

# Cultura cromogênica de um bacilo ácido-álcool resistente, isolado de mosquito (*Culicíno*) capturado sôbre leproso, em plena natureza, com rétrocultura obtida de rato branco (\*)

por

Celso S. C. Rossell

Estudante de medicina -- Universidade Mayor de San Andrés. La Paz, Bolívia

## Introdução

Depois de sete meses de estudos, na qualidade de estagiário no Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz, sob a direcção do professor Dr. H. C. SOUZA-ARAÚJO, fui por êle levado (em companhia do Dr. KELLERSBERGER) à Colônia de Santa Fé (Minas Gerais), a fim de prosseguir experiências anteriormente iniciadas por êle na mesma região, com o intento de cultivar o bacilo da lepra, isolado dos mosquitos infectados com sangue de leprosos. Os resultados dessas experiências tinham sido negativas; sómente se verificou que tais insetos absorvem globias e bacilos isolados ácido-álcool resistentes (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Ano 1943, volume 39, Fascículo 2, págs. 167-176), o que é confirmado, atualmente, com os resultados do presente trabalho. Êste fato condena os mosquitos como "*possíveis transmissores*" da lepra, hipótese firmemente defendida, durante 25 anos, pelo imortal ADOLPHO LUTZ (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Ano 1939, Volume 34, Fascículo 4, págs. 475-493).

Meu modesto estudo não é mais que o resultado de uma prática de insistência, prosseguindo os trabalhos iniciados por SOUZA-ARAÚJO.

Os gastos de viagem à Colônia Santa Fé, foram satisfeitos pelo Instituto Oswaldo Cruz, graças ao amplo espírito de seu Director Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO, que acolhe e assiste aos estudantes estrangeiros

---

(\*) Estudo apresentado em 13 de Setembro de 1946, ao I Congresso Inter-Americano de Medicina. Secção das Grandes Endemias, realizado no Rio de Janeiro.

\* Recebido para publicação em Setembro de 1946.

com especiais considerações e estímulo, incrementando, dêsse modo, na casa de OSWALDO CRUZ, um proveitoso intercâmbio cultural e aproximando nossos povos sob a nobre comunhão da ciência. Devo essas expressões na qualidade de estudante boliviano.

Ao Dr. ALMEIDA NETO e aos seus auxiliares da Colônia Santa Fé, apresento meus agradecimentos pelas facilidades que me proporcionaram, ali, para praticar meus estudos.

### PROTOCOLO DAS EXPERIÊNCIAS

Colônia Santa Fé (Minas Gerais), 14-4-46. Auxiliado por dois enfermeiros doentes encaminhei-me para as proximidades do rio do Peixe, a fim de capturar, em ambiente livre, mosquitos que houvessem sugado sangue dos enfermos lepromatosos: P. Rodrigues, J. Santos e J. Moura. Seguindo a margem do rio procuramos escolher um lugar próprio para a captura e encontramos em um pequeno bosque, por onde o rio segue seu curso. Às 18 horas, quando se inicia o crepúsculo, começaram a aparecer raros mosquitos, que picavam os enfermos indiferentemente sobre lepromas, infiltrações ou pele de aparência sã. Ao cabo de poucos minutos se enchiam de sangue e eram presos em tubos de ensaio comuns e esterilizados; um tubo para cada enfermo. A captura foi escassa, de dez mosquitos somente, os quais permaneceram no Leprocômio até o dia seguinte, à temperatura do Laboratório, a fim de que fôssem classificados e se prosseguisse, depois, uma série de trabalhos com o intento de cultivar o bacilo de HANSEN, provavelmente existente no conteúdo intestinal dos mosquitos.

Abril 15 — Depois de 14 horas em repouso os mosquitos continuaram vivos e consegui matá-los introduzindo nos tubos fumo de tabaco. A ausência de um entomologista impediu a classificação dos mosquitos. Realizei o trabalho limitando-me a separar Gêneros de mosquitos fêmeas, *Anofelinos* e *Culicinos*. De cada um dos mosquitos foi feita uma sementeira em meio inclinado de Loewenstein. Cortando previamente as asas, patas e cabeça, introduzi no abdome a ponta de uma pipeta estirada microcapilar, que continha escassa quantidade de caldo glicerinado. Dissolvi, por introdução e absorção, o conteúdo abdominal, que dava material suficiente para efetuar uma sementeira em tubo, evitando, dentro do possível, as contaminações. Concluída a sementeira marquei cada um dos tubos com o nome do enfermo, Gênero do mosquito e data, e os coloquei na estufa a 37°C. Com o material restante efetuei esfregaços em lâminas, que posteriormente examinei no Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz, com especial cuidado.

Na manhã de 15/4, às 10 horas, utilizando os mesmos enfermos, fiz novas capturas, nas proximidades do Cemitério da Colônia. Nesta ocasião a coleta foi mais pobre, pois apareceram apenas três *Psorophora* sp., que agrediram com facilidade os enfermos. Duas horas depois fiz as sementeiras em três tubos com Loewenstein, técnica micro capilar.

Abril 16 — Às nove horas, capturei 13 *Culicíno*s e oito *Anofelíno*s sôbre os enfermos lepromatosos A. Beltrami e P. Rodrigues. Separando ambos os Gêneros em quatro lotes e cortando prèviamente as asas, patas e cabeça, foram os mosquitos tratados com sôda cáustica a 10%, durante trinta minutos (método de PETROFF), e lavados repetidas vêzes com água destilada esterilizada. A seguir foram triturados em um microtritador de vidro com algumas gôtas de caldo glicerinado. Finalmente foram realizadas sementeiras dos triturados de *Culicíno*s em 13 tubos com Loewenstein e de *Anofelíno*s em oito.

Abril 18 — Sementeiras em 45 tubos com Loewenstein, técnica microcapilar, de 40 *Culicíno*s e cinco *Anofelíno*s, capturados no dia anterior sôbre os enfermos P. Rodrigues e Otavio L. de Souza. Vinte horas se passaram entre a captura dos mosquitos e a sementeira.

Abril 19 — Das 18 horas e meia em diante capturei 28 *Culicíno*s e seis *Anofelíno*s sôbre os enfermos A. Beltrami, P. Rodrigues e Otávio L. de Souza. Onze horas depois efetuamos as sementeiras, método microcapilar.

A época foi imprópria para a coleta de mosquitos, pois as contínuas chuvas e a baixa temperatura dificultaram, em parte, nossos estudos. Os enfermos voluntários, que tão amavelmente se ofereceram para essas experiências, eram lepromatosos L3, apiréticos e sem úlceras. Em 10 dias de trabalho obtivemos 113 sementeiras e 65 esfregaços. Concluída nossa tarefa regressamos ao Instituto Oswaldo Cruz no dia 22 Abril e colocamos o material na estufa a 37°C.

No dia 30-4 iniciei no Laboratório de Leprologia as observações microscópicas de 65 esfregaços (coloração de Ziehl-Neelsen). Na lâmina número 2, *Culicíno*, foram encontrados bacilos ácido-álcool resistentes, isolados e em grupos. Na lâmina n.º 5, *Culicíno*, encontrei duas globias de bacilos ácido-álcool resistentes, junto de uma escama e cerdas de mosquito. Ambas as preparações foram observadas pelo professor SOUZA-ARAÚJO e pelos Drs. RUBENS BRITO, Director de Saúde Pública no Território Federal de Guaporé.

e CHARLES R. HATHAWAY, Entomólogo assistente do Curso de Aplicação do Instituto Oswaldo Cruz.

Em 23 dias foram examinados 65 esfregaços com um total de 11 positivos (16,9%).

#### *Descrição da cultura*

Maio 9 — Segunda revisão das sementeiras que permaneciam na estufa a 37°C. No lote de tubos Pedro Rodrigues, semeados no dia 18-4, 20 horas depois de capturados os mosquitos e incubados 21 dias, encontrei um tubo germinado (correspondente a mosquito *Culicino*), com oito colônias cromogênicas, de bordas circulares, onduladas, lisas e úmidas, medindo de 1 a 4mm de diâmetro. Observaram a cultura os Drs. G. M. DE OLIVEIRA CASTRO e ESTÁCIO MONTEIRO, os quais me aconselharam o repique imediato. O professor SOUZA-ARAÚJO estava ausente, mas dois dias após chegou a observar três colônias que ficaram intactas. O esfregaço dessa cultura, corado pelo método de Ziehl-Neelsen revelou, em sua totalidade, bacilos ácido-álcool-acetona resistentes. No esfregaço corado pelo Gram: nítidas granulações Gram-positivas. Repiquei a cultura em quatro tubos com Loewenstein e dois com caldo glicerinado. Após 15 dias de incubação, os repiques em Loewenstein apresentaram um crescimento escasso, a germinação nesse meio ficou paralisada. Uma cultura em caldo glicerinado (2.<sup>a</sup> geração) continuou germinando com turvação do meio, que examinado ao microscópio, com uma coloração de Ziehl, deu a impressão de uma cultura pura de bacilos ácido-álcool resistentes. Ao cabo de alguns dias modificou-se o aspecto: o meio tornou-se límpido e houve formação de um véu rugoso e cromogênico, com duas colorações: amarelo-laranja na parte inferior e ouro na parte superior. Com êsse véu efetuei novas sementeiras (3.<sup>a</sup> geração), que nos deram exuberantes culturas nos meios de Loewenstein, com verde malaquita e em caldo glicerinado a 5%. A cultura se conserva atualmente cromogênica, com um pigmento entre o amarelo ouro e laranja, semelhante à amostra "Rudan", isolada por SOUZA-ARAÚJO, procedente de carrapato (*Boophilus microplus*), capturado no Leprocômio do Estado do Paraná.

1) *Cultura em Loewenstein*. 30-5-46. 3.<sup>a</sup> geração (semeadura partindo de cultura em caldo glicerinado de 9-5-46). Revisada em 14-8, com 75 dias. Cobre totalmente a superfície do meio, cor amarelo-ouro, de aspecto uniforme, liso, úmido e brilhante.

2) *Cultura em Loewenstein*. 2-7-46. 4.<sup>a</sup> geração (semeadura partindo de cultura em caldo glicerinado 30-5-46). Revisada em 14-8, com 43 dias. Cobre totalmente a superfície do meio; mais cromogênico que o anterior, cor entre amarelo ouro e laranja, de aspecto brilhante, liso, úmido e granuloso, dava a impressão de uma pincelada de verniz amarelo sobre areia.

3) *Cultura em ágar glicerinado a 5%*, 2-7-46. (Semeadura partindo de cultura em caldo glicerinado de 30-5-46). Revisada em 14-8, com 43 dias. Cobre totalmente a superfície do meio; cor entre amarelo ouro e laranja. Aspecto úmido, liso, com brilho mais acentuado e granuloso, com formação de colônias maciças.

4) *Cultura em batata glicerinada*. 10-7-46. (Semeadura partindo de cultura em Loewenstein de 30-5-46). Revisada em 14-8, com 35 dias. Crescimento rápido e exuberante, com a presença de colônias úmidas e brilhantes; cor entre amarelo ouro e laranja. A água de condensação se mostra límpida, com a formação de um tênue véu na superfície.

5) *Cultura em caldo glicerinado a 5%*. (balões de Erlenmeyer com 100cc. do meio). De 15 a 20 dias de incubação a 37°C., começa a formar-se um delicado véu; com dois meses de idade a cultura está coberta, na superfície, por um revestimento exuberante, acentuadamente rugoso, que sobe pela parede do balão a uma altura de 1,5 a 2 cms e apresenta duas colorações: amarelo laranja, na parte inferior e ouro na parte superior. O meio da cultura permanece límpido, sem pigmentação. Ao cabo de pouco tempo este véu perde seu equilíbrio e começa a desintegrar-se, com sedimentação lenta, sem turvar o meio.

Os meios especiais de cultura para cogumelos e outros germes (Sabourau, Czapek, Loeffler e Huddleson), mostram-se impróprios para a cultura deste bacilo, enquanto que no ágar e caldo simples germinou pobremente.

### EXPERIMENTAÇÃO

Ante a importância de que se reveste não só a verificação do poder patogênico deste bacilo, como a obtenção de retro-cultura de inoculações em animais, escolhi o rato branco como o mais adequado para as minhas experiências, tanto pela facilidade de trabalhar com este animal no Laboratório, como pelas condições íntimas que reúne, já que existe uma lepra murina produzida por um bacilo ácido-álcool resistente, que apresenta uma grande semelhança com a lepra humana.

1) 30-5-46. Um lote de quatro animais — dois ratos brancos e duas cobaias foram inoculados com 0,5cm<sup>3</sup> de uma emulsão de cultura em caldo glicerinado. 9-5-46 (2.<sup>a</sup> geração), por via sub-cutânea, na axila direita. Com 25 dias um rato apresentou um abscesso do gânglio axilar direito, no ponto de inoculação. Puncionei o abscesso com uma seringa esteril (tipo insulina) e obtive pus do qual fiz sementeiras diretas, em oito tubos com Loewenstein e dois com caldo glicerinado. O exame microscópico (coloração de Ziehl-Neelsen) revelou, em sua totalidade, bacilos ácido-álcool resistentes; foram observados abundantes glóbulos brancos polinucleares fagocitando pequenos grupos de bacilos. Os exames microscópicos das vísceras (coração, pulmões, fígado, baço, rins e testículos) foram negativos para bacilo ácido-álcool resistente.

Até 75 dias de incubação a 37°C. este lote de sementeiras não germinou. As inoculações em cobaias foram negativas.

2) 28-6-46. Segundo lote de animais. Inoculei dois ratos brancos com 1cm<sup>3</sup> de uma emulsão de bacilos cultivados em meio de Loewenstein 30-5-46, por via sub-cutânea, na axila direita. 2-8-46. Com 35 dias, ambos os ratos apresentavam abscesso ganglionar na axila direita, no ponto de inoculação. Fiz sementeiras diretas, com material do pus obtido por punção, em oito tubos com Loewenstein e dois com caldo glicerinado. O exame microscópico (coloração de Ziehl-Neelsen), revelou, em sua totalidade, bacilos ácido-álcool resistentes, abundantes globias e glóbulos brancos polinucleares fagocitando massas de bacilos. Os exames microscópicos das vísceras (coração, pulmões, fígado, baço, rins e testículos), em ambos os ratos, foram negativos para bacilo ácido-álcool resistente.

Aos 18 dias de incubadas a 37°C. começaram a germinar as sementeiras. Em três tubos com Loewenstein encontrei abundantes colônias cromogênicas, de aspecto liso, úmidas e brilhantes, medindo entre 1 a 4 mm de diâmetro. Com 28 dias de incubadas as culturas apresentaram um crescimento abundante, cobrindo uniformemente dois terços da superfície do meio. Cór entre amarelo ouro e laranja. O exame microscópico (coloração de Ziehl-Neelsen) revelou tratar-se de culturas puras de bacilos ácido-álcool resistentes. Coloração de Gram: nítidas granulações Gram-positivas.

3) 2-9-46. Terceiro lote de animais. Inoculei dois ratos brancos com 1cm<sup>3</sup> de uma emulsão de bacilos cultivados em Loewenstein 2-8-46. 1.<sup>a</sup> geração da retrocultura n.º 1, obtida de rato branco, por via sub-cutânea, na axila direita. Continuam em observação, com o intento de obter novas retroculturas, até o n.º 3, a fim de exaltar a virulência desse bacilo.

O Dr. SOUZA-ARAÚJO — a quem agradeço a orientação dêste trabalho, desde a parte de campo, no Leprocômio, até a parte experimental, no Laboratório — designou a nossa cultura de "Cultura Rossell" e a incluiu na colecção de culturas do Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz, por considerar de alta importância qualquer cultura com êsses caracteres, isolada de material leproso.

### RESUMO

1. Cultura cromogênica de um bacilo ácido-álcool-acetona resistente isolado de mosquito *Culicino*, capturado em condições naturais, sôbre um enfêrmo lepromatoso L3.

2. Retro-cultura obtida em meio de Loewenstein, do pus de abscesso dum rato branco, formado em 35 dias (ponto de inoculação, axila direita). O exame microscópico revelou abundantes globias e glóbulos brancos polinucleares fagocitando massas de bacilos ácido-álcool resistentes.

3. No próximo verão prosseguiremos nossos estudos, trabalhando em diferentes leprocômios do Brasil, para confirmar o presente trabalho e poder chegar às suas conclusões definitivas.

---

NOTA. Uma referência verbal do presente trabalho foi comunicado pelo seu Autor, à Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, em 7 de Agosto de 1946.

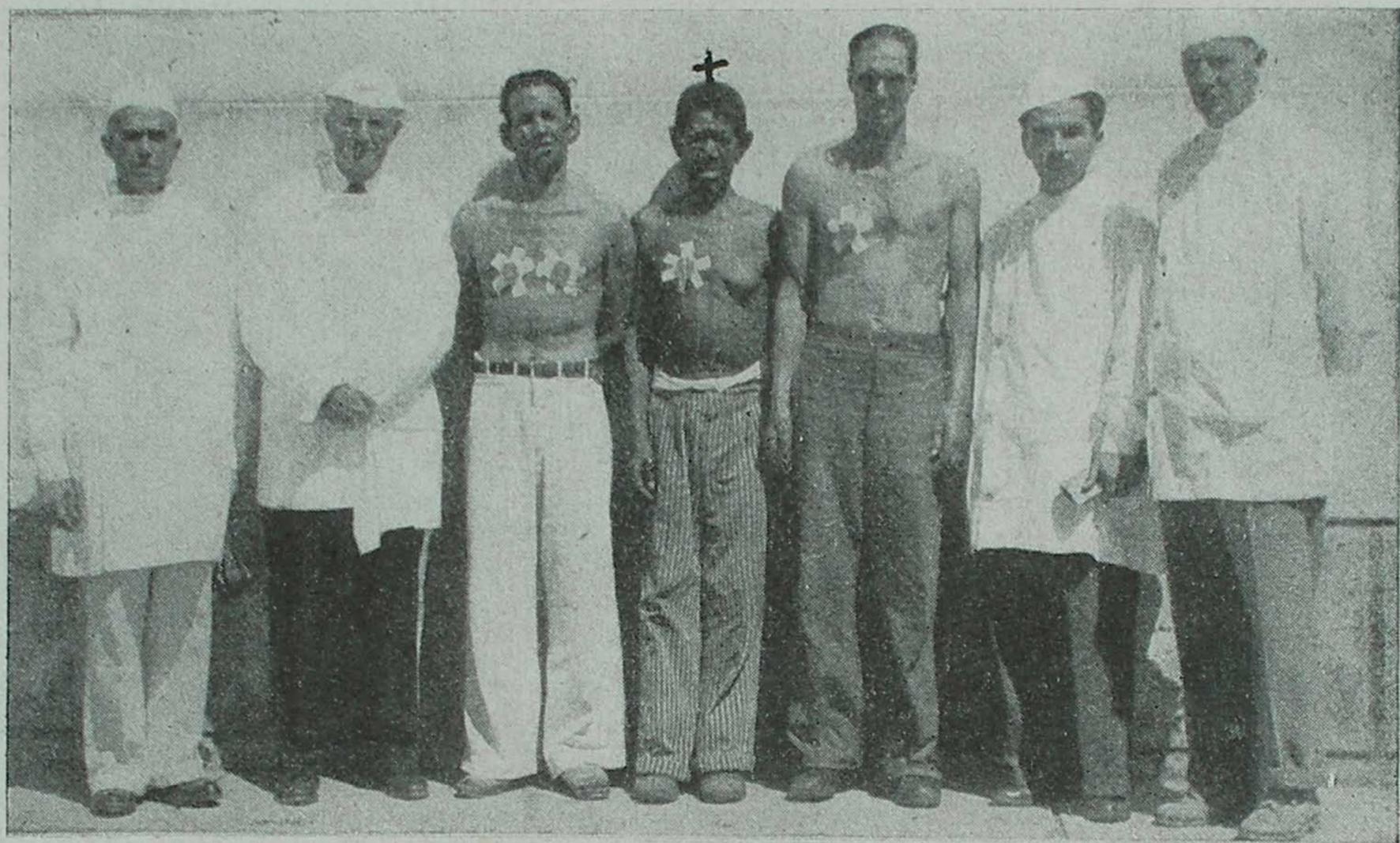


Fig. 1 — Colônia Santa Fé (Minas Gerais). Uma demonstração do processo de infestação de carrapatos em leprosos. À esquerda se vêem os Drs. E. Kellersberger e E. Agrícola e à direita o Autor e o Dr. Almeida Neto, diretor da Colônia. Do doente Pedro Rodrigues (assinalado com uma cruz) foi que obtive a cultura aqui descrita,

Foto. Dr. Souza-Araujo. 14-4-46.

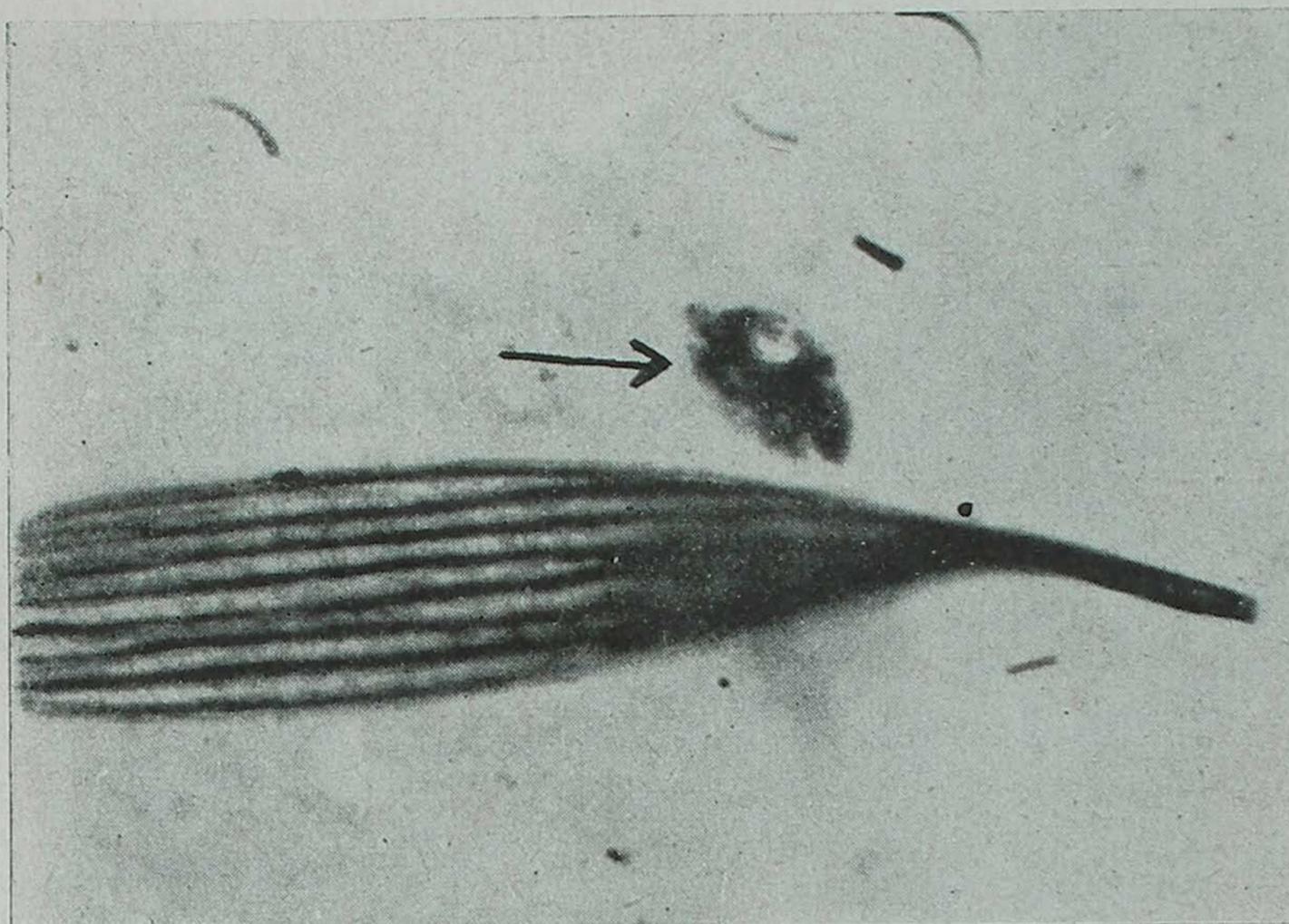


Fig. 2. Microfotografia de um esfregaço de mosquito infectado em leproso na natureza, mostrando uma globia ao lado duma escama de Culicino.

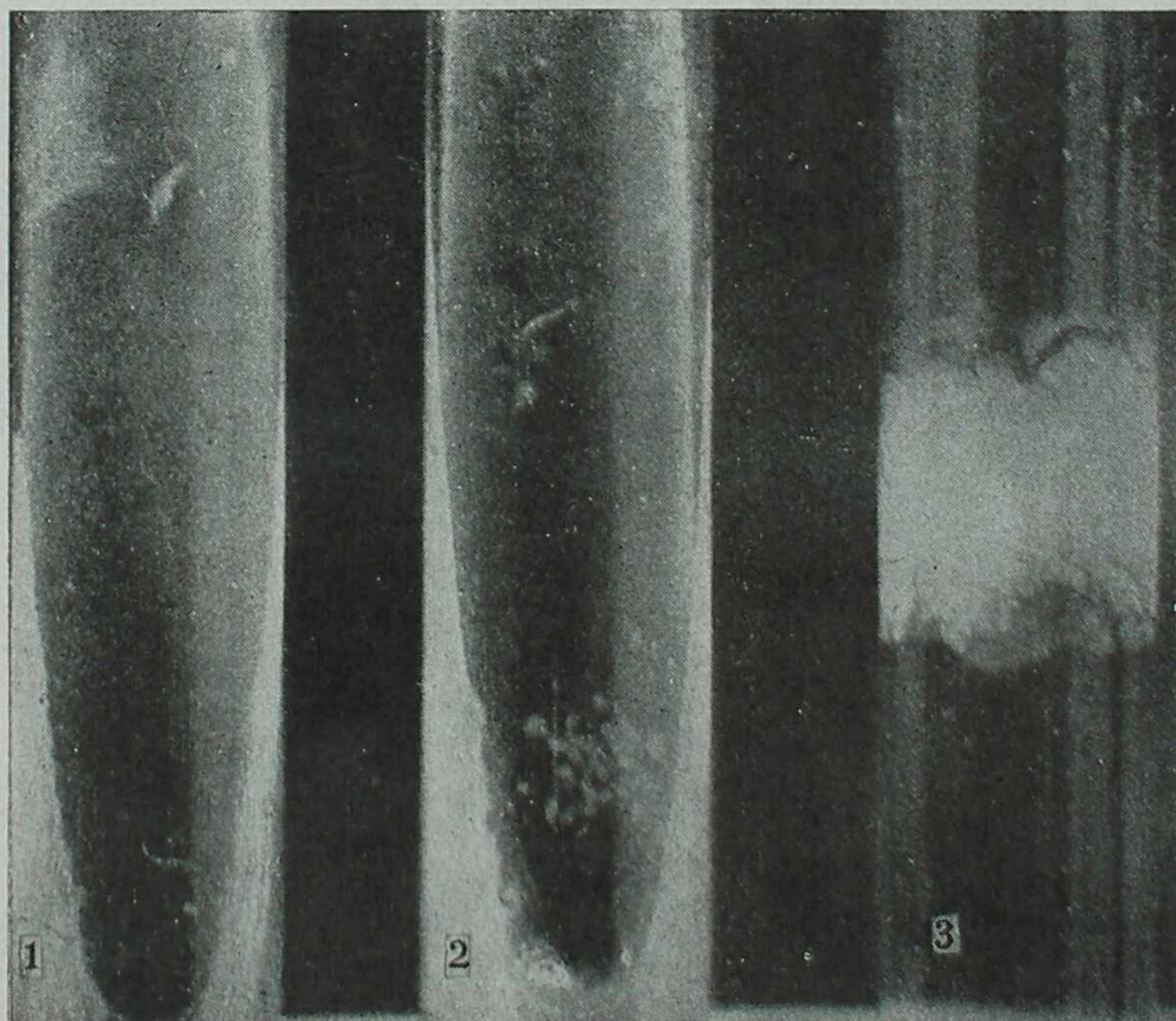


Fig. 3. Tubos 1 e 2 — Culturas do bacilo a. a. r. em Loewenstein (3.<sup>a</sup> e 4.<sup>a</sup> gerações) e em tubo 3 a mesma em caldo glicerinado mostrando denso véo amarelo.

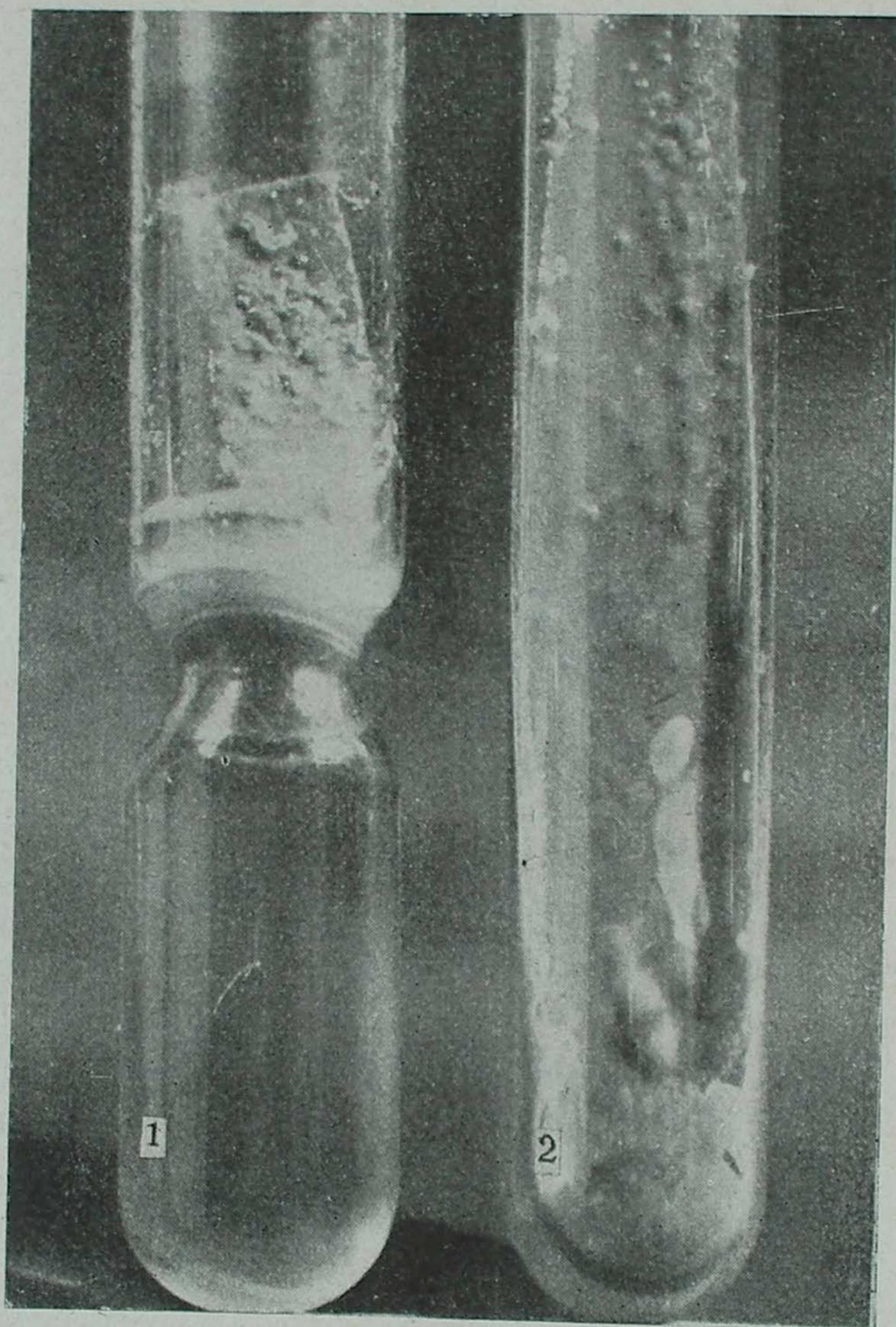


Fig. 4. N.º 1 Cultura do bacilo a. a. r. em batata glicerinada, mostrando a sua exuberancia. N.º 2 A mesma cultura em agar glicerinado a 5%.

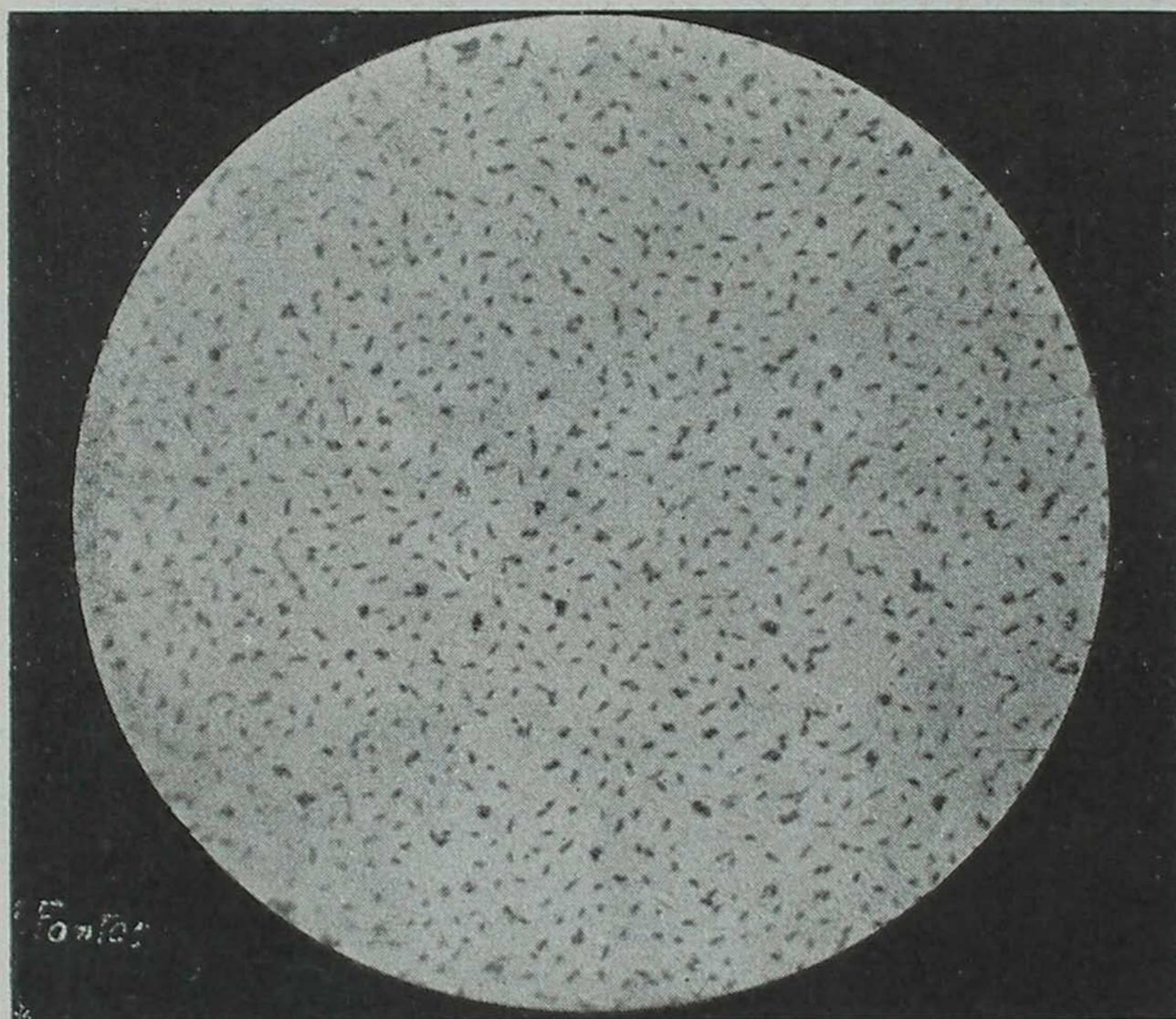


Fig. 5 Microfotografia dum esfregaço da cultura em meio de Loewenstein (Ziehl-Neelsen).

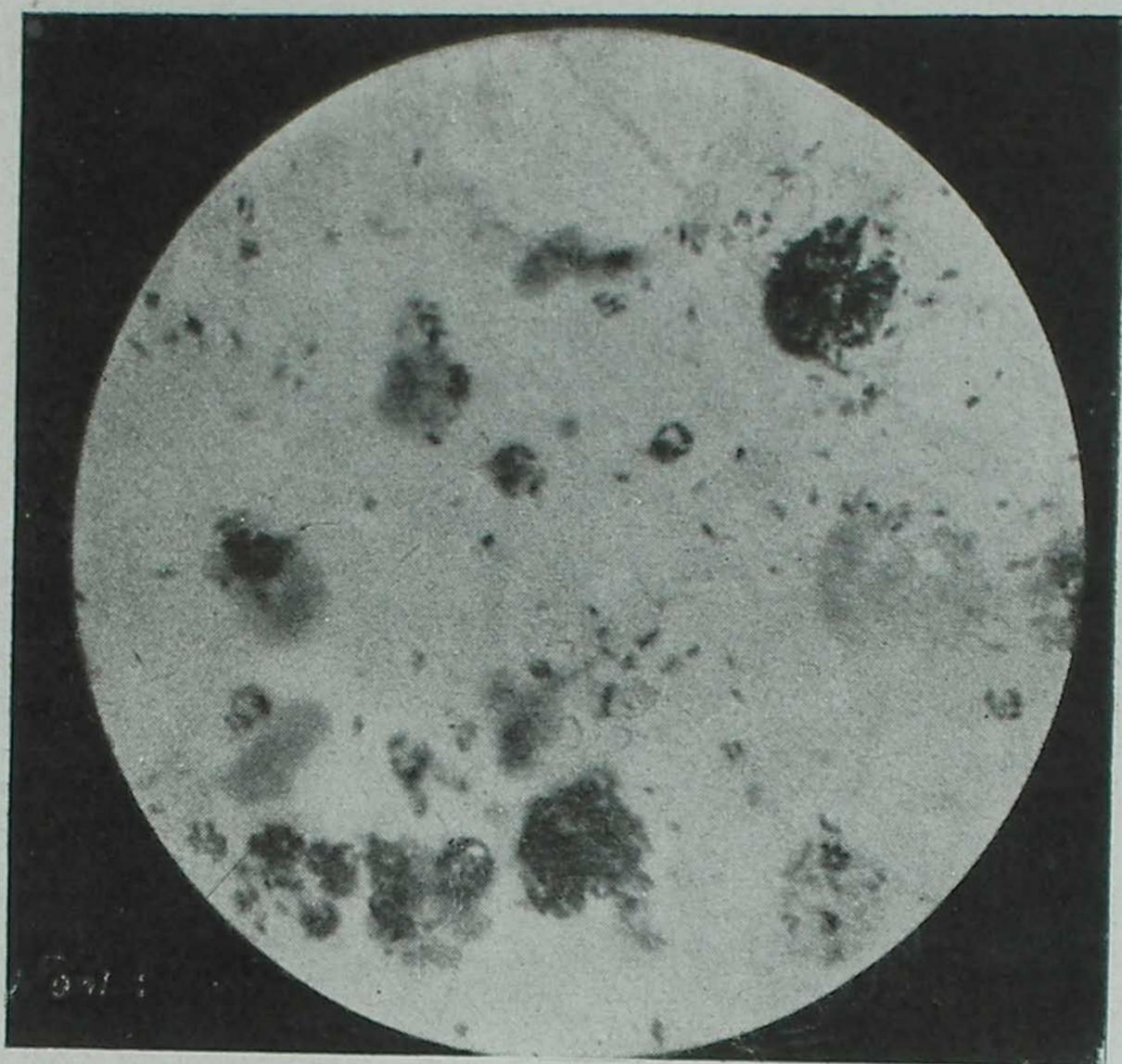


Fig. 6 Microfotografia de pús dum abscesso subcutaneo de rato branco inoculado com a cultura descrita, incubação 35 dias. mostrando globúlas e bacilos a. a. r. isolados.



Fig. 7 Microfotografia de um esfregaço da retrocultura obtida de rato branco.