

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 42

Fevereiro, 1945

Fascículo 1

Nota sobre Tuberculinas

por

Estácio Monteiro

Um dos fenomenos alérgicos mais conhecidos é a reação da tuberculina. Este produto foi descoberto por KOCH (14, 15 e 16) em 1890, tendo em vista principalmente o tratamento da tuberculose. A generalização, logo após sua descoberta, desta terapêutica, foi rápida, porém os resultados, em muitos casos, não corresponderam à expectativa, pois suas indicações não estavam ainda estabelecidas. Atualmente é empregada quase que exclusivamente em certos casos de infecção crônica e principalmente nas localizações oculares. Os fracassos desta terapêutica são devidos a que o organismo infetado reage de maneira intensa e violenta, mesmo a pequenas doses. Esta sensibilidade, que é específica, permitiu o emprêgo da tuberculina como um alergeno em testes cutâneos para verificação dos indivíduos sensíveis.

Têm sido propostas diversas técnicas para praticar a reação, porém o método da cuti-reação de VON PIRQUET (27) e o da intradermo-reação de MANTOUX (22) são os mais usados em medicina humana. Para os detalhes sobre estas técnicas e interpretação dos resultados aconselhamos o trabalho de SUTHERLAND (26).

PREPARO DA TUBERCULINA

A tuberculina obtida por KOCH consiste em um caldo de carne peptonado a 1 % e glicerinado a 5 %, com pH ligeiramente alcalino, no qual se de-

* Recebido para publicação a 28 de julho de 1944 e dada à publicidade em fevereiro de 1945.

envolveu o bacilo da tuberculose durante 2 meses, filtrado e concentrado por evaporação ao décimo. Este produto é o que se denomina "tuberculina bruta".

Com o fim de obter produtos melhores, diversos pesquisadores propuseram modificações de técnica muito variáveis. Quanto aos meios de cultura foram indicadas não só pequenas modificações tendo por base o meio proposto por KOCH (tal como empregar carne de vitela, etc.) como também o emprego de meios sintéticos, como os de SAUTON (24), CALMETTE, MASSOL e BRETON (6), ARMAND-DELILLE, MAYER, SCHAEFFER e TERROINE (1), DORSET (9), LONG (20), etc. Outras modificações, como o tempo de permanência na estufa, a filtração e o modo de concentração, são de pouca importância, pois, de um modo geral, seguem os mesmos preceitos observados por KOCH. No entanto, o emprego de determinadas amostras tem importância considerável devido a que nem todas as amostras de bacilo de KOCH produzem tuberculinas ativas. Atualmente as amostras do tipo humano RATTI e do tipo bovino VALLÉE têm sido muito referidas na literatura, como amostras tuberculígenas por excelência (3). Realmente estas amostras produzem uma tuberculina muito ativa e devem ser empregadas de preferência. Muitos autores aconselham usar amostras do tipo humano e do tipo bovino e misturar os produtos finais em partes iguais ou 2/3 da do tipo humano e 1/3 da do tipo bovino e vice-versa. Sobre esta questão diversos pesquisadores acham imprescindível o preparo da tuberculina com bacilos dos dois tipos, pois acham que nos casos de infecção pelo bacilo bovino, como também na imunização pelo B. C. G., a tuberculina produzida com germes do mesmo tipo provoca reações mais intensas. No entanto, tem sido verificado que há um excesso neste ponto de vista, pois muitas amostras do tipo humano dão tuberculinas que reagem de modo idêntico nestes casos, naturalmente devido a que as diferenças entre os dois tipos são mínimas (GERSHENFELD, 1939) (11). Um dos trabalhos que mostra a grande quantidade de modificações que têm sido propostas é o de CALMETTE e DE POTTER (5).

Entretanto, alguns pesquisadores não se limitaram somente às variações acima esboçadas. Procuraram purificar e obter o princípio ativo da tuberculina em estado puro. SEIBERT, LONG e outros (21), desde 1926, vêm publicando os resultados de suas pesquisas neste sentido, sendo que somente em 1934 (25) relataram ter obtido um produto uniforme e de muita atividade denominado "Purified protein derivative" ou "P. P. D.". É obtido a partir de uma tuberculina preparada em meio sintético eliminando as proteínas não ativas por processos de precipitação.

Desde o início de 1942 viemos, sob orientação do Dr. J. G. Lacorte, preparando tuberculina no Instituto Oswaldo Cruz e temos procurado obter

um produto com o máximo de atividade e que conserve esta propriedade durante um tempo longo. De comêço empregamos a técnica de KOCH com pequenas modificações e em seguida fomos fazendo experiências usando diversos meios. Experimentamos o caldo glicerinado preparado com carne de vitela e com extrato de carne (LIEBIG) e também os meios sintéticos de SAUTON, de LONG e de DORSET. O meio que deu melhores resultados foi o meio de DORSET não só pela atividade da tuberculina obtida como também pela facilidade de preparo e crescimento rápido e abundante. Este meio usa como fonte de nitrogênio a asparagina, entrando também em sua composição o citrato de ferro e a glicose que, segundo trabalhos de HENLEY (12, 13), têm influência acentuada no crescimento do bacilo de KOCH.

A técnica que temos adotado é a seguinte, em linhas gerais:

Os germes do tipo humano (amostra RATTI) e do tipo bovino (amostra VALLÉE) são conservados em batata por semeaduras bimensais e na ocasião do preparo da tuberculina fazemos culturas em pequenos balões contendo meio de DORSET com o fim de adaptar a amostra ao meio líquido.

O meio que temos empregado ultimamente não é preparado rigorosamente segundo a técnica de DORSET, pois temos introduzido modificações com o fito de facilitar o manejo de grandes volumes. A fórmula do meio que temos usado é a seguinte:

Asparagina	10,0 g
Fosfato dipotássico	1,0 "
Citrato de sódio	0,75 "
Sulfato de magnésio	1,5 "
Citrato de ferro	0,3 "
Glicose	10,0 "
Glicerina	100 cc.
Água	1000 cc.

Colocamos todos os ingredientes, exceto a glicerina, para dissolução, em certa quantidade de água, e aquecemos até dissolver completamente; em seguida completamos o volume com água e juntamos a glicerina. Ajusta-se a reação ao pH 7,2 a 7,4 com solução de soda a 5%. Leva-se, então, o líquido à autoclave e aquece-se até a pressão chegar a 1 atmosfera; em seguida apaga-se o fogo da autoclave e deixa-se esfriar. Desta maneira obtemos uma ligeira precipitação sem alterar a glicose. Filtra-se em papel de filtro para retirar o precipitado e reajusta-se o pH. Faz-se distribuição e esteriliza-se na autoclave à pressão de $\frac{1}{2}$ atmosfera, durante 20 minutos.

A modificação essencial que introduzimos foi a diminuição da asparagina, pois DORSET recomenda 14 g por litro. Verificamos que, diminuindo a

asparagina até 10 g por litro, não se nota diferença apreciável, porém com menor quantidade o desenvolvimento não se processa com tanta intensidade, sendo mesmo difícil obter, com 2 meses e mais, induto cobrindo tôda a superfície do meio.

Logo que se tenha obtido crescimento nos balões pequenos, isto no fim de 25 a 30 dias, realizamos o repique retirando com a alça de platina um fragmento do induto. Usamos, então, garrações de 8 litros de capacidade, de preferência de vidro Pyrex, com 2,5 litros de meio, inclinados de modo a obter o máximo de superfície. A escolha dêstes frascos foi devida à necessidade de grande quantidade de tuberculina, como também para evitar contaminações que se mostravam muito freqüentes nos frascos tipo FERNBACH que usávamos anteriormente.

O desenvolvimento é rápido, cobrindo logo tôda a superfície do meio. Temos observado que neste meio o induto é muito espesso, dando uma quantidade de germes muito maior que nos outros meios experimentados. Esta observação está de acôrdo com o trabalho de DORSET (9) que verificou, comparando nas mesmas condições o meio clássico de caldo de carne glicerinado com o meio sintético, obter-se neste último, em 100 cc. de meio, 2,0 g de bacilos secos, ao passo que no anterior sòmente 0,5 a 0,7 g.

Depois de 6 a 8 semanas de incubação a 37° C., esteriliza-se a cultura pelo vapor fluente, na autoclave, durante uma hora. Em seguida filtra-se em papel de filtro grosso a fim de separar os corpos bacilares e passa-se à fase seguinte da concentração. Para isso coloca-se o filtrado em placas de porcelana e em banho-maria fervente reduz-se o volume ao décimo. Filtra-se novamente em papel de filtro e procede-se à distribuição em âmpolas ou tubos capilares.

Em geral empregamos sòmente a amostra humana RATTI, porém temos juntado também 1/3 do volume de tuberculina da amostra VALLÉE. Os resultados obtidos têm sido idênticos quanto à atividade.

A tuberculina preparada pela técnica descrita tem se mostrado de grande atividade, não havendo quase variações nas diferentes partidas e quando conservada por longo tempo, mesmo à temperatura ambiente, não mostra perda em seu poder.

VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE

A verificação da atividade é um problema sôbre o qual os pesquisadores têm chamado a atenção com o intuito de têmos tuberculinas uniformes. O ideal seria podermos representar a atividade por meio de unidades, porém os diversos trabalhos neste sentido não resultaram satisfatórios.

Os métodos empregados são muitos, podendo ser divididos em três grupos, como faz DADDI (7)

- 1.º, métodos baseados no poder tóxico;
- 2.º, métodos baseados em reações imunitárias e
- 3.º, métodos baseados no poder cuti-reacional.

Dos métodos do primeiro grupo temos, principalmente, o processo usado por KOCH e aperfeiçoado por Otto (23) em 1906, que consiste em infetar um lote grande de cobaios de 350 a 400 g de peso, pela inoculação de 0,5 miligrama de cultura, em caldo glicerinado de 2 a 3 semanas, de uma amostra virulenta. Ao fim de 20 dias sacrificam-se alguns animais para nos assegurarmos da infecção, o que se repete ainda uma semana depois. Sendo afirmativo o estado infeccioso dos cobaios, injetam-se doses de 0,05 a 0,3 cc. de tuberculina por via subcutânea. A menor quantidade que matar o cobaio em 24 horas é o título da tuberculina.

Outro método deste grupo é a "Spermatocyt-tuberculin-reaction" de LONG (19), proposto em 1925. Baseia-se no fato do tecido testicular ser muito sensível à tuberculina, apresentando necrose mesmo com pequenas doses. Consiste em injetar doses variáveis de tuberculina, de mais ou menos 0,01 a 0,00001, no testículo de cobaios de 400 g de peso, preliminarmente infetados por inoculação de cultura de bacilos, de modo a obter um nódulo caseoso na região linfática correspondente (no fim de um mês aproximadamente). Os resultados podem ser interpretados numa fase precoce ou tardia. A fase tardia, no fim de 3 a 4 semanas, dá resultados muito seguros pelo exame histológico. A menor quantidade capaz de inibir a espermatogênese corresponde a 1 unidade. Segundo LONG este método dá resultados constantes e é muito sensível, porém tem o inconveniente de ser de técnica delicada e muito demorado.

Outro método enquadrado neste grupo foi descrito por LINGELSHEIM (18) e por BORREL (2) consistindo em inoculações intracerebrais em cobaios sãos e infetados. Devido a causas de erro inerentes ao próprio produto, como a glicerina, a peptona, etc., não tem especificidade, sendo logo abandonado.

Dos métodos baseados em reações imunitárias temos a considerar: o método da fixação do complemento, estandardizado por WATSON e HEATH (28) e o método de precipitação de DREYER e VOLUM (10).

O primeiro foi proposto em 1924, sendo feito usando-se soro de cavalo ou boi infetado experimentalmente por inoculação intravenosa de bacilos de KOCH. A técnica consiste em diluir a tuberculina a 1/20 e usar doses de 0,1 a

1,3 cc., praticando-se a reação de fixação de acôrdo com a técnica estabelecida por BORDET. Baseando-se na quantidade de tuberculina que fixa o complemento em presença do anticorpo (sôro de boi ou cavalo) estabelece-se o número de unidades por centímetro cúbico em comparação com uma tuberculina padrão.

O outro método de precipitação ou fluculação, publicado em 1924, consiste em pôr em contato diluições de tuberculina com sôro precipitante obtido em cavalos por inoculação de bacilos desengordurados. Os resultados obtidos, em comparação com uma tuberculina padrão, são expressos em unidades.

Os métodos cuti-reacionais baseiam-se na prática de reações, tanto pela técnica de VON PIRQUET como pela de MANTOUX, em animais tuberculizados ou no homem, em comparação com tuberculinas de atividade comprovada. Os trabalhos de MANTOUX e MOUSSE, RÖMER, LOEWENSTEIN e outros (29) convergem para o emprêgo de cobaios tuberculosos, como os usados no método de OTTO. Nestes animais fazem-se intradermo ou cuti-reações com a tuberculina em prova e a padrão e apreciam-se os resultados. CALMETTE e DE POTTER (5), no trabalho sôbre padronização de tuberculinas de 1926, indicam preferir a comparação num mesmo cobaio para evitar as variações reacionais verificadas nos vários animais. Os bovídeos também têm sido empregados por DOUGLAS, BUXTON e DUNKIN (29), principalmente com tuberculina para uso veterinário.

Como vemos, pela variedade de técnicas, todos os métodos de verificação de atividade de uma tuberculina apresentam suas falhas, ficando seu emprêgo dependente da preferência de cada um. A impressão que temos é que esta verificação depende da aplicação a que se destina a tuberculina. No nosso caso, em que preparamos tuberculina para provas cutâneas e uso humano exclusivo, achamos preferível fazer a comparação no próprio homem. Naturalmente os animais também se apresentam alérgicos, mas há sempre dúvida se no homem determinada tuberculina reage de maneira diferente, em vista de ter sido verificado que, comparando tuberculinas no boi e no homem infetados, as reações apresentam algumas vêzes grandes diferenças (5).

Também um ponto de interêsse é que o poder tóxico e o cuti-reacional não estão sempre na mesma relação, o que já foi anotado por LACORTE (17) e outros. Muitas partidas mostram pouco poder tóxico e, no entanto, dão cuti-reações típicas.

Para o caso de tuberculina para fins terapêuticos, além do poder cuti-reacional, parece-nos necessário também a verificação do poder tóxico, que deve ser feito de preferência segundo as normas de OTTO.

Com relação aos metodos imunitários, CALMETTE (4) e outros opõem sérias objeções, pois o poder antigênico *in vitro* em geral não está em relação com o poder cuti-reacional, como também não exprime o poder tóxico.

Tendo em vista estas considerações e sendo nossa tuberculina exclusivamente para provas alérgicas, adotamos verificar a atividade das diversas partidas em comparação com uma tuberculina padrão no próprio homem, usando um grupo de 15 a 20 indivíduos adultos, pelo método de VON PIRQUET. Assim, com um grupo de indivíduos, tomados indistintamente, temos a vantagem de ter tôdas as gradações nas reações e verificar como a amostra em exame reage tanto nos indivíduos pouco alergizados como nos intensamente sensíveis.

Os resultados têm sido satisfatórios e aconselhamos esta prática presumindo possuirmos uma boa tuberculina padrão.

RESUMO

O A. faz considerações sôbre a técnica de preparação da tuberculina e relata o método que usa no Instituto Oswaldo Cruz. Este método consiste no emprêgo de amostras de bacilo de KOCH do tipo humano (RATTI) e do tipo bovino (VALLÉE) cultivadas em meio de DORSET, com pequenas modificações. Este meio foi o que mostrou melhores resultados em comparação com outros experimentados. Com relação à verificação da atividade, examina os diversos métodos empregados e mostra preferir o método comparativo com uma tuberculina padrão, pela reação de VON PIRQUET, num grupo de indivíduos adultos, tomados indistintamente.

NOTICE ON TUBERCULINS

Summary

The A. makes considerations on the technique of preparing tuberculins and reports the method which he uses at the Instituto Oswaldo Cruz. This method consists in the use of Koch's bacillus strains both of human (Ratti) and bovine type (Vallée) cultivated on Dorset's medium slightly modified. This medium was that which afforded better results as compared with others experimented by the A. As to the verification of the tuberculin activity, the A. examines the various methods employed and gives the preference to the method of comparison with a standard tuberculin, by means of Von Pirquet's reaction, in a group of adult individuals, taken indiscriminately.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ARMAND-DELILLE, P., MAYER, A., SCHAEFFER, G. & TERROINE, E.
1912. Culture du bacille de Koch en milieux chimiquement défini.
C. R. Ac. Sc. Vol. 154, pgs. 537-539.
- 2) BORRELL, A.
1904. Bacilles tuberculeux et para-tuberculeux.
Bull. Inst. Pasteus. T. 2, pgs. 409-421.
- 3) BRAGA, A.
1941. Soros, vacinas, alergenos e imunigeos.
Rio de Janeiro, 3.º vol., pgs. 83-115.
- 4) CALMETTE, A.
1936. L'infection bacillaire et la tuberculose.
Masson et Cie. Paris. 4.º ed.
- 5) CALMETTE, A. & DE POTTER
1926. Sur le titrage des tuberculines.
Société des Nations. Genève.
- 6) CALMETTE, A., MASSOL, L. & BRETON, M.
1909. Milieux de culture pour le bacille tuberculeux.
C. R. Soc. Biol. Vol. 67, pgs. 580-582.
- 7) DADDI, G.
1938. Il bacillo di Koch.
Licinio Capelli, Edit. Bolonha. Itália.
- 8) DE POTTER, F.
1927. Sur les propriétés antigènes et réactionnelles des tuberculines.
Arch. Intern. Pharm. & Therap. Vol. 33, pgs. 115-185.
- 9) DORSET, M.
1934. A comparison of Koch's old tuberculin with a now synthetic-medium tuberculin.
J. A. Veter. Med. Ass. Vol. 84, pgs. 439-456.
- 10) DREYER, G. & VOLLUM, R. L.
1924. A precipitation method for the standardization of "old" tuberculin.
Lancet, Vol. 2, pgs. 1003-1007.
- 11) GERSHENFELD, L.
1939. Biological products.
Romaine Pierson Publishers. New York, pgs. 177-188.
- 12) HENLEY, R. R.
1925. The influence of iron on the growth of the tubercle bacillus upon glicerinated beef broth.
Am. Rev. Tuberc. Vol. 12, pgs. 246-259.

- 13) HENLEY, R. R.
1926. Dextrose in synthetic media for the tubercle bacilli.
Am. Rev. Tuberc. Vol. 13, pas. 393-397.
- 14) KOCH, R.
1890. Weitere Mittheilungen Über ein Heilmittel gegen Tuberculose.
Berl. Klin. Woch. Vol. 27, pgs. 1077-1080.
- 15) KOCH, R.
1891. Fortsetzung der Mittheilungen Über ein Heilmittel gegen Tuberculose.
Deut. Med. Woch. Vol. 17, pgs. 101-102.
- 16) KOCH, R.
1891. Weitere Mittheilung Über das Tuberkulin.
Deut. Med. Woch. Vol. 17, pgs. 1189-1192.
- 17) LACORTE, J. G.
1944. Temas de Imunologia.
Livr. Odeon Edit. Rio de Janeiro, pgs. 57-60.
- 18) LINGELSHEIM
1898. Ueber die Werth bestimmung der Tuberkulose giftpräparate.
Deut. Med. Woch. Vol. 24, pgs. 583-585.
- 19) LONG, E. R.
1925. Standardization of tuberculin: assay on basis of spermatocyte reaction.
J. Inf. Dis. Vol. 37, pgs. 368.
- 20) LONG, E. R. & SEIBERT, F. B.
1926. A non protein medium suitable for the production of tuberculins in large quantity.
Am. Rev. Tuberc. Vol. 13, pgs. 393-397.
- 21) LONG, E. R. & SEIBERT, F. B.
1926. The chemical composition of the active principle of tuberculin.
Am. Rev. Tuberc. Vol. 13, pgs. 393-493.
- 22) MANTOUX, CH.
1908. Intradermo-réaction de la tuberculine.
C. R. Ac. Sc. Vol. 174, pgs. 355-357.
- 23) OTTO, R.
1906. Die Staatliche Prüfung der Heilsera.
Arbeiten aus dem Königlichen Institut für Expermentelle Therapic zu Frankfurt A. M. N.º 2, pgs. 75-79.
- 24) SAUTON, M. B.
1912. Sur la nutrition minerale du bacille tuberculeux.
C. R. Ac. Sc. Vol. 155, pgs. 860-861.

- 25) SEIBERT, F. B., ARONSON, J. D., REICHEL, J., CLARK, L. T. & LONG, E. R.
1934. Purified protein derivative. A standardized tuberculin for uniformity in diagnosis and epidemiology.
Am. Rev. Tuberc. Vol. 30, pgs. 705-768.
- 26) SUTHERLAND, H.
1936. The tuberculin handbook.
Oxford University Press. London.
- 27) VON PIRQUET,
1907. Ueber Tuberculinimpfung.
Deut. Med. Woch. Vol. 33, pg. 865.
- 28) WATSON, E. A. & HEATH, L. M.
1924. Studies of biological preparation by complement-fixation methods. II Tuberculin: a new method of standardization.
J. Am. Veter. Med. Ass. Vol. 66, pgs. 24-35.
- 29) AD. CALMETTE, A. & DE POTTER.
-