

Preparo de Antígenos (Leprolinas Souza-Araujo) de culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de leprosos

Seu emprêgo intradérmico, comparativamente com o da Lepromina, e subcutâneo ou intravenoso como tentativa terapêutica

pelo

Dr. H. C de Souza-Araujo

(Com cinco figuras intercaladas no texto)

Introdução.

Em trabalho anterior, que publiquei em 1937 nestas Memórias (1), dei a técnica do preparo de antígenos de culturas de bacilos ácido-alcool resistentes de procedência leprosa, e os resultados do seu uso intradérmico. Cheguei a empregar dez culturas diferentes, das quais sete figuram nos Catálogos do *Lister Institute*, de Londres e da *American Type Culture Collection*, de Washington, nenhuma, porém, era original minha. Nestes últimos três anos tendo obtido várias culturas originais, semeando material leproso (2) ou semeando sedimentos de ixodídeos (3) e triatomídeos (4) infectados em leprosos, culturas essas puras, de bacilos ou cocobacilos com as propriedades de resistência aos ácidos minerais, ao álcool e à acetona, fortes e permanentes, e de morfologia idêntica à do bacilo de HANSEN proveniente de lesões cutâneas flóridas ou de linfa sub-cutânea de leprosos, resolvi preparar com elas novas séries de antígenos, que por analogia com o de ROST (5) denominei de LEPROLINAS. Tratando-se de culturas originais e os produtos sendo da minha exclusiva responsabilidade científica, decidi designá-los "*Leprolinas Souza-Araujo*", cujos números correspondem aos números das culturas com que foram preparados, e que entraram para a *American Type Culture Collection* com a denominação de *Leprosy Cultures Souza-Araujo* I, II, III, etc.

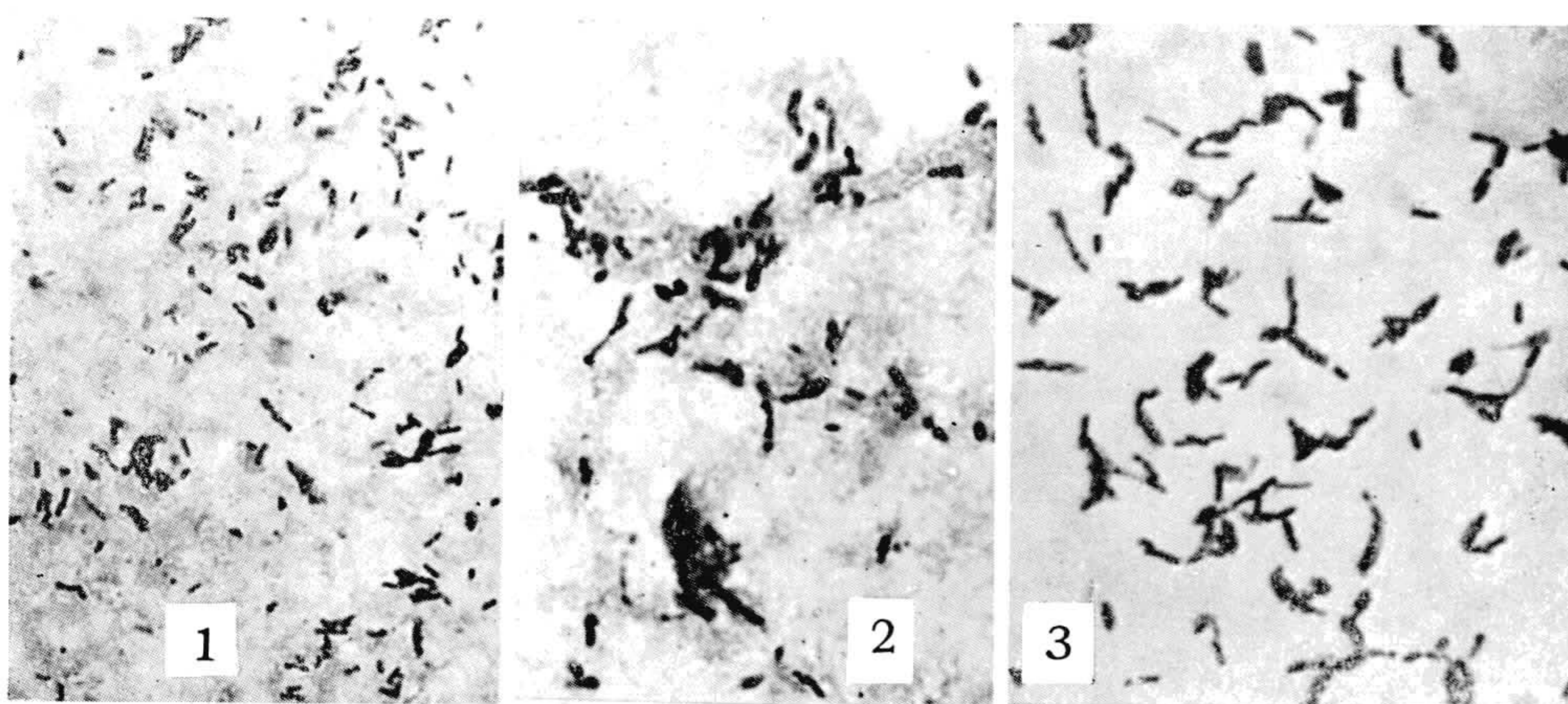
Das minhas seis culturas originais então sobreviventes (hoje são em maior número), somente quatro produzem véus cobrindo toda a superfície de 100 c.c. de caldo glicerinado a 5 %, colocados em balões ERLLENMEYER de capacidade de 200 c.c. e mediante uma permanência longa (um a três meses) na estufa a 37.º C. As outras duas culturas (amostras "Ramtun" e "José Carlos") produzem véus imperfeitos e insuficientes para o fabrico

* Recebido para publicação a 16 de novembro e dado à publicidade em dezembro de 1943.

de regular quantidade de antígenos. Além das seis culturas originais tenho duas rétroculturas (1a e 1b) obtidas de lesões de cobaia e de rato branco que foram inoculados por mim com a cultura N.º 1 (amostra "José"), as quais também produzem véus iguais ao da original.

Técnica adotada no fabrico das Leprolinas

Estando provado que a melhor *Lepromina* é a preparada com emulsão total de lepromas floridos, estirpados sem pele, e mais rica em bacilos de HANSEN, consultei ao Dr. ASTROGILDO MACHADO, um dos maiores técnicos em bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, sobre uma técnica pela qual eu



Microfotografias J. Pinto.

Aspecto microscópico das Leprolinas 1 (Fig. 1), 1a (Fig. 2) e nº 5 (Fig. 3).

conseguisse aproveitar a massa total dos bacilos das minhas culturas e os seus produtos. Ele me aconselhou como a mais conveniente a da homogeneização da cultura total, por agitação elétrica durante 10 dias e 10 noites, sem cessar, após adicionar nela ácido fênico liquefeito na proporção de 0,5% sobre o seu volume atual. Obtida essa emulsão e verificada a sua esterilidade, por meio de sementeiras nos meios apropriados, bastaria diluí-la em água fenicada a 0,5 %, na proporção de 10 para 100 e distribuí-la, assépticamente, em empolas. Essa técnica me deu bons resultados, cumprindo-me agora agradecer ao Dr. A. MACHADO a sua valiosa colaboração e o interesse que vem tomando pelas minhas pesquisas.

A primeira partida de *Leprolina* fabricada foi a de N.º 5, proveniente da cultura obtida do leproso paranaense *Rudan*, mediante trituração e se-

meadura de carrapatos (*Boophilus microplus*) nele infectados. Tratava-se duma cultura de três meses, em caldo glicerinado a 5%, proveniente de repicagem de outra já bem desenvolvida em meio de LOEWENSTEIN. A operação teve a seguinte marcha :

1) aos 120 cc de caldo, com denso depósito e completo véu rugoso, de pigmentação amarelada, adicionei 0,60 cc de ácido fênico liquefeito e agitei o balão, vigorosamente. Deixei-o na geladeira durante 24 horas;

2) a 20 de abril, passei o conteúdo total do balão para um frasco azul, de capacidade de 600 cc, com 50,0 gramas de pérolas de porcelana esterilizadas;

3) mandei colocar este frasco no agitador elétrico, onde permaneceu, sob constante agitação, durante 10 dias e 10 noites;

4) a 30 de abril foi o frasco retirado do agitador. A cultura, completamente homogenizada, apresentava o aspecto de água leitosa pingada com chocolate;

5) dessa emulsão semeei, com uma pipeta estirada, algumas gotas em meio de LOEWENSTEIN e em caldo e agar glicerinados a 5%. Após cinco dias de incubação a 37° C. verifiquei ausência de qualquer germinação;

6) diluí essa emulsão em água fenicada a 0,5% na proporção de 10 para 100 centímetros cúbicos. A figura n. 3 mostra o aspecto microscópico dessa emulsão, cuja turbidez tinha o aspecto de água fracamente leitosa;

7) mandei distribuir, asséticamente, o total da emulsão em empôlas de dois centímetros cúbicos, correspondentes a vinte doses intradérmicas.

Verificação da inocuidade da Leprolina N.º 5.

Conservei o produto na geladeira durante as primeiras provas de sua inocuidade, que foram feitas no meu consultório pelo Dr. JOIR FONTE, primeiro em dez doentes e em seguida em dez dos seus comunicantes mais íntimos. A 13 de maio, remeti ao Dr. SALOMÃO SCHUJMAN, de Rosário (Argentina), para atender um seu pedido, 50 cc, dessa *Leprolina* e igual quantidade ao Dr. JOSÉ MARIANO. Do uso feito por aquele colega ainda não tive nenhuma notícia; este último empregou-a em 198 doentes da Colônia Santa Fé, de Três Corações. Os resultados dessa aplicação, concomitantemente com o da *Lepromina*, figuram num artigo do Dr. MARIANO aparecido na *Acta Medica*, vol. 11 (10-12) pág. 147, Out.-Dez. de 1943. Este colega consultou-me sobre o emprêgo desse produto por via intravenosa, como ensaio terapêutico em leprosos. Respondi-lhe que o fizesse primeiramente por via subcutânea.

No dia 6 de agosto terminei o preparo e distribuição de mais cinco partidas de *Leprolinas*: N.ºs 1 (cultura "José"), 1a (rétrocultura de cobaia), 3 (cultura "Teixeira"), 5 e 5a (duas novas partidas da cultura "Rudan") e a 16 do mesmo mês segui para Três Corações, onde, com a colaboração do Dr. MARIANO, apliquei êsses cinco antígenos, concomitantemente com a *Lepromina* (tipo HAYASHI), em 120 internados da Colonia Santa Fé. Durante dez dias acompanhei o Dr. MARIANO nas verificações dos resultados do emprego de tais produtos, não tendo observado nenhum sintoma alarmante. Os resultados das leituras finais dessas reações serão o assunto de um próximo artigo do Dr. JOSÉ MARIANO.

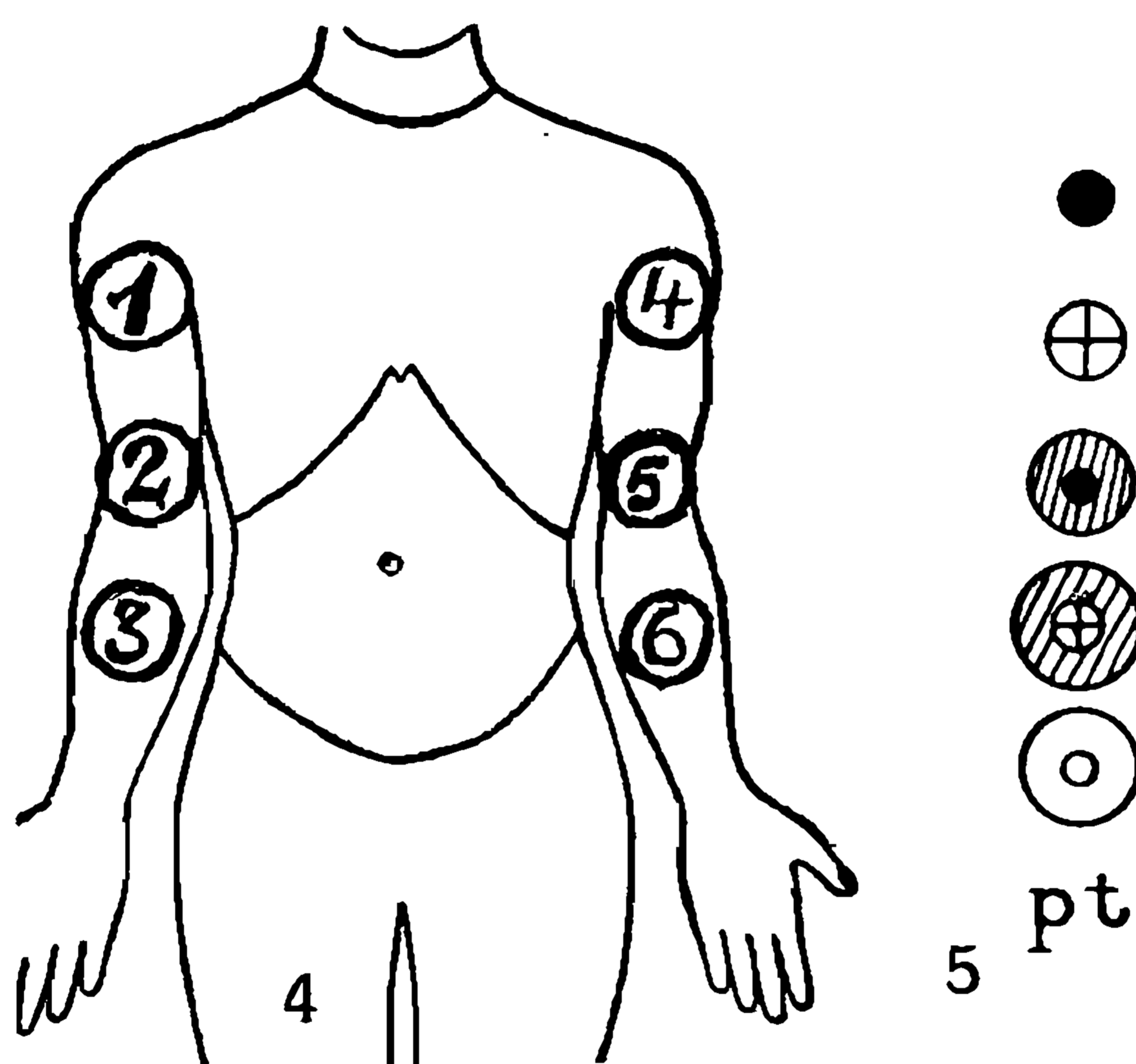


Fig. 4 — Indicação das sédes convenientes das intradermoreações com as *Leprolinas* (1 a 5) e com a *Lepromina* (6). Fig. 5 — Sinais convencionais para a anotação dos vários graus das reações positivas, até à perda de tecido.

Distribuição das Leprolinas a vários leprosários.

Verificados a inocuidade das *Leprolinas* e o seu efeito mais ou menos idêntico ao da *Lepromina*, em testes cutâneos, com uma circular e um gráfico explicativo sobre o seu emprêgo remeti, a 17 de setembro, a cada um dos leprosários abaixo relacionados 50 empôlas das *Leprolinas* 1, 1a, 3, 5 e 5a, correspondentes a 20 cc, de cada, ou seja o suficiente para as intradermo-reações em 200 doentes ou comunicantes :

- 1 — Leprosário Belisário Penna, Manãos, Amazonas.
- 2 — Leprosário Marituba, Belém, Pará.
- 3 — Lazarópolis do Prata, João Pessôa, Pará.
- 4 — Colônia do Bomfim, S. Luiz, Maranhão.

- 5 — Colônia Mirueira, Recife, Pernambuco.
- 6 — Colônia S. Francisco de Assís, Bambuy, Minas Gerais.
- 7 — Colônia Santa Isabel, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- 8 — Asilo-Colônia Santo Ângelo, Santo Ângelo, S. Paulo.
- 9 — Asilo-Colônia Pirapitinguy, Itú, S. Paulo.
- 10 — Asilo-Colônia Aymorés, Baurú, S. Paulo.
- 11 — Asilo-Colônia Cocáis, Casa Branca, S. Paulo.
- 12 — Sanatório Padre Bento, Gopoúva, S. Paulo.
- 13 — Leprosário São Roque, Piraquára, Paraná.
- 14 — Colônia Santa Tereza, Florianópolis, Santa Catarina.
- 15 — Colônia Itapuan, Pôrto Alegre, R. G. do Sul.

Remeti também 30 empôlas das *Leprolinas* 1, 3 e 5, sendo 10 de cada, ao Sr. PERRY BURGESS, Presidente da *Leonard Wood Memorial*, de New York, para fins de estudos. A 6 de outubro, remeti aos grandes leprosários da Colômbia *Água de Dios* e *Lazareto de Contratación* uma partida das cinco *Leprolinas*, num total de mais de 100 empôlas, para ensaios.

Incluindo as Colônias de Santa Fé e de Itanhenga êsses produtos estão sendo ensaiados em 17 leprosários nacionais e dois da Colômbia. Se os resultados finais dêsses ensaios forem favoráveis a um ou mais desses produtos, fabricarei grandes partidas estandardizadas dos mais eficazes para distribuição gratuita a todos os grandes centros de combate à lepra do mundo.

Posteriormente preparei o antígeno 2 (da cultura 2, amostra "Alcebiades"), de todos o mais cromogênico e cuja emulsão não me agradou, entretanto o estou ensaiando, por via intradérmica, nalguns doentes.

Ensaaios sorológicos e terapêuticos com as Leprolinas.

O Dr. THIERS PINTO aceitou a incumbência, gentilmente, de experimentar as minhas *Leprolinas* como antígenos em reações sôrológicas com sangue de leprosos e suspeitos, para o que lhe forneci a quantidade necessária. Entretanto, devido a sua ausência do Rio, em viagem de estudo para confecção de tese para concurso de Livre-Docência, talvez essa prova ainda demore, saivo se outros colegas que também disponham de laboratório de análises desejem prestar essa valiosa cooperação. O Prof. LUIS PRADO BARRIENTOS de La Paz, Bolivia, vai fazer também essa prova sorológica, além de outras.

Na Colônia Santa Fé injectei, por via subcutânea, em lesões leprosas de A. R., em dias alternados, de 2 a 4 cc da *Leprolina* n. 1, como tentativa terapêutica. Êsse produto deu origem a uma intensa reação local e geral, sem sintoma alarmante. Aquí no Rio estou empregando, pela mesma via,

nalguns doentes com lesões rebeldes, as Leprolinas N.^{os} 1 e 5, sempre com reação local e geral dignas de estudo, em maior escala, para o que ponho à disposição dos meus colegas quantidades suficientes do produto para experiência nesse sentido. O curioso é que, passada a reação, os doentes começam a ver resultados que lhes parecem espetaculares... De minha parte ainda não tenho firmada uma avaliação de tal proveito.

O Dr. JOSÉ MARIANO está empregando, por via intravenosa, nalguns leprosos, algumas dessas Leprolinas, com reação febril até 40° C e outros sintomas que lhe parecem muito importantes, os quais prometeu apreciar futuramente. Diz esse colega que os antígenos N.^{os} 1 e 5, usados sob a forma de infiltrações intradémicas, têm dado excelentes resultados em lesões do tipo tuberculoide.

SUMMARY

PREPARATION OF ANTIGENS (LEPROLINS SOUZA-ARAÚJO) FROM CULTURES OF ACIDFAST BACILLI ISOLATED FROM LEPERS.

Its use intracutaneous, comparatively with Lepromin, and subcutaneous or intravenously as therapeutics.

The A. prepared five antigens from his leprosy cultures which by analogy with ROST'S product he called Leprolins. The methods of its preparation and use are given. After a few tests to prove its innocuity for man the A. in cooperation with Dr. JOSÉ MARIANO, injected all five antigens intracutaneously in 120 patients. Now the products are being tested in 17 Leper Colonies of Brazil, in Argentina by Dr. SALOMON SCHUJMAN and in two leprosaria of Colombia. As antigen for skin tests the first results obtained are more or less identical with the results with Lepromin.

Its use in serology for leprosy diagnosis will be made by Dr. T. PINTO, of Rio, and Prof. LUIZ PRADO BARRIENTOS, of La Paz, Bolivia.

As curative means the Leprolins are being injected into resistant lesions of leprosy and also by intraven injections, whose results Dr. JOSÉ MARIANO will publish soon. The Leprolins Souza-Araujo are put at disposal of all leprologists interested in its use.

BIBLIOGRAFIA

1. SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE

1937. Intradermo-reacções em leprosos com antígenos de culturas de bacilos ácido-álcool resistentes.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 32 (4) : 469-497.

2. SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
1942. Cultura cromogênica dum bacilo ácido-álcool resistente isolado de pus de lesão fechada de lepra humana.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 37 (1) : 29-34.
3. SOUZA-ARAÚJO, H. C. de e MIRANDA, RUY NORONHA.
1942. Poderá o carrapato transmitir a lepra? 3.^a Nota.
Mais quatro amostras de culturas de bacilos ácido-álcool resistentes obtidas de carrapatos (duas de *Amblyomma cajennense* e duas de *Boophilus microplus*) infectados em leprosos do Paraná.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 37 (3) : 391-425.
Cruz, T. 37 (3) : 391-425.
4. SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
1943. Infecção espontânea e experimental de Hematófagos (Ixodídeos, Triatômídeos, Culicídeos, Hirudíneos, Pediculídeos e Cimicídeos) em leprosos.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 38 (3) : 447-484.
5. ROST, E. R.
1905. The Preparation of Leprolin.
British Medical Journal, February 11, pág. 294.