

Estudo da precipitação entre soros de portadores de Hanseníase.

Édimo Garcia de Lima, Maria Rosa Losano Borrás, Maria Aparecida Araújo.

RESUMO

Os autores estudaram a precipitação de soros de leprosos que reagiram entre si. Para a realização deste estudo empregaram o método de OUCHTERLONY. Examinaram 885 soros de pacientes nas três formas clínicas da doença. Entre os soros examinados somente 100 deles deram reações positivas de precipitação, sendo que o número deles que reagiu por mais de uma vez foi pequeno e dos que reagiram por um número menor de vezes foi maior. Quanto à reatividade dos soros, em relação às formas clínicas de lepra mostrou ser maior na forma L, depois, na T e a seguir na forma I. Não houve influência do tipo, nem do tempo de tratamento. Concluiu-se que os portadores de lepra nas três formas podem, em determinadas ocasiões, portar antígenos ou anticorpos na circulação sanguínea e que eles podem reagir entre si, dando faixas nítidas de precipitação quando postos a reagir.

INTRODUÇÃO

Atualmente muitos pesquisadores têm dirigido seus estudos à imunologia da hanseníase no sentido de esclarecer em pormenores as manifestações que causam esta enfermidade.

Estudos eletroforéticos com soros de leprosos, realizados por FIORILO & BECHELLI (1956), demonstraram um baixo teor de albumina nos soros examinados em relação aos de

pessoas normais, além de um aumento das imunoglobulinas. Apesar do elevado teor destas havia variação dos seus níveis entre os soros dos pacientes que estudaram.

Com o intuito de estudar a precipitação, OUCHTERLONY, em 1958, desenvolveu o método da dupla difusão em gel de agar, que permite a difusão de antígenos e de anticorpos, formando complexos que dão precipitação visível.

* Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

O *M. leprae* foi encontrado no leite de mulheres leprosas por PEDLEY, em 1967, o que indica a sua disseminação através do organismo do doente e também através do leite.

SHWE (1971) THOMAS *et alii* (1970) e COLOGLU (1979) descreveram lesões sobre gromérulos renais causadas por imunocomplexos em pacientes portadores de lepra. QUISMORIO *et alii* (1975) demonstraram a presença de imunoglobulina na pele de leprosos. MELSON *et alii* (1980), usando a técnica de radioimunoensaio, demonstraram a presença de anticorpos específicos contra o *M. leprae* (antígeno 7) em sangues de recém-nascidos de mães portadoras de hanseníase, conseqüentes à exposição da criança àquela bactéria ainda no útero materno. O teor de anticorpos permaneceu até por quatro meses, declinando a seguir. Acham os autores que mães bacilíferas podem estimular seus filhos ainda no útero a produzirem anticorpos específicos pela exposição ao *M. leprae*.

KAPLAN & CHASE (1980) conseguiram, em 52 pacientes leprosos, evidenciar a presença de anticorpos circulantes contra 9 antígenos de micobactérias, usando a técnica de precipitação em gel de OUCHTERLONY.

GILLIS *et alii* (1981) estudaram por meio do teste de imunodifusão, antígenos de 22 diferentes micobactérias frente a soros de leprosos, quando mostraram que através das provas sorológicas pode-se incriminar a bactéria infectante.

Os autores deste trabalho, levando em consideração os estudos de pesquisadores que se ocuparam em demonstrar os teores de anticorpos circulantes, antígenos e mesmo complexos imunes, propuseram estudar a possibili-

dade de se fazer reagir possíveis antígenos e anticorpos existentes em soros de portadores de hanseníase.

MATERIAL E MÉTODO

Foram usados neste trabalho 885 soros de pacientes portadores de hanseníase nas formas L, I e T, sendo que alguns deles apresentavam-se no estado reacional.

Os pacientes foram sangrados na veia do antebraço e os seus sangues deixados coagular à temperatura ambiente (22°C) e, em seguida, separados os soros por centrifugação. As amostras dos soros foram divididas em alíquotas de 1,0 ml e congeladas a -25°C e somente descongeladas no ato do seu uso. Nenhum preservativo foi incorporado aos soros.

Para executar os testes de precipitação foram preparadas placas de PETRI, novas e sem defeito proveniente do manuseio das mesmas. As placas foram lavadas de rotina, como se fossem ser empregadas em cultura de tecido, esterilizadas por aquecimento em forno de PASTEUR a 180°C, por duas horas. No preparo do gel de agar foi usado o agar-agar (Nobel), fundido, na concentração de 1,5%. Colocaram-se 20,0 ml em cada placa, deixando-se esfriar. A seguir foram feitos os cortes no agar e forrados os fundos dos poços ali praticados.

Foram colocadas 50 lambdas de soro em cada poço e as placas colocadas em recipientes fechados e úmidos, e incubados a 37°C. As leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 horas de incubação. As leituras das precipitações se referiam às faixas nítidas encontradas dentro daqueles períodos de observação.

As reações entre os soros foram baseadas nas combinações dos soros postos a reagir dois a dois.

RESULTADOS

Os soros examinados são de pacientes de ambos os sexos, com diferentes idades, indo de 9 a 86 anos. A-

presentaram a distribuição indicada na tabela 1.

Entre os soros examinados foram encontrados 26 de pacientes em estado reacional (2,9%), conforme mostra a tabela 2.

TABELA 1: Número e percentual da distribuição dos pacientes examinados

FORMAS	NÚMERO	PERCENTUAL
Lepromatosa	527	59,55
Indeterminada	194	21,92
Tuberculóide	164	18,53

TABELA 2: Número de casos de pacientes em estado reacional

FORMAS DE DOENÇA	Nº casos	Nº soros reagentes
Lepromatosa	21	03
Indeterminada	02	—
Tuberculóide	03	06
TOTAL	26	09

A idade média dos pacientes (tabela 2) era de 45 anos com 8 de tratamento; 25 eram do sexo masculino e somente um do sexo feminino.

Foram examinados também 54 casos de pacientes sem tratamento (casos virgens), sendo dois casos da forma T, 3 da forma I e o restante da forma L. A idade média destes pacientes va-

riou de 20 a 57 anos de idade, com a média de 38 anos.

No total dos pacientes que doaram sangue para este trabalho havia 551 homens e 334 mulheres, cuja idade média era de 51 anos para os homens e 53 anos para as mulheres. Quanto ao estado civil pode ser visto na tabela 3.

TABELA 3: Estado civil dos doadores

SEXO	ESTADO CIVIL				
	SOLTEIRO	CASADO	VIÚVO	DESQUITADO	TOTAL
Masculino	91	444	13	03	551
Feminino	58	217	25	34	334
TOTAL	149	661	38	37	885

TABELA 4: Distribuição dos resultados segundo a forma, número e percentual

FORMAS	NÚMERO	PERCENTUAL
Lepromatosa	56	6,33
Indeterminada	20	2,26
Tuberculóide	24	2,71

TABELA 5: Número de soros e de vezes em que reagiram entre si

Nº de vezes	Nº de soros	Nº de vezes	Nº soros
1	26	15	2
2	6	16	2
3	5	17	1
4	8	18	3
5	6	19	2
6	7	27	1
7	1	30	2
8	4	31	2
9	4	38	1
10	4	51	1
11	3	56	1
12	2	62	1
13	2	73	1
14	2	-	-

TABELA 6: Número de soros e de vezes em que reagiram entre si e o total

Nº vezes	Forma	Nº soros	Total	Nº vezes	Forma	Nº soros	Total
1	L	17		15	L	01	
	I	05			I	01	
	T	04	26		T	-	02
2	L	02		16	L	02	
	I	01			I	-	
	T	03	06		T	-	02
3	L	03		17	L	01	
	I	02			I	-	
	T	-	05		T	-	01
4	L	06		18	L	02	
	I	-			I	-	
	T	02	08		T	01	03
5	L	01		19	L	01	
	I	02			I	01	
	T	03	06		T	-	02
6	L	02		27	L	-	
	I	01			I	-	
	T	04	07		T	01	01
7	L	01		30	L	02	
	I	-			I	-	
	T	-	01		T	-	02
8	L	03		31	L	-	
	I	-			I	01	
	T	01	04		T	01	02
9	L	01		38	L	01	
	I	02			I	-	
	T	01	04		T	-	01
10	L	02		51	L	-	
	I	01			I	-	
	T	01	04		T	01	01
11	L	01		56	L	-	
	I	02			I	01	
	T	-	03		T	-	01
12	L	02		62	L	01	
	I	-			I	-	
	T	-	02		T	-	01
13	L	02		73	L	-	
	I	-			I	-	
	T	-	02		T	01	01
14	L	02					
	I	-					
	T	-	02				

Os pacientes tratados o foram por meio da sulfá; 11 deles receberam tratamento concomitante por talidomida e 5 deles receberam também antibiótico. O tempo de tratamento para os homens foi de 11 anos, em média; para as mulheres, de 13 anos e para ambos os sexos 12 anos, em média.

Reagiram entre si 100 soros, mostrando faixas de identidade nítidas. Os resultados se distribuíram de acordo com a tabela 4.

Entre os soros que deram precipitação positiva muitos foram os que reagiram um número menor de vezes; um número muito pequeno deles reagiu positivamente com maior número de soros de reação positiva, como demonstra a tabela 5.

A tabela 6 mostra o número de vezes em que os soros reagiram, a forma de lepra e o número deles.

DISCUSSÃO

A descoberta de OUCHTERLONY da precipitação em gel de agar de antígenos e seus respectivos anticorpos, permitiu colocar em evidência vários elementos do soro de pessoas normais e de portadores de enfermidades, e ainda abriu caminho para novas descobertas. Inúmeros estudos foram realizados neste sentido. Em 1956, FIORILLO & BECHELLI estudaram a composição do soro de leprosos, nos quais evidenciaram queda acentuada da albumina sérica e elevação das imunoglobulinas. Com os achados de precipitação dos autores presume-se que haja reação dessas imunoglobulinas, em nível mais alto no soro de leprosos, com antígeno circulante devido a disseminação bacilar do *M. leprae*.

prae. A disseminação bacilar foi demonstrada até no leite de mulheres leprosas (PEDLEY, 1967).

Outros pesquisadores demonstraram a deposição de complexos imunes sobre grânulos renais de leprosos (SHWE, 1971; THOMAS *et alii*, 1979 e ÇOLOGLU, 1979), demonstrando assim, que tanto antígenos quanto anticorpos podem estar na circulação, isolados ou em forma de complexos. Estes achados são corroborados pelos trabalhos de QUISMORIO *et alii* (1975), que encontraram imunoglobulinas séricas na pele de leprosos.

Os resultados deste trabalho vêm substanciar os de outros pesquisadores, mostrando que no doente podem ser encontrados tanto antígenos como anticorpos isolados sem terem formado complexos, dependendo talvez da fase clínica em que está o doente, seja da invasão bacteriana ou da maior concentração de anticorpos.

O pequeno número de soros com reações positivas provavelmente se deve à dificuldade de se encontrarem pacientes em fase de maior concentração de antígenos ou de anticorpos isolados no sangue periférico como demonstraram os resultados desta pesquisa.

CONCLUSÕES

Os autores estudam a precipitação de soros de leprosos que reagiram entre si. Para a realização deste estudo empregaram o método de OUCHTERLONY. Examinaram 885 soros de pacientes nas três formas clínicas da doença. Entre os soros examinados somente 100 deles deram reações positivas de precipitação, sendo que o número deles que reagiu por mais de uma vez foi pequeno e dos que reagiram por um número menor de vezes foi

maior. Quanto à reatividade dos soros, em relação às formas clínicas de lepra mostrou ser maior na forma I, depois, na T e a seguir na forma II. Não houve influência do tipo, nem do tempo de tratamento. Concluiu-se que os portadores de lepra nas três formas podem, em determinadas ocasiões, portar antígenos ou anticorpos na circulação sanguínea e que eles podem reagir entre si, dando faixas nítidas de precipitação quando postos a reagir.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Os autores agradecem a senhora Maria Aparecida Nonato Fernandes, técnica do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pela colaboração técnica prestada durante toda a realização deste trabalho.

Ainda agradecem ao Sr. Silvio Felisberti Filho e Srta. Maria de Lourdes Ançaloni, ambos enfermeiros do Posto de Saúde de Ribeirão Preto, SP, pela colheita dos sangues empregados neste trabalho.

SUMMARY

PRECIPITATION AMONG SERA OF PATIENTS WITH HANSEN'S DISEASE

In this work, an interesting phenomenon is presented which consists of precipitation, by reacting leprosy sera among themselves.

The patients belonged to three clinical forms of the disease, that is, lepromatous, tuberculoid and undetermined.

The method used was that of Ouchterlony and 885 sera were tested. 100 sera gave positive precipitation, showing a characteristic band.

The number of positive reactions was higher in the lepromatous group, followed by tuberculoid and then by the undetermined form.

Neither the method nor the length of treatment had any significant influence.

It is concluded that some patients with leprosy may have, for some time, circulating antigens reacting with specific antibodies, showing characteristic precipitation bands, with the Ouchterlony method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÇOLOGLU, A. S. — Immune complex glomerulonephritis in leprosy. *Leprosy Rev.*, 50: 213-222, 1979.
2. FIORILLO, A. M. & BECHELLI, L. M. — Lepromino-reação e alterações eletroforéticas em indivíduos não doentes de lepra e portadores de afecções sistêmicas. *Rev. Bras. Lep.*, 24 (4): 189-196, 1956.
3. GILLIS, T. P.; ABE, M.; BULLOCK, W. E.; ESPINOSA, O. R.; ORTIGOZA, E. G.; DRAPER, P.; KIRCHHEIMER, W. & BUCHANAN, T. M. — Comparison of 22 species of mycobacteria by immunodiffusion against an absorbed reference leprosy serum. *Int. J. Lepr.*, 49 (3): 287-293, 1981.
4. KAPLAN, M. H. & CHASE, M. W. — Antibodies to mycobacteria in human tuberculosis. II. Response to nine defined mycobacterial antigens with evidence for an antibody common to tuberculosis and lepromatous leprosy. *J. Infect. Dis.*, 142 (6): 835-843, 1980.
5. MELSON, R.; DUNCAN, M. E.; HARBOE, M. & BJUNE, A. — Antibodies against *M. leprae* antigen 7 from birth to 18 months of age: an indicator of intra-uterine infection in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 42: 107-113, 1980.
6. OUCHTERLONY, O. — Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. in Allergy*, 5 (1 e 6): 30, 1958.
7. PEDLEY, J. C. — The presence of *M. leprae* in human milk. *Leprosy Rev.*, 38: 239, 1967.
8. QUISMORIO, F. P.; REA, T. H.; LEVAN, N. E. & FRIOU, G. T. — Immunoglobulin

- deposits in lepromatous leprosy skin. *Arch. Derm.*, 111: 331, 1975.
9. SHWE, T. – Immune complexes in glomeruli of patients with leprosy. *Leprosy Rev.*, 52: 282, 1971.
10. THOMAS, G.; KARAT, A. B.; RAO, P. S. S. & PRATHAPKUMAR, C. – Changes in renal function during reative phases of lepromatous leprosy. *Int. J. Lepr.*, 38: 170, 1971.