.57, p.921-923, 1979.
28. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy. In: _____ **Tropical Diseases Research: Progress 1991 - 1992**. Eleventh Programme Report of the UNDP/ World Bank/ WHO special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: 1993. p.47-55.