

Isolamento e estudo experimental de duas novas culturas de bacilos ácido-alcool resistentes de muco nasal de leprosos*

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

(Com 1 estampa colorida e outra em negro)

Relativamente poucas tentativas têm sido feitas para isolar e cultivar o bacilo de HANSEN do muco nasal de Leprosos. Na vasta bibliografia sumariada por WOLBACH e HONEJ (1914), encontram-se apenas referências às culturas de microrganismos ácido-resistentes facultativos, obtidas dessa classe de material por CZAPLEWSKI (1898), F. W. TWORT (1910) e E. MARCHOUX (1911), tôdas de duração efêmera.

Merece especial menção a tentativa posterior de ERNEST LINDWOOD WALKER (1929), feita em larga escala na Califórnia, sem resultado satisfatório. No Instituto Oswaldo Cruz fiz, de 1928 a 1950, reiteradas tentativas nêsse sentido, também sem sucesso. Sòmente em 1951 obtive uma cultura não-cromogênica e patogênica de bacilo ácido-álcool resistente do muco nasal de uma jovem leprosa carioca, de 20 anos de idade, caso L3, virgem de tratamento antileprótico. Descreví essa cultura numa comunicação lida a 14 de Dezembro de 1951, em Buenos Aires, perante a III Conferência Panamericana de Leprologia (1, 2). De 1952 para 1953 tive a boa sorte de obter duas novas culturas dêsse material, que passo a descrever.

Primeira enferma: — Layse S., rapariga branca, de 16 anos, nascida no Estado do Pará, onde parece ter-se infectado, e vivendo no Rio de Janeiro desde os 4 anos de idade. Ao meu 1.^o exame, em 17 de Setembro de 1952, era um caso L3. Apresentava a face infiltrada e cianótica, lesões difusas sôbre todo o tegumento, alguns lepromas esparsos nos membros inferiores e pés edemaciados e cianóticos, com vários lepromas chatos. Esfregaços do seu muco nasal, de suco cutâneo dos lóbulos auriculares e infiltrações, e da linfa subcutânea das pernas e dos pés revelaram

* Apresentado no VI Congresso Internacional de Leprologia, Madrid, 3-10 de Outubro de 1953.

abundantes bacilos de HANSEN. Não tendo ela sido submetida a qualquer tratamento antileprótico, aproveitei-a para várias pesquisas bacteriológicas.

Bacteriologia: — De 18-9-52 a 9-4-53 fiz dez séries de sementeiras, em meios próprios para a germinação de bacilos ácido-álcool resistentes, dos seguintes materiais desta paciente: Muco nasal três vezes; exsudato de lepromas três vezes, e linfa cutânea, colhida pelo método de LLERAS nas infiltrações, quatro vezes. Todos esses materiais, que eram muito bacilíferos, foram previamente tratados pelo método de PETROFF. Das dez tentativas somente uma foi bem sucedida. O muco nasal colhido com curêta, dos dois lados do septo, a 16 de Dezembro, e triturado com água destilada, foi examinado pelo método de ZIEHL-NEELEN, mostrando-se rico em bacilos da lepra. Parte da suspensão bacilar foi entregue ao Dr. HANS MUTH para microscopia eletrônica e o resto tratado pelo método de PETROFF, lavado três vezes por centrifugação e o seu sedimento semeado em três tubos do meio de LOEWENSTEIN e um de caldo glicerinado, este sobretudo para verificar si o material estava puro ou contaminado.

Após duas semanas de incubação a 37°C (29 de Dezembro), os três tubos de LOEWENSTEIN apresentavam inúmeras colônias amarelas, punctiformes ou do tamanho de pequenas cabeças de alfinetes. Esfregaços de algumas dessas colônias, de um dos três tubos, foram corados pelo Ziehl-Neelsen e pelo Gram, revelando exclusivamente bacilos ácido-álcool resistentes e gram-positivos, na sua maioria pleomórficos, como é a regra nas primeiras gerações de culturas de micobactérias. Outro esfregaço corado pelo método de FONTES mostrou as formas clássicas das micobactérias patogênicas: bacilos rosados com grânulos rôxo-azulados, sendo um grande nódulo no centro do bacilo, ou dois nas suas extremidades afetando a forma em haltère, ou três ou mais grânulos menores, dispostos em rosário, formando os cocótrices descritos em 1886 por ADOLFO LUTZ no bacilo da lepra.

A cultura foi repicada nos meios de LOEWENSTEIN e DUBOS e nos glicerinados (batata, agar e caldo). Após alguns dias de incubação a 37°C os tubos de LOEWENSTEIN apresentavam germinação franca, sob a forma de colônias redondas, amarelas, que, com o correr do tempo confluíram, formando uma delgada camada uniforme, cobrindo 3/4 da superfície do meio. Neste estado tendia para o tipo S, enquanto que a cultura obtida em 1951, amostra "Dalva", é do tipo R. Nos meios líquidos — Dubos, caldo glicerinado e água glicerinada da batata — o bacilo germinou lentamente, produzindo véus e depósitos, sem turvar os líquidos, prova de pureza.

Patogenia: — A 19 de Fevereiro de 1953 inoculei com suspensão dessa cultura em sôro fisiológico, por via subcutânea, três ratos e três camundongos brancos. No 35.º dia da inoculação (25/3) foi sacrificado um camundongo, que apresentava um tumor relativamente grande, na virilha, cuja baciloscopia foi fortemente positiva. Triturado e emulsionado esse tumorzinho, parte da emulsão foi inoculada em 3 camondon-

gos, 2 brancos e 1 preto e o resto tratado pela soda e semeado. O exame histopatológico desse animal, feito pela Dra. RITA CARDOSO (P. C. 18.444, de 11-6-53) revelou:

“Fragmento de pele e órgãos dum camondongo branco inoculado a 19-2-53 com cultura “Layse” e sacrificado em 25-3-53: *Pele*: No derma, infiltração inflamatória, predominando células mononucleares volumosas, com citoplasma abundante. Em foco circunscrito, vê-se aglomerado de leucócitos polimorfonucleares. Não foram encontrados bacilos a.a.r. (Entretanto o esfregaço do tumor foi fortemente positivo para tais bacilos). *Fígado, Pulmão e Rim*: Hiperemia. No pulmão atelectasia. *Baço, Pancreas e coração*: Sem alterações importantes.” Os esfregaços do baço, fígado, pulmões e rins foram positivos à baciloscopia.

A 11 de abril, sábado, morreu um rato que se perdeu por displicência do servente de laboratório. No 55.^o dia da inoculação (15/4) sacrifiquei os outros dois ratos, ambos apresentando pequenos tumores inguinais que, dada a sua riqueza bacilar, serviram para bacteriologia. O exame histopatológico de um deles, feito pela Dra. RITA CARDOSO (P. C. 18.462, de 11-6-53), deu o seguinte resultado:

“Rato branco inoculado a 19/2 com cultura amostra “Layse” de muco nasal e sacrificado a 14/4. O material consta de fragmento de pele, e de gânglio linfático subcutâneo. No derma e no tecido adiposo subcutâneo vê-se uma intensa infiltração inflamatória por células predominantemente mononucleares, envolvendo uma grande cavidade que encerra tecido necrosado. Nas paredes dessa cavidade, nota-se proliferação de fibrócitos. Grande número das células mononucleares encerra bacilos ácido-álcool resistentes, curtos, granulados e vacuolados.”

Faltou o resultado do exame do gânglio linfático.

As sementeiras das emulsões dos tumores do camondongo e dos ratos, em meio de LOEWENSTEIN, produziram retroculturas idênticas às originais.

Tentada a passagem da infecção do camondongo sacrificado a 25/3 em três outros, dois destes morreram em 12 e 23/6, não apresentando tumores nem bacilos nas vísceras. O camondongo preto, sacrificado a 27/6, também não tinha tumor mas apresentava bacilos a.a.r. no pulmão e nos rins.

Segunda cultura: — No dia 9 de Abril colhi de novo, por curetagem do septo, muco nasal da paciente Layse, o qual após trituração em soluto de soda a 10%, centrifugado com água destilada esterilizada três vezes para lavagem, foi o seu sedimento semeado em três tubos de Loewenstein e noutros meios. Após duas semanas de incubação a 37°C apareceu, nos três tubos de LOEWENSTEIN, uma delgada camada amarelada de pequenas colônias granuladas, como fina areia, semelhantes às da primeira amostra. Esfregaços de algumas dessas colônias, corados pelos métodos de ZIEHL-NEELSEN e FONTES, confirmaram se tratar de cultura de bacilos a.a.r. e gram-positivos.

Este fato é muito importante porque prova que tais bacilos não provieram duma contaminação do meio de cultura nem do meio am-

biente. Ambas as amostras foram obtidas do mesmo tipo de material — o muco nasal —, da mesma paciente, no intervalo de quatro meses, antes d'ela apresentar melhoras com o tratamento sulfônico. Esta segunda amostra também foi inoculada em murídeos, que estão em observação. Essas duas culturas entraram para a Coleção de Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, a cargo do Dr. LAERTE DE ANDRADE, com a designação de Amostra "Layse I e II" (Souza-Araujo, 1953).

Segunda enferma: — Uma moça branca (Maria N.), de 19 anos de idade, natural de Portugal, donde veio com 4 anos e desde então vive em Cascadura (D.F.), na companhia dos pais e dois irmãos menores, todos sadios. Tudo indica que ela se infectou no Rio de Janeiro. Examinei-a pela 1.^a vez a 29-1-1951, quando apresentava moderada infiltração na face, orelhas lepromatosas, tronco coberto de maculas escuras, joelhos com placas lepromatosas e extensas úlceras lazarinas, de 2 anos de duração, nas pernas, e pés edemaciados e cianóticos. Classifiquei-a como lepromatosa (L3), que a histopatologia confirmou (P. C. 17.291, do I. O. Cruz). Os esfregaços do muco nasal, dos gânglios inguinais, de suco cutâneo e linfa sub-cutânea, revelaram abundantes bacilos de HANSEN. Instituí-lhe o tratamento sulfônico: Promin por via intravenosa e Diasone *per os*. A sua tolerância não foi muito satisfatória.

Bacteriologia: — De 6 de Abril de 1951 a 26 de Fevereiro de 1953 fiz com materiais colhidos nesta enferma reiteradas sementeiras com o fito de isolar o bacilo de HANSEN, inclusive leucócitos do seu sangue tratado pelo método de Crow e de sangue obtido por picada de *Triatoma infestans*, sempre com resultados negativos.

Finalmente, a 26 de Fevereiro de 1953, após uma reação leprótica da paciente, controlada com o Cortone Merck, colhi o seu muco nasal bilateral do septo, o qual, depois de verificada a sua riqueza bacilar tratei pelo método de PETROFF e semeei em vários tubos de meio de LOEWENSTEIN. Após 25 dias de incubação a 37°C apenas num desses tubos apareceu uma colônia circular, elevada, esbranquiçada, que se tornou crême no fim de três meses. A 30 de Março quando o tubo foi retirado da estufa para ser conservado à temperatura ambiente, estando o meio sêco, adicionei-lhe algumas gotas de água de condensação de meio fresco. Deixando o tubo deitado, êste líquido foi banhando a colônia e espalhando o bacilo, que germinou formando delgada camada esbranquiçada cobrindo tôda a superfície do meio. No 57.^o dia da sementeira (25/4) fiz os primeiros esfregaços da camada delgada e paracentra da cultura, não tocando na colônia original. Tais esfregaços corados pelos métodos de ZIEHL-NEELSEN, GRAM e FONTES mostraram exclusivamente bacilos a.a.r. e gram-positivos. Feitas as primeiras repicagens estas germinaram lentamente. Novas repicagens de 30 de Abril germinaram mais rapidamente, produzindo no Loewenstein uma delgada camada crême, intermeada de colônias granuladas. A 29 de Maio, com emulsão do repique de 2.^a geração inoculei quatro camondongos brancos e pretos que estão em observação. A 3.^a geração, em Loewenstein, germinou mais depressa, cobrindo a superfície do meio com uma delgada

camada granulosa sôbre outra mucoide, esbranquiçada. Esta amostra ainda não formou véu no meio de DUBOS e no caldo glicerinado. Parece não se tratar de uma bactéria banal.

Biologia: — As culturas “Layse I e II”, sua retrocultura de rato e a amostra “Maria N.” deram resultados positivos (++) à fluoroscopia. A amostra “Maria N.” revelou intensa fluorescência tanto para os bacilos como para os grânulos livres. Submetidas à reação cito-química de DUBOS para virulência (Dr. LAERTE DE ANDRADE) deram resultado positivo (+) dentro de 30 minutos e negativo no fim de 24 horas, na 2.^a leitura.

Com os Drs. HANS MUTH e LUIZ PAULO DE OLIVEIRA, assistente do Prof. J. C. CARDOSO, chefe da Secção de Bio-Física do I. O. C., usando o microscópio Zeiss 20 com o equipamento completo para a microscopia de contraste de fases, examinamos emulsões frescas dessas culturas a 400x e 1000x. Com o aumento de 400x a morfologia é mais nítida. Predominam os grânulos livres ou em diplococos, com halos e intenso movimento rotatório, mais acentuado e diferente do browniano. Quanto à forma bacilar, predominam os elementos com 2 e 3 grânulos, se deslocando em rotação ora para a direita ora para a esquerda, ou em cambalhotas, ou por deslocamento dos grânulos no seu interior. Estas verificações estão sendo continuadas comparativamente com o exame de linfa subcutânea de lesões lepromatosas.

Conclusões: — 1) Dada a grande dificuldade em se obter culturas puras de bacilos ácido-álcool resistentes permanentes de material leproso, sobretudo de muco nasal, estas amostras ora descritas merecem especial estudo.

2) A minha experiência mostra que as culturas de bacilos a.a.r. que germinam lentamente, são mais patogênicas e portanto mais próprias para estudos experimentais.

3) Insisto na necessidade de um estudo da bacteriologia da lepra em muito maior escala da que eu posso realizar no Instituto Oswaldo Cruz.

4) Os médicos que trabalham nos leprocômios, dispendo de grande número de doentes lepromatosos, estão em condições de dar um grande impulso a êste ramo da leprologia, erradamente relegado a um segundo plano.

Manguinhos, 14-7-53.

H. C. DE SOUZA-ARAUJO

REFERÊNCIAS

1. SOUZA-ARAUJO, H. C. DE,
A nonchromogenic culture of an acid-fast bacillus isolated from the nasal mucus of a leprosy patient; its virulence for laboratory animals. *International Journal of Leprosy*, Vol. 20, N.º 3, 1952, pp. 355/60.
2. SOUZA-ARAUJO, H. C. DE,
Cultura não cromogênica de um bacilo ácido-álcool resistente isolado do muco nasal de uma leprosa. Sua virulência para animais de laboratório. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, T. 50, 1952, pp. 679/88. 1 estampa.

SUMMARY

The A. described on December 14, 1951, his first culture of acid-fast bacillus isolated from nasal mucus of a leprous girl.

In this paper the A. describes two new strains of acid-fast bacilli gotten also from nasal mucus of other two leprous girls, L3 cases. The first patient (Layse S) had her mucus treated by Petroff's method on December 16, 1952 and sown onto three tubes of Loewenstein medium and in glycerin broth. After two weeks incubation at 37°C all three tubes of Loewenstein showed many punctiforme and pin-head yellowish colonies, whose microscopic examination proved to be of a pure acid-fast bacillus culture. This sample inoculated in rats and mice produced, after 55 days incubation, small tumors from which the culture was easily recovered. On April 9, 1953 a new sample of nasal mucus of the same patient was sown in three tubes of Loewenstein. After two weeks incubation at 37°C all 3 tubes showed germination of small yellowish colonies of acid-fast bacilli. Within four months being gotten two samples of identical cultures in all smeared tubes of Loewenstein medium sown, proved that such cultures were not an ordinary ambient contamination.

Second patient: — Maria N. After various sowing of different kinds of material from her, February 26, 1953 her nasal mucus treated by soda and sown onto Loewenstein medium, after 25 days incubation showed in only one tube, one small round colony, at first white, becoming creamy after three months. Transplants in various media grew at first slowly and after 2 or 3 generations grew faster. The "Layse" strain produced pellicle in glycerin broth and Dubos medium; the "Maria N." strain did not produce as yet.

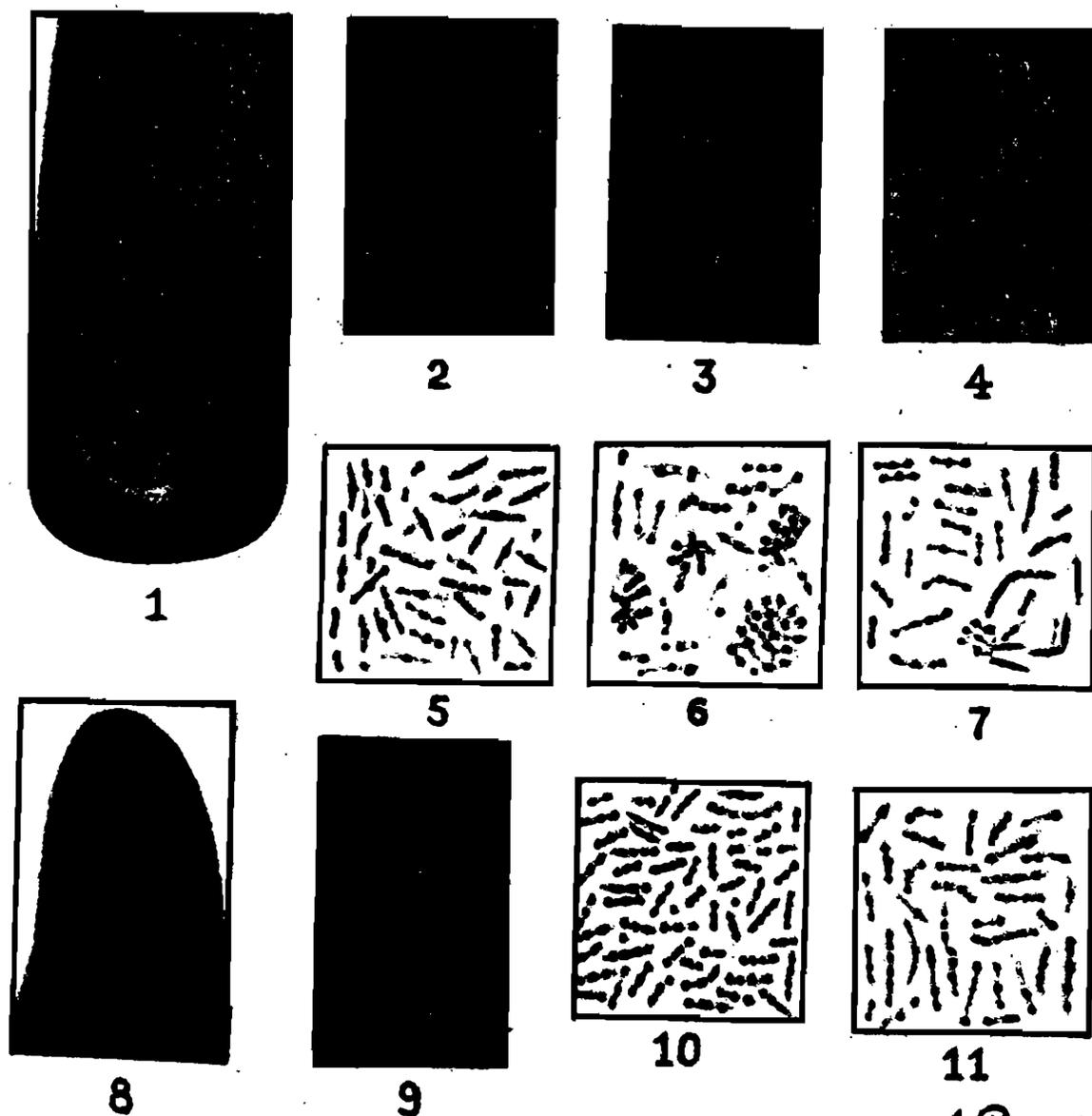
Both strains (Layse I and II, and Maria N.) gave weak positive Dubos test in half-an-hour and negative after 24 hours reading. Both were strongly positive when stained by Gram, Ziehl-Neelsen and Fontes methods. Both strains gave also positive fluoroscopy.

These cultures are being studied.

The A. concludes that, according to his experience, the slower growing cultures of acid-fast bacilli isolated from leprosy material, are the more suitable for experimental work.

Acknowledgement. The A. thanks to Miss MARIA DE LOURDES SANTANA for her valuable collaboration in the studies of the described cultures.

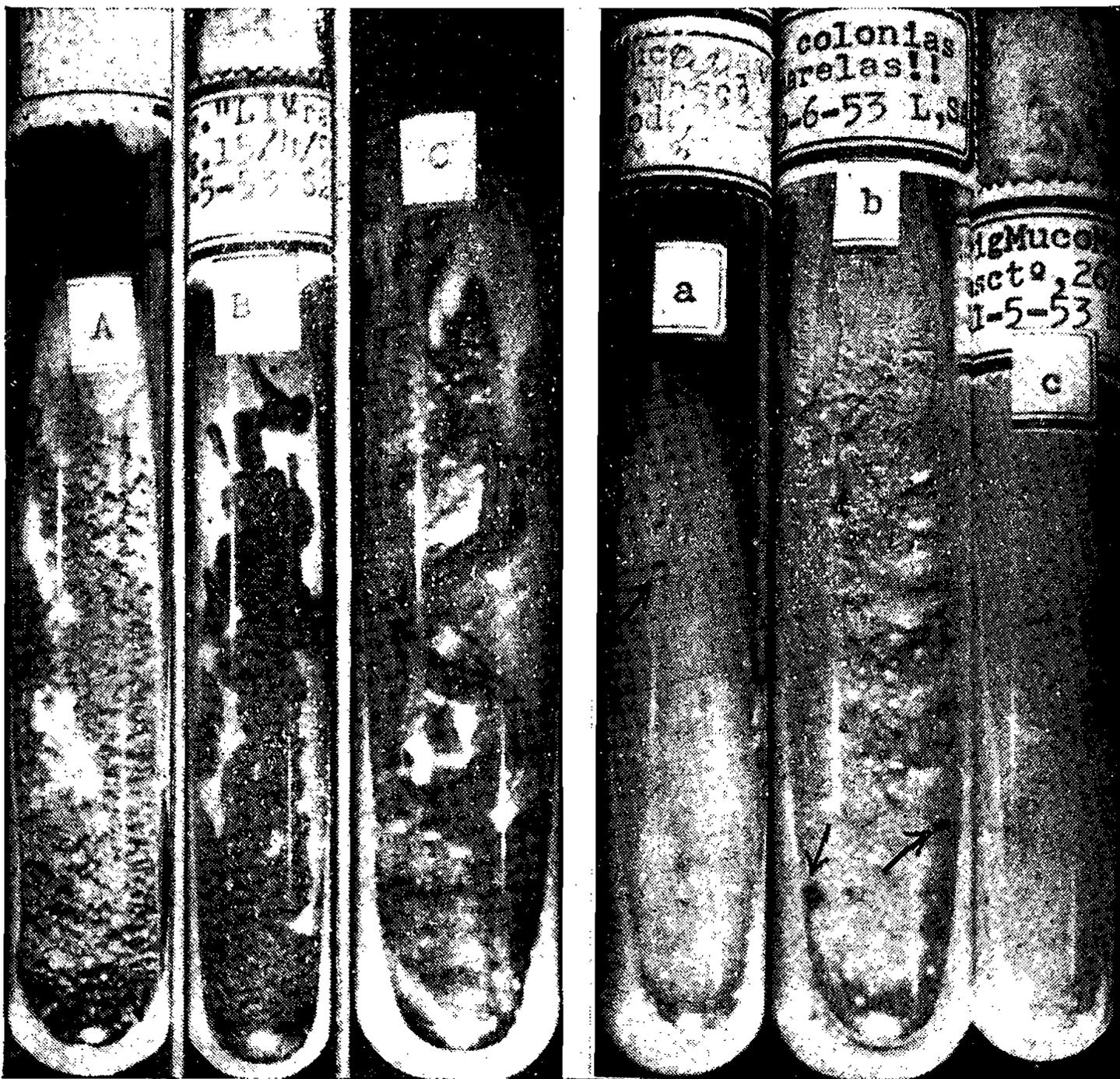
Isolamento e estudo experimental de duas novas culturas
de bacilos ácido-álcool resistentes de muco nasal de
leprosos pelo Dr. H. C. de Souza-Araujo (Brasil).



A. Pugas

- 1 — Cultura "Layse I", 2.^a geração, Loewenstein, 6-1-53.
- 2 — Cultura "Layse I" repique do véu em Dubos: 26-2-53.
- 3 — Cultura "Layse II". Original. Loewenstein, 9-4-53.
- 4 — Retrocultura de "Layse I" de pus in natura de rato inoculado em 19-2-53; sacrificado a 15-4-. Original, Loewenstein, 19-4-53.
- 5 — Esfregaço corado pelo Ziehl-Neelsen, da cultura de 6-1-53, da figura 1.
- 6 — Esfregaço de linfa subcutânea da perna de Layse, colhida a 2-3-53 e corada pelo método de Fontes.
- 7 — Esfregaço de tumor de Camondongo branco inoculado com a cultura "Layse I" em 19-2 e sacrificado a 25-3-53. Ziehl-Neelsen.
- 8 — Cultura original do muco de "Maria N.", Loewenstein, 26-2-53.
- 9 — Cultura "Maria N." 2.^a geração. Loewenstein, 15-5-53.
- 10 — Esfregaço da cultura "Maria N." de 60 dias, corado pelo Ziehl.
- 11 — Esfregaço da cultura "Maria N." da 2.^a geração. Loewenstein, 30-4-53. Corado pelo Fontes. Desenhos de A. Pugas, 20-6-53.

Isolamento e estudo experimental de duas novas culturas
de bacilos ácido-álcool resistentes de muco nasal de
de leprosos pelo Dr. H. C. de Souza-Araujo



Fotos A, B e C. — Cultura amostra "Layse I": Tubo A) Cultura amarela e granulosa, transplante de véu do meio de Dubos de 27-12-52. Loewenstein, 26-2-53. Fotos 7-7-53.

Tubo B) Retrocultura de tumor de rato branco, inoculado a 19-2 e sacrificado a 15-4-53. Cultura amarela, granulosa, semelhante à inoculada. Loewenstein, 21-5-53. Fotos 7-7-53.

Tubo C) Cultura amostra "Layse II", obtida também do seu muco nasal, semeado a 9-4-53. 2.^a geração. Loewenstein, 22-5-53. Macro e microscópicamente semelhante à amostra "Layse I". Fotos 7-7-53.

Fotos a, b e c. — Cultura amostra "Maria N." isolada do muco nasal.

Tubo a) Cultura original de 26-2-53. Loewenstein. Uma única colônia redonda, esbranquiçada (assinalada pela flecha), da qual o bacilo se espraiou em delgada camada lisa.

Tubo b) 2.^a geração em Loewenstein, de 30-4-53. Cultura exuberante, formando camada rugosa, esbranquiçada, muito aderente ao meio, na qual surgiram 30 dias após 2 colônias amarelas: associação ou mutação?

Tubo c) 2.^a geração em Loewenstein, de 11-5-53. Germinação em delgada camada ligeiramente rugosa, de cor crème. Fotos 7-7-53.