

Algumas observações sobre o bacillo da tuberculose colocado em condições experimentaes proximas às condições saprophyticas

Pelos Drs. A. FONTES e J. BARBOSA DA CUNHA.

Desde 1923 que um de nós se vem occupando com o estudo do desenvolvimento do bacillo da tuberculose, adaptando-o a meios de cultura artificiaes, com o objectivo de obter a cultura do virus sob a forma granular, e ainda verificar a possibilidade da conservação do virus tuberculoso com suas propriedades morbigenas, mesmo quando colocado em condições proximas ás do saprophytismo.

Culturas de tuberculose aviaria, papagaio e bovina, antigas no laboratorio, com 5 mezes de desenvolvimento em gelose glicerinada a 5%, foram transplantadas em 5-VII-23, para meio de SABOURAUD maltosado e meio de SABOURAUD maltosado-glicerinado a 5%. As culturas se desenvolveram abundantemente nos tubos com o meio glicerinado e foram pouco abundantes nos tubos isemptos de glicerina. As amostras semeadas se comportaram igualmente, não sendo possivel estabelecer differença apreciavel no desenvolvimento das respectivas colonias, quando comparadas nos mesmos meios de cultura. (Observação feita em 11-XI-1923).

N'esta ultima data se procedeu a uma nova passagem nos mesmos meios, tendo sido observado um mez depois culturas mais abundantes que da primeira passagem. Estas culturas foram conservadas até Abril de 1924, quando iniciamos a verificação por novas series utilizando-nos das amostras mais antigas da collecção do Instituto. Dentre estas sobreleva notar a amostra T. M. 1. (Typo humano) que nessa occasião contava cerca de 25 annos de passagens successivas em meios artificiaes, *sem passagem em animal* e que conservava toda a sua virulencia e caracteres morphologicos e culturaes classicos.

Não só essa amostra como ainda outra do typo humano (T. M. 4), outras do typo bovino foram mantidas por passagens successivas em meios de SABOURAUD maltosado, glicerinado-maltosado-glycosado, glicerinado-glycosado, conservação, conservação-glicerinado e gelose glicerinada, até Outubro de 1924, sem que fossem notadas differenças accentuadas no desenvolvimento das culturas nem na virulencia das amostras.

Pelos exames repetidos essas amostras conservaram sempre sua morphologia em bastonetes mais ou menos granulosos, sua acido-resistencia mais ou menos accentuada e sua virulencia sem modificação apreciavel. O mesmo succedeu em culturas mantidas por passagens repetidas em meios liquidos de composição identica ao SABOURAUD (com exclusão de gelose) e no meio usado para o preparo da vaccina do carbunculo sympto-

matico, immensamente favoravel á attenuação desse germen, e que é constituido pelo caldo de carne, sôro de cavallo e glycose.

Ainda ahi as amostras de tuberculose semeiadas se desenvolveram sem attenuação apreciavel de sua virulencia e sem modificação sensivel na sua morphologia e caracteres culturaes. (Observações feitas em 8 de Setembro de 1924).

II

Alguns dos tubos de cultura em SABOURAUD maltosado, glycerinado-maltosado e glycosado-maltosado foram deixados fóra da estufa em exposição á luz diffusa, arrolhados com rolha de cortiça, sem nenhuma repicagem. Assim de Agosto de 1924 a Novembro de 1926 permaneceram essas culturas, quando foram então repicadas para novos tubos de SABOURAUD. *A semente não se desenvolveu nos tubos repicados, que foram conservados na estufa durante 45 dias.*

Addicionou-se então um pouco de caldo simples aos tubos originaes e foram elles mantidos em estufa até Fevereiro de 1927. Nessa data a amostra T. M. 1., semeada em SABOURAUD-glycosado em 29—VIII—24, repicada novamente deu desenvolvimento a culturas pujantes de bacillos de tuberculose alcool-acido-resistentes.

Em 6 de Janeiro de 1928, procedeu-se a uma nova transplantação da semente do tubo original T. M. 1., semeado em Agosto de 1924, tendo havido abundante desenvolvimento em todos os tubos semeados.

A vitalidade da semente no meio de SABOURAUD-glycosado se mantinha ainda, após 3 annos e 5 mezes. As outras amostras não mais se desenvolveram.

As experiencias acima referidas demonstram a *possibilidade do bacillo da tuberculose manter-se em estado de vida latente em culturas artificiaes durante o praso de 2 annos e 7 mezes recobrando a sua virulencia (na accepção da capacidade de reproducção) sem perder os seus caracteres morphologicos e culturaes, bastando para isso encontrar elementos favoraveis ao seu desenvolvimento: CALOR, ELEMENTO NUTRITIVO E HUMIDADE.*

III

Essas experiencias conduziram o nosso espirito á verificação da possibilidade de vida do bacillo da tuberculose em condições proximas ao saprophytismo natural. Para esse fim estabelecemos a seguinte serie experimental, cujo protocollo damos a seguir.

21 de Março de 1927—Foram semeados 2 balões de caldo glycerinado a 5 0/0 em superficie com cultura em pelle de T. M. R. (amostra isolada de urina de homem, typo humano); 2 balões com cultura em pelle de T. H. A. (typo humano, proveniente da Argentina) e 2 balões de T. M. 1. (typo humano, isolado de escarro).

Os balões foram conservados á temperatura ambiente e expostos á accção da luz diffusa.

Na 1^a. semana todas as pelles semeadas foram ao fundo dos balões.

5—5—927—Em um dos balões semeados com T. M. R. (balão 1) a semente que fora ao fundo serviu de nucleo ao desenvolvimento de uma cultura de cogumelo (observação feita 45 dias depois da semeiadura).

22—6—927—Nessa data um fragmento da semente do balão 1 que accarretava comsigo uma particula de cultura do cogumelo emulsionada em um pouco d'agua physiologica foi inoculado em 2 cobayas.

Estas cobayas apresentaram cancro e ganglios correspondentes infartados no prazo commum.

22—8—927—Nessa data foi extrahido um ganglio inguinal de uma das cobayas. Esfregaços do ganglio mostraram numerosos bacillos acido-alcool-resistentes, e mycelio. Com pús do ganglio foram semeados tubos de batata glycerinada, PETROFF, e gelose glycerinada em SABOURAUD.

11—10—927—As culturas se desenvolveram bem em batata e em PETROFF e em gelose glycerinada e no meio de conservação de SABOURAUD.

Nos esfregaços feitos com o material retirado dos tubos de PETROFF e conservação de SABOURAUD, foram vistos abundantes mycelios ao lado de bacillos acido-alcool-resistentes com bastonetes GRAM positivos.

Nesta data procedeu-se á repicagem desses tubos para meios proprios á tuberculose assim como tambem para meio de SABOURAUD. Neste ultimo meio desenvolveu-se uma cultura de actinomyces.

30—11—927—As sementes depostas nos balões em 21—3—927, foram retiradas e inoculadas em 8 cobayas, obedecendo á seguinte serie:

Balão n. 1. Tuberculose renal + cogumelo actinomyces:—2 cobayas.

Balão n. 2. Tuberculose renal + cogumelo não caracterisado:—2 cobayas.

Balões III. IV. V e VI—com T. M. 1 e T. H. A.—caldos estereis, limpidos:—2 cobayas para cada balão.

Durante o mez de Dezembro morreram as cobayas correspondentes aos balões III e IV, sem lesões tuberculosas. As outras se conservaram vivas sem manifestações de doença até a data actual.

Dessas experiencias decorre que o bacillo da tuberculose foi capaz de viver em latencia no interior do caldo de cultura, á temperatura ambiente e exposta á luz diffusa, sem se desenvolver, e supportando a concorrência vital com o desenvolvimento de uma cultura de cogumelo durante o prazo minimo de 45 dias e maximo de 90 dias (até onde chegou a nossa observação), sem modificação de sua virulencia.

Por outro lado foi elle acompanhado em symbiose pelo actinomyces que tambem foi isolado da lesão do animal.

Restava verificar se poderia ser tambem attribuida qualquer acção pathogenica á esse actinomyces.

Com esse fim procedeu-se á inoculação de uma cobaya com fragmento da cultura em SABOURAUD conservação (1º repique do tubo de PETROFF, onde fora semeado o pús da cobaya primitivamente infectada).

No animal infectado com o actinomyces houve desenvolvimento de tuberculose. Nos ganglios inguinaes foram encontrados numerosos bacillos de KOCH. Não foi encontrada nenhuma forma attribuiavel ao actinomyces.

Uma verificação da cultura do actinomyces (2º repique) feita posteriormente mostrou a existencia de raros bastonetes acido-alcool-resistentes. Tratava-se por consequencia de resto de semente do tubo de PETROFF, passado para o meio de SABOURAUD. Uma cultura de actinomyces semeada em SABOURAUD (3º repique) não infectou a cobaya quando experimentada.

Assim, pois, o *actinomyces* não apresentou poder pathogenico para a cobaya.

A repicagem do balão "1" feita em 7—XII—927 para SABOURAUD deu desenvolvimento a uma cultura identica á que fôra obtida após a passagem desse cogumelo pelo organismo da cobaya.

Verificou-se assim experimentalmente a concorrencia vital de um germen não pathogenico com um germen pathogenico em symbiose nas condições normaes do meio exterior, symbiose que se manteve por passagem no organismo animal, conservando-se ambos os germens com os seus caracteristicos physiopathologicos, isto é, um o seu poder pathogeno intacto (bacillo da tuberculose), o outro a sua não pathogenidade (*actinomyces saprophyta*).

As sementes mantidas nos balões de caldo até Novembro foram nessa data inoculadas em cobayas que se mostraram sem alteração de saude, nenhuma dellas se infectando.

Os tubos semeados com o pús da cobaya infectada por essa amostra de tuberculose deram desenvolvimento a magnificas culturas luxuriantes, todas porem dotadas de forte poder chromogeno. Quer os tubos de PETROFF, quer os de batata glicerinada ou os de gelose glicerinada, mostraram culturas coradas em róseo salmão mais ou menos accentuado, até a côr de vermelho tijolo, entremeiado com coloração creme.

É digno de nota e se deve accentuar que a propriedade chromogena mostrou-se neste caso independente da constituição chimica do meio. Do mesmo modo, não esteve ella ligada á idade da cultura do laboratorio, por isso que foi verificada nessa amostra immediatamente depois da passagem pelo organismo da cobaya, quando anteriormente essa amostra não tinha poder chromogeno accentuado e que tambem não se manifestou nas culturas subsequentes áquellas obtidas após isolamento do germen do pús tuberculoso.

Os preparados microscopicos dessas culturas são tambem muito interessantes.

Nelles se observou a predominancia de formas em streptothrix.

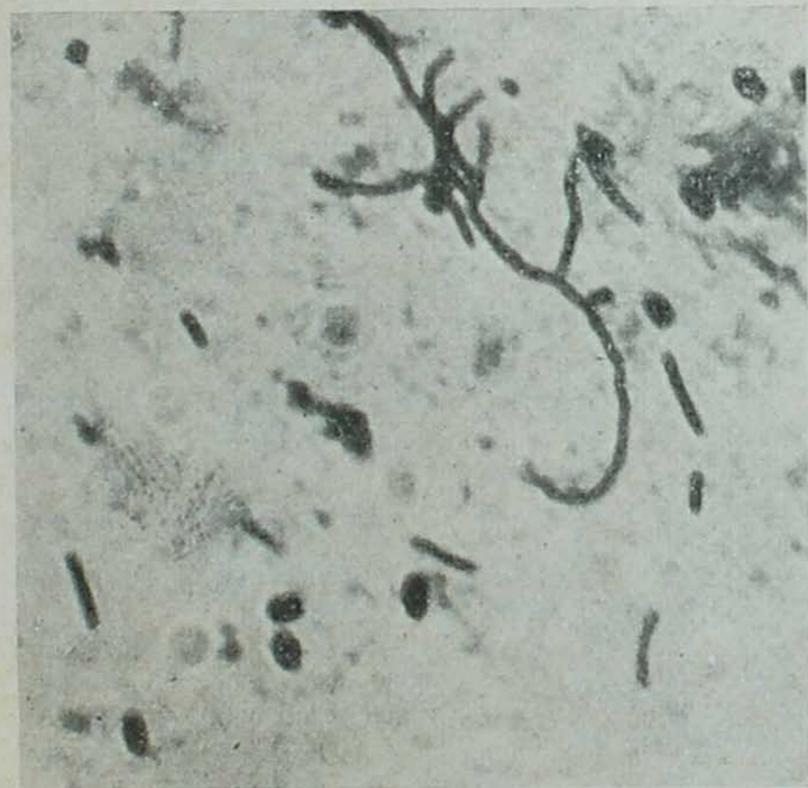
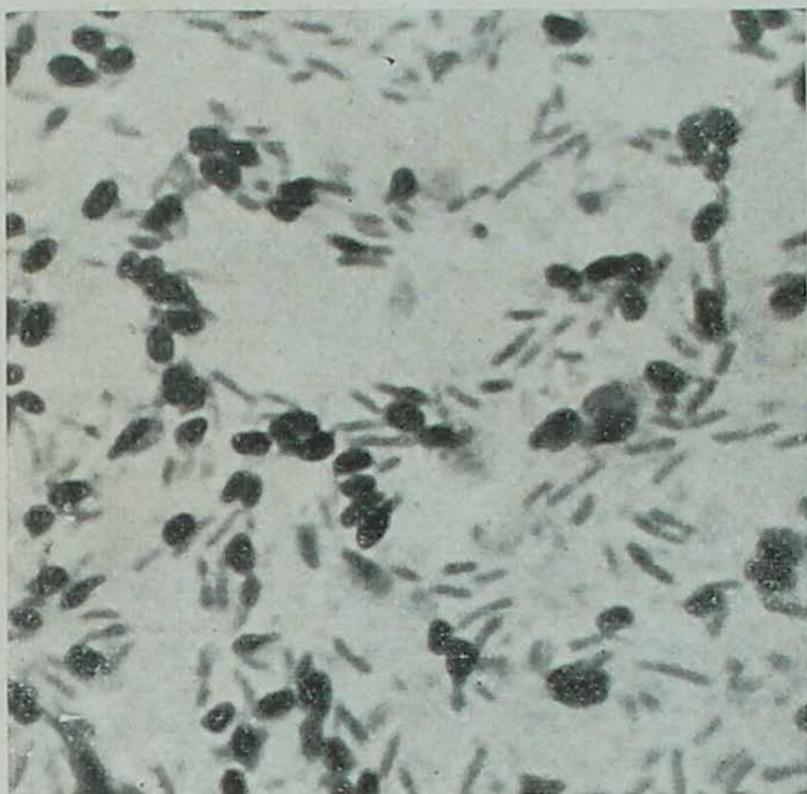
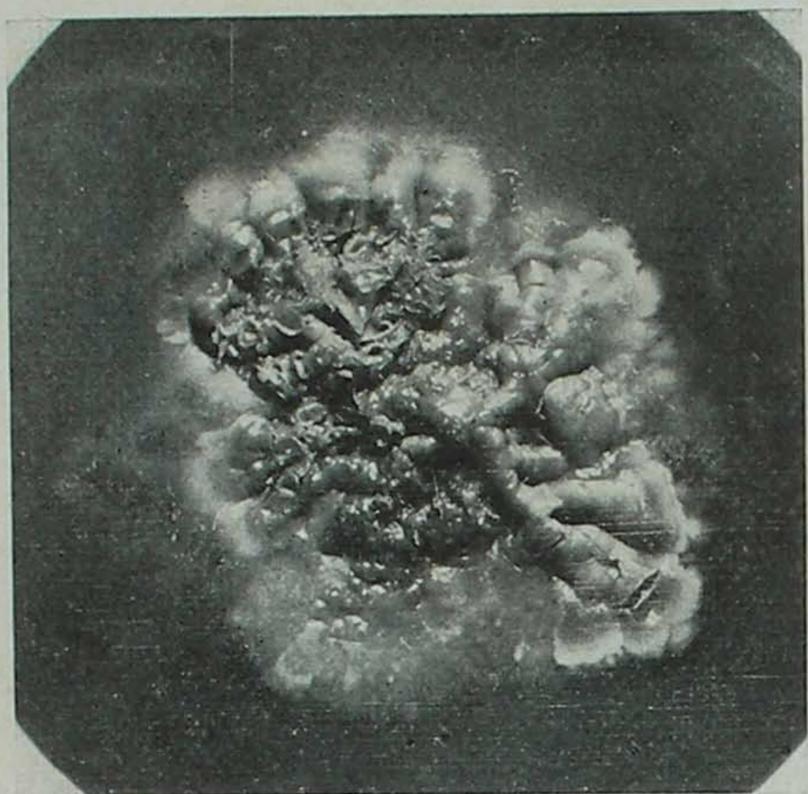
DISCUSSÃO.

As experiencias acima relatadas nos suggerem considerações de valor pratico.

A possibilidade do bacillo da tuberculose se manter em estado de vida latente durante o prazo de 2 annos e 7 mezes, recobrando sua vitalidade pela addição de elementos nutritivos que asseguravam ainda a conservação da vida da cultura original ao cabo de 3 annos e 5 mezes, falla muito alto em favor da grande resistencia do virus tuberculoso ás causas dysgeneticas do meio exterior.

Esta condição de resistencia e de vida latente ainda se tornou mais patente na serie experimental III.

Desta serie se conclue que a contaminação accidental por um *actinomyces* não se oppoz á vida symbiotica desse cogumelo com o bacillo de KOCH, conservando cada especie suas caracteristicas biologicas, a saber: não pathogenidade do *actinomyces* e a pathogenidade e virulencia do bacillo da tuberculose. Essas experiencias nos mostraram, pois, que devemos manter grandes reservas sobre a destruição do virus tuberculoso pelas condi-



Phots. J. Pinto.

Fig. 1—Actinomyces não pathogeno para a cobaya. Cultura de 3 mezes em meio de conservação SABOURAUD.

Fig. 2—Microphotographia de um esfregaço desta cultura. Col. Methodo de GRAM.

Fig. 3—Actinomyces e bacillo da Tuberculose—Esfregaço de cultura mixta em PETROFF—Col. pelo Methodo de FONTES.

Fig. 4—Id. idem em batata glicerinada. Formas actinomicosicas acido-al cool-resistentes fortemente granulosas

Fig. 1—Strahlenpilz nicht pathogen fuer Meerschweinchen. Kultur in SABOURAUD's Konservierungsnaehrboden. Kultur von 3 Monaten.

Fig. 2—Mikrophotographie eines Ausstriches dieser Kultur. Faerbung: GRAM's-Methode.

Fig. 3—Strahlenpilz und Tuberkelbacillus. Ausstrich einer gemischten Kultur in PETROFF. Faerbung: Durch FONTES Methode.

Fig. 4—Id. id. in glycerinierter Kartoffel. Saeure-alkoholfeste Strahlenpilzformen stark granulose.



Phots. J. Pinto.

Fig. 5—Esfregação de cultura em PETROFF do bacillo acido-alcool-resistente isolado de pus do ganglio de cobaya que succumbiu por tuberculose generalizada—Bac. acido-alcool-resistente fortemente granuloso. Pelo Methodo de FONTES.

Fig. 6—Id. id. Cultura em batata glicerinada.

Fig. 5—Ausstrich einer Kultur in PETROFF von saeure-alkoholfesten Bacillus, isoliert von Ganglien-Eiter eines an generalisierte Tuberculose gestorbenen Meerschweinchens. Saeure-alkoholfester Bacillus stark granulose. Durch FONTES'-Methode.

Fig. 6—Id. id. Kultur auf glycerinierter Kartoffel.



Fig. 7



Fig. 8

Castro Silva, del.

Fig. 7—Cultura de tuberculose chromogena, isolada de pús de cobaya—Meio de PETROFF.

Fig. 8—A mesma cultura em batata glicerinada.

Fig. 7—Kultur von chromogener Tuberkulose, isoliert aus dem Eiter eines Meerschweinchens.—
PETROFF'sches Medium.

Fig. 8—Dieselbe Kultur auf Glycerin-Kartoffel.

ções dysgeneticas do meio exterior, e nos fazem pensar na possibilidade de de infecções originarias de meios infectados.

CONCLUSÕES.

O virus da tuberculose póde se manter em latencia de vida por prazo superior a 2 annos e 7 mezes, e viver em symbiose com um cogumelo não pathogeno por prazo de 90 dias, sujeito ás condições normaes do meio ambiente (acção da temperatura e da luz). Neste ultimo caso o virus não perdeu a sua virulencia nem a sua pathogenicidade.