

Contribuição ao estudo das Micobactérias

Fluoromicroscopia e reação citoquímica de Dubos

por

Laerte de Andrade

1. Considerações gerais
2. Material de estudo
3. Fluoromicroscopia
4. Prova citoquímica para virulência
5. Discussão e apresentação dos resultados
6. Tabelas, quadros e listas de culturas
7. Conclusões
8. Bibliografia

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A falta de elementos básicos para o estudo das Micobactérias é talvez a maior razão da numerosa bibliografia sobre o assunto, com a descrição de amostras isoladas das mais diferentes procedências e comentários sobre a morfologia, caracteres tintoriais, culturais, imunológicos, bioquímicos e patológicos, apreciados por critério pouco uniforme, não dando margem a um estudo cuidadoso da afinidade existente entre elas.

O assunto assume maiores proporções, quando nos detemos nos denominados "paratuberculosos", grupo constituído pelas bactérias do gênero *Mycobacterium*, excetuados os bacilos da tuberculose, da lepra, da lepra murina, da enterite dos bovinos, dos animais de sangue frio e das aves.

A importância das espécies desse gênero em bacteriologia humana, coloca-o entre os mais estudados nos últimos tempos.

A constância com que se isolam bacilos ácido-álcool-resistentes, diminui a originalidade da descrição ou publicação desses achados bacteriológicos, feitos nos mais diversos produtos normais ou patológicos, de origem humana ou animal, répteis, alimentos, vegetais, água, solo, etc. Seriam, entretanto, valiosos tais achados, se houvesse um melhor aproveitamento desses estudos e maior uniformidade nas normas de observação das suas propriedades, por ocasião do isolamento e do encaminhamento das culturas à comissão de estudos para a sua conveniente classificação. Observámos descrições esparsas de alguns caracteres, as quais pouco favorecem a qualquer estudo em conjunto.

E' o que percebemos no livro de HAUDUROY (12), no qual reproduz êle a descrição de uma centena de germes isolados por diferentes pesquisadores, cuja coletânea denomina, muito justificadamente, de "massa anônima e confusa". Entretanto, a sua volumosa bibliografia é uma fonte de estudo de inestimável valor para os pesquisadores dêsse gênero.

Desde os trabalhos de KOCH, têm sido isolados germes do gênero *Mycobacterium*, sem que, até o presente momento, se tenha chegado a uma classificação definitiva. Pode-se considerar a de BERGEY como uma tentativa, uma vez que os chamados paratuberculosos (*Mycobacterium* sp.) não foram ainda convenientemente classificados. Embora o gênero *Mycobacterium* esteja merecendo a atenção dos bacteriologistas, o polimorfismo dos seus caracteres não deu margem a que a sua sistemática tomasse rumos seguros, como tem acontecido com gêneros bacterianos mais recentemente criados.

Constantemente, novos caracteres são descobertos, e um tanto desordenadamente são apreciados. Continuando em aberto a questão, trazemos nossa modesta contribuição, analisando uma série de culturas obtidas de diferentes procedências, especialmente do ponto de vista de duas técnicas, uma não muito recente e já em uso em vários países estrangeiros — a Fluoromicroscopia — e outra recentemente descrita por DUBOS e MIDDLEBROOK (7) — a prova citoquímica para virulência. Como os demais caracteres que passaremos em revista e que têm servido de base para o estudo das Micobactérias, também êstes dois caracteres, não obstante a irregularidade com que se apresentam, poderão servir como elementos valiosos, quando se fizer a coordenação das normas para o estudo das Micobactérias e sua conseqüente classificação.

Como vemos, numerosos são os caracteres a serem investigados no estudo das Micobactérias:

- procedência no isolamento;
- caracteres tintoriais: colorações, granulações, fluorescência;
- caracteres culturais: não cultivabilidade, composição dos meios, pH, temperatura e tempo de crescimento, pigmento, etc.;
- resistência aos agentes físicos e químicos;
- inoculações: patogenicidade para o homem e animais;
- composição química;
- constituição antigênica;
- tuberculina e paratuberculinas — reações cruzadas;
- bacteriófagos;
- testes para virulência: citoquímico de DUBOS, disposição paralela ou em cordões, e ação leucotóxica.

A procedência das culturas, a ácido-álcool-resistência, o aspecto da cultura em diversos meios, a temperatura de crescimento e as propriedades bioquímicas (fermentação da sorbita e arabinose) foram utilizadas por BERGEY (2) na sistemática. Quanto à fluorescência,

limitou-se a citá-la como característico de algumas espécies de micobactérias, sem especificá-las.

A procedência das culturas, elemento considerado importante, tem pequena base para classificação, pois tem sido verificado serem êsses germes, mesmo os da mesma espécie, isolados constantemente das mais diversas origens.

Dos caracteres morfológicos e tintoriais, apenas a ácido-álcool-resistência é elemento decisivo na sistemática dêsses germes, embora seja sabido não ser permanente, pois certas amostras perdem-no quando envelhecidas. A morfologia e disposição, salvo a apresentação em globias pelo *Mycobacterium leprae* e que constitui elemento de diagnóstico, ainda resta ficar definitivamente provado, se apenas êle possui a propriedade de assim se apresentar.

Os caracteres culturais — dentre êles, o pigmento — são muito usados na distinção entre o bacilo da tuberculose e os saprófitas, embora sejam muito sujeitos a mutações, de acôrdo com a idade das culturas e os meios utilizados. Apenas constituem subsídios sem valor decisivo.

O poder patogênico é muito variável, mas ainda constitui elemento de real valor na identificação das variedades, especialmente da espécie *Mycobacterium tuberculosis*, e desta com as demais.

Quanto à constituição antigênica, em estudo por muitos pesquisadores, parece-nos elemento valioso.

Um dos objetivos dêste trabalho é verificar até que ponto a fluorescência é um característico uniforme entre as micobactérias e se sempre concorda com a ácido-álcool-resistência verificada pelas anilinas.

Estando incluídas nêste gênero duas espécies importantíssimas — *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* — agentes etiológicos de moléstias com elevada incidência no Brasil, o seu estudo tem merecido a nossa particular atenção.

Cada vez mais é relegado a segundo plano o diagnóstico da tuberculose pela simples bacterioscopia, pois a presença de bacilos ácido-álcool-resistentes nos líquidos orgânicos e nos tecidos não poderá ter expressão, dada a freqüência com que se consegue isolar Micobactérias com ou sem ação patogênica, algumas com caracteres culturais pouco diversos das amostras clássicas de *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, o exame direto passa a ser falho ou duvidoso, mesmo quando positivo. Se a presença do bacilo é decisiva, também a sua perfeita identificação assume características de igual importância. Temos conhecimento de exames diretos positivos ao Ziehl e, feita a cultura, sòmente são isolados bacilos ácido-álcool-resistentes com caracteres de paratuberculosos. Torna-se indispensável que o diagnóstico da tuberculose seja sempre completado com a cultura ou inoculação de animais.

Com a fluoromicroscopia idêntica observação deve ser feita, pois, não sendo ela um caráter específico do bacilo da tuberculose, o exame

não deve ser aceito como positivo, somente porque foram encontrados bacilos fluorescentes à auramina.

No estudo das amostras recentemente isoladas, a prova citoquímica de DUBOS e MIDDLEBROOK, é elemento valioso na sua identificação quanto à virulência.

As dificuldades assumem idênticas proporções no caso das tentativas de isolamento do bacilo da lepra por vários pesquisadores que têm isolado culturas de lesões leprosas, mas não se sentem seguros em afirmar se se trata ou não do *Mycobacterium leprae*, uma vez que os caracteres próprios dessa espécie são ainda desconhecidos, sendo pouco provável que eles se confundam com os dos saprófitas. Muitas dessas amostras são patogênicas para animais de laboratório, embora apresentando caracteres culturais e outros, que permitiriam, no estado atual dos nossos conhecimentos, incluí-las no grupo dos paratuberculosos, como fez BERGEY. Quando chegarmos a determinar bem o grupamento das espécies desse gênero, as culturas obtidas de leprosos ou serão confirmadas ou poderão com relativa facilidade serem incluídas na sistemática bacteriana e, assim, saírem da designação de *Mycobacterium sp*, adotada por BERGEY.

No que se refere aos paratuberculosos em geral, a situação chegou a tal ponto que HAUDUROY, impossibilitado de dar designação às bactérias descritas pelos diferentes pesquisadores, o fez por números, colocando os nomes dos seus descobridores em ordem alfabética.

2. MATERIAL DE ESTUDO

Procurámos incluir neste estudo o maior número possível de amostras que nos foi dado obter, não só de coleções clássicas, como de isoladas em laboratórios de rotina. Em outra parte desta publicação, apresentaremos as listas de culturas com as especificações e, em tabelas e quadros, os resultados das amostras que examinámos.

PROCEDÊNCIA DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS

| LISTA N.º: | Instituições | N.º de amostras |
|------------|--|-----------------|
| 1 | American Type Culture Collection..... | 26 |
| 2 | Lister Institute — London..... | 13 |
| 3 | National Institute of Health U.S.A. | 9 |
| 4 | Carville, U.S.A. | 9 |
| 5 | Coleção Muñoz Rivas — Colombia..... | 51 |
| 6 | Instituto Oswaldo Cruz — Diversas..... | 59 |
| 7 | Laboratório Central de Tuberculose..... | 11 |
| | TOTAL..... | 178 |

GRUPAMENTO DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS

| TABELA N.º: | Grupos | N.º de amostras |
|-------------------------------------|---|-----------------|
| 1 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 30 |
| 2 | Mic. cromogênicas isoladas de escarro..... | 10 |
| 3 | Mic. isoladas de leprosos, diretamente..... | 31 |
| 4 | Mic. de hematófagos exp. inf. em leprosos.... | 18 |
| 5 | Mic. isoladas de ratos com lepra murina..... | 8 |
| 6 | Mic. isoladas de animais de sangue frio..... | 12 |
| 7 | Mic. de efluentes de fossa..... | 9 |
| 8 | Mic. de terra (pó de aposentos de leprosos).. | 5 |
| TOTAL DE CULTURAS EXAMINADAS | | 123 |

No cômputo dos resultados, fizemos o expurgo das duplicatas de culturas-padrões, afim de que os resultados não fôsem viciados. As 65 culturas das coleções clássicas (ATCC, Lister Institute, N.I.H. e Carville) ficaram reduzidas a 32, por haver numerosas repetições. Para que seja possível a perfeita identificação das culturas consideradas padrões, apresentamos uma tabela de correspondência de numeração, na qual os interessados obterão maiores informes sôbre estas e outras culturas.

Pela classificação de BERGEY, examinámos as seguintes espécies do gênero *Mycobacterium*:

I — *Parasitas de animais de sangue quente:*

- 1 — *Mycobacterium tuberculosis*
 - a — variedade *hominis*
 - b — variedade *bovis*
- 2 — *Mycobacterium avium*
- 3 — *Mycobacterium leprae* (só fluorescência)
- 4 — *Mycobacterium leprae murium* (só fluorescência)

II — *Parasitas de animais de sangue frio e saprófitas:*

- 6 — *Mycobacterium piscium*
- 8 — *Mycobacterium ranæ*
- 11 — *Mycobacterium spp.* a) isolados de leprosos
b) outras micobactérias
- 13 — *Mycobacterium phlei*
- 14 — *Mycobacterium berolinensis*

No grupo *Mycobacterium spp.* criado por BERGEY como um grupo miscelânea, foram incluídos germens outrora incorretamente identifi-

cados como *Mycobacterium leprae* LEHMANN e NEUMANN, isolados de lesões leprosas. Estas culturas foram grupadas juntamente com as micobactérias de animais de sangue frio e saprófitas, separadas pelo critério da temperatura e da utilização da sorbita e arabinose.

O grupamento que fizemos em nossas tabelas não obedece rigorosamente ao da sistemática, e sim ao da procedência das amostras que tivemos ao nosso dispor no decorrer da pesquisa, em sua maioria gentilmente cedidas de sua coleção pelo Dr. SOUZA-ARAÚJO.

3. FLUOROMICROSCOPIA

A observação microscópica em luminescência utiliza a propriedade que têm certos seres vivos de, quando iluminados pela radiação ultravioleta, emitirem em presença de um fluorocromo, uma radiação secundária visível. (LEVADITI — 13).

As radiações das fontes naturais e artificiais são constituídas de ondas de comprimentos diversos, sendo visível somente uma estreita faixa. A fluorescência é uma modalidade de fotoluminescência, em que são empregadas substâncias que produzem luz por transformação, ao contrário da fosforescência, em que as substâncias possuem energia luminosa própria (fluorescência intrínseca). Estas substâncias são denominadas fluorocrômios e foram usadas primeiramente por HAITINGER. Quando elas recebem a radiação ultravioleta, uma parte absorve energia que se transforma em energia luminosa sem calor, e que se denomina fluorescência secundária. Utilizando a luz ultravioleta proveniente de forte fonte luminosa e filtrada, podemos obter fluorescência de diferentes cores, variando do azul ao vermelho.

A fluoromicroscopia somente agora está tendo, no Brasil, sua aplicação em bacteriologia, especialmente da tuberculose, embora o seu início date de mais de dez anos atrás. Entretanto, vasto campo de pesquisa se abre também para outros microorganismos, com o emprego de diferentes fluorocromos: assim, empregam-se:

- a auramina, sulfato de berberina e acridina para os bacilos da tuberculose e da lepra;
- a berberina, para tripanosomas e plasmódios;
- a coriofosfina, para o bacilo diftérico e esporos de bactérias;
- a tioflavina, resorcina e primulina, para corpúsculos elementares de vírus, haemoproteus e tripanosomas;
- o morin, rivanol e primulina, para espiroquetas e protozoários;
- o amarelo de acridina, para bactérias vivas, bactérias do solo e parasitas do sangue;
- a sulfoflavina brilhante, para esporos de bactérias.

Citamos apenas algumas aplicações na pesquisa de microorganismos, pois nos outros setores da biologia a fluoromicroscopia tem variadíssimas aplicações.

Entre nós, o Prof. KARL ARENS tem contribuído para a divulgação da fluoromicroscopia e suas aplicações nos diferentes ramos da biologia.

Em bacteriologia podemos usá-la nos diagnósticos rotineiros e na pesquisa. Com ela, novos horizontes se abrem aos biólogos pesquisadores. No diagnóstico, a sua técnica oferece certas vantagens de facilidade, rapidez e eficiência.

P. ELLINGER (8), do Lister Institute, no seu magnífico trabalho "Microscopia fluorescente em biologia" faz extensa explanação sobre as várias aplicações da fluorescência no campo das pesquisas biológicas, ressaltando os trabalhos de HAGEMANN e KELLER, referentes ao emprêgo da auramina como fluorócromo de escolha para o bacilo da tuberculose. Numerosas têm sido as publicações demonstrando as vantagens desse método no diagnóstico da tuberculose, e até a sua superioridade sobre os clássicos processos de coloração tipo Ziehl.

RICHARDS (14) demonstrou que a fluorescência evidencia mais bactérias ácido-álcool-resistentes do que a técnica de ZIEHL-NEESEN. Sendo o exame feito com objetiva seca, de grande aumento, é possível abranger maior campo do que com as objetivas de imersão, além da simplicidade no trabalho, e finalmente, o maior contraste entre os bacilos e outros elementos presentes no campo (HERMANN, 1939). Entretanto, observamos não ser possível distinguir entre as contaminações e os bacilos que, embora ácido-álcool-resistentes às anilinas, não se demonstrem fluorescentes.

Também BOGEN (4) fez estudos comparativos entre o método de coloração de ZIEHL e a fluoromicroscopia, dando para esta última uma positividade de 20% a mais do que para aquêle.

Embora haja autores, como KUSTER, que tenham encontrado mais de 40% de resultados positivos com a fluorescência do que com o método de ZIEHL, ela em absoluto não substitui a cultura ou inoculação, mesmo usando processos de homogeneização e centrifugação, que na realidade aumentaram a taxa de positividade sobre o exame direto por qualquer das colorações.

A fluoromicroscopia no diagnóstico da tuberculose apenas traz melhoria nos resultados fornecidos pela simples bacterioscopia, estando sujeita aos mesmos erros, mesmo quando positiva, em vista do elevado número de outras micobactérias que também se apresentam fluorescentes.

A propriedade que o bacilo da tuberculose tem, de emitir fluorescência quando tratado pela auramina e outros fluoróchromos, e de manter esta propriedade quando tratado pelo ácido-álcool e examinado em luz ultravioleta, foi por nós aproveitada no estudo de uma série de culturas de bacilos ácido-álcool-resistentes de diferentes espécies, variedades e amostras. Procuramos observar até que ponto esta propriedade se apresenta como peculiar ao gênero *Mycobacterium* e fixar as vantagens do método no que se refere à pesquisa de micobactérias em geral, e o seu possível aproveitamento na sistemática. Procuramos melhor esclarecer a citação de BERGEY: "a maior parte das bactérias

ácido-resistentes tratada com auramina fenicada e descorada com NaCl-HCl-álcool mostra fluorescência ao microscópio quando radiada por luz ultravioleta de longo comprimento de onda”.

As nossas observações nos permitem concluir que a ácido-álcool-resistência pelas anilinas não é paralela à observada com a auramina, pois verificámos culturas fortemente ácido-resistentes à fucsina e absolutamente desprovidas de fluorescência. Verificámos também que muitas culturas que eram fracamente ácido-resistentes, eram fracamente fluorescentes, e as partes mais intensamente coradas (granulações) emitem fluorescência mais intensa.

Conforme foi observado por KUESTER, e agora por nós confirmado, o método da fluorescência foi considerado bom para os bacilos da tuberculose e lepra, mas não em geral, para as bactérias ácido-resistentes.

Aparelhagem — Nos nossos trabalhos, utilizámos um conjunto que produz alta intensidade de luz, provido de condensador de quartzo e sistema ótico livre de fluorescência própria. A aparelhagem de fluorescência simplificada, segundo REICHERT, consta do seguinte:

- a) Microscópio, com condensador de imersão a óleo 1,40. Objetiva acromática seca 60, ajustada para preparados não cobertos com lamínula. Ocular Huygens 10x. Filtros U.V. para ocular, amarelos.
- b) Lâmpada de baixa voltagem, a vapor de mercúrio, para microscopia.
- c) Dois filtros azuis e um opaco, que permitem o seu uso como microscópio comum.

Inicialmente, na fluoromicroscopia eram usados filtros líquidos corados em azul e amarelo, obtidos com soluções de sulfato de cobre e cromatos, respectivamente. A fonte luminosa era de arco de carvão, cujos raios atravessavam a solução. Mais recentemente passaram a utilizar filtros de vidro e uma fonte luminosa constituída de lâmpada de filamento de tungstênio ou de vapor de mercúrio.

No aparelho que utilizámos, o filtro que seleciona a luz excitadora é composto de dois vidros azuis, ficando o fundo suficientemente escuro e as bactérias fluorescentes bem visíveis, pela interposição dos filtros entre a fonte luminosa e a lâmina que contém o material. Outro pequeno filtro, que deixa passar a luz amarela mas exclui comprimentos de onda mais curtos, é colocado acima da ocular, portanto, entre a lâmina e o olho do observador, protegendo-o contra os efeitos prejudiciais dos raios ultravioleta, além de excluir toda luz azul ou violeta visível, aumentando mais o contraste entre a luz amarela das bactérias fluorescentes e o fundo do campo.

Utilizámos óleo de sândalo, livre de fluorescência, para o condensador. A água destilada foi também usada por nós com ótimos resultados.

A aparelhagem merece cuidado especial no que se refere à iluminação, que deverá ser bem centrada e a focalização bem feita, pois

pequenos descuidos nesta parte poderão fornecer falsos resultados negativos. Foi sempre cuidado nosso iniciar os trabalhos de exame das preparações focalizando uma lâmina sabidamente positiva, dando assim um preparo conveniente ao aparelho.

Trabalhámos em sala escura, o que proporcionou maior segurança e comodidade nas observações microscópicas em grande número.

Método de trabalho — Coloração pela auramina fenicada, segundo HAGEMANN.

1. Espalhar a cultura numa lâmina de quartzo (vidro U.V.), não deixando que fiquem aglomerados de bacilos. Secar ao ar e fixar pelo calor.
2. Fluorocromar 10 minutos na mistura de auramina a 1/1.000
3. Lavar em água corrente.
4. Diferenciar 3 minutos na mistura:

| | |
|------------------------|--------------------|
| Álcool (70%) | 95 cm ³ |
| Ácido clorídrico | 3 cm ³ |
5. Lavar em água corrente, secar e examinar.

ARENS (1) recomenda que a solução de auramina seja feita com cuidados especiais, pois a sua durabilidade em soluções muito diluídas é curta nos climas tropicais. Propõe a seguinte técnica de preparo, usada por nós com resultados satisfatórios:

Solução A:

| | |
|-------------------------------|--------------------|
| Auramina | 0,5 g |
| Álcool etílico (90—95%) | 50 cm ³ |

Solução B:

| | |
|-------------------------------|--------------------|
| Ácido fênico líq. (90%) | 20 cm ³ |
| Água destilada | 480 " |

Para o preparo da solução final de auramina fenicada 1/1.000, misturar 1 parte da solução A e 9 partes da solução B. Filtrar e manter em refrigerador, onde se conserva até 2 semanas. A solução alcoólica de auramina conserva-se durante muito tempo em frasco neutro e escuro.

Focalização:

- a) inserir na lâmpada ambos os filtros azuis.
- b) colocar o filtro amarelo sôbre a ocular.
- c) colocar óleo de imersão ou água destilada sôbre a lente frontal do condensador para estabelecer contato ótico. Obtivemos melhores resultados não encostando o condensador na lâmina, e sim apenas fazendo contato através da água ou do óleo.

d) primeiramente, efetuar um exame panorâmico com objetiva 20 e ocular 10. Nos pontos suspeitos, realizar então um exame de detalhes com a objetiva 60.

As bactérias são vistas fluorescendo intensamente em côr de ouro sôbre fundo escuro. Quando se trata de verificar apenas a fluorescência em culturas, podemos usar diretamente a objetiva 60.

4. PROVA CITOQUÍMICA DE DUBOS

O problema da virulência das micobactérias quase que se resume na distinção entre o bacilo da tuberculose e os paratuberculosos que, segundo CALMETTE (5), é feita principalmente:

- a) pelo estudo dos seus produtos de secreção, ou seja, reações cruzadas de tuberculina.
- b) pelas reações de aglutinação com sôro de animais inoculados.
- c) pelas suas propriedades patogênicas.

Posteriormente surgiram outros caracteres diferenciais adotados para determinação da virulência de amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, um dos quais é aqui estudado em grande número de culturas de micobactérias de diferentes procedências.

Foi observado por MIDDLEBROOK e colaboradores, que o bacilo tuberculoso virulento cresce na superfície dos meios líquidos e sólidos, de maneira a permanecerem em disposição paralela, formando cordões. Esta disposição é atribuída a fatores físicos e químicos: no primeiro caso, à carga elétrica diferente nos bacilos virulentos e avirulentos, e no segundo, a um fator químico que faz com que os bacilos se tornem aderentes.

DUBOS tem dedicado especial atenção à estrutura celular do bacilo da tuberculose, estabelecendo ligações com a sua virulência.

Outro teste de virulência surgiu posteriormente e foi observado por BLOCH (3), que é a ação dos bacilos virulentos sôbre os leucocitos. Os bacilos virulentos, quando inoculados na cavidade peritoneal de animais de laboratório, ainda que fagocitados pelos leucocitos polimorfonucleares, continuam a se multiplicar, não havendo, portanto, a sua remoção total. Depois, êle provou "in vitro" que tal fato era devido à capacidade de os bacilos virulentos impedirem a migração dos leucocitos, o que não se verificava com as amostras avirulentas. Parece haver uma relação entre estas reações, tôdas elas ligadas à composição química dos bacilos tuberculosos virulentos e avirulentos: a disposição em cordões, o efeito leucotóxico e a reação citoquímica para virulência.

Já na fase final do nosso trabalho, chegou-nos às mãos a publicação de HAUDUROY e POSTERNAK (11) sôbre a reação citoquímica em relação com a virulência das micobactérias. Verificámos então a concordância dos nossos resultados com os daqueles pesquisadores.

São as seguintes as conclusões a que chegaram:

- a) as Micobactérias, produzindo uma tuberculose experimental típica, dão sempre a reação de DUBOS fortemente positiva.
- b) as Micobactérias, não produzindo tuberculose experimental, dão reações nitidamente negativas.

E' portanto, graças à reação de DUBOS, possível diferenciar rapidamente as micobactérias avirulentas, mesmo dentro das espécies de *Mycobacterium tuberculosis*, como observou êle nas amostras H37Rv (virulenta) e H37Ra (avirulenta), a primeira dando viragem ao vermelho-púrpura e a segunda para o amarelo.

Observámos que o teste de virulência, quando feito com o *Mycobacterium tuberculosis*, não se altera, quer em culturas mortas quer em culturas antigas de mais de 5 anos.

De uma maneira geral, as micobactérias virulentas, quando são *Mycobacterium tuberculosis*, dão sempre resultados positivos. O mesmo não acontece com as micobactérias de animais de sangue frio, que dão resultados negativos, sendo, entretanto, muito variáveis os resultados nas micobactérias de alguns dos grupos examinados por nós, e cuja apreciação e interpretação requerem um estudo mais completo destas culturas, de caracteres tão exóticos.

Foi a seguinte a técnica por nós usada para a reação de DUBOS:

- 1 — Tomar culturas de micobactérias cultivadas em meios sólidos ou líquidos (Loewenstein, agar glicerinado, caldo glicerinado, Dorset sintético, etc.)
- 2 — Em tubos de hemólise, colocar 1 cm³ de álcool metílico a 50%, para retirar substâncias estranhas às bactérias que possam mascarar as reações.
- 3 — Colocar uma alça bem cheia da cultura em meio sólido ou usar o sedimento das culturas em meio líquido.
- 4 — Depois de agitação vigorosa, para lavar as bactérias em suspensão, colocar na estufa a 37°, por tempo superior a uma hora.
- 5 — Centrifugar, desprezar o sobrenadante e colocar nova quantidade de álcool metílico a 50%, seguida de novo tempo na estufa e agitação.
- 6 — Centrifugar, desprezar o sobrenadante e supender a cultura em uma solução tampão alcalina. A recomendada pelos autores é a seguinte: Solução de cloreto de sódio a 5% e barbiturato de sódio a 1%.
- 7 — Juntar uma pequena quantidade de solução aquosa de vermelho neutro (usámos uma gôta da solução a 0,5%) e deixar à temperatura ambiente. Dada a elevada alcalinidade da solução (pH 9.0), o líquido passa imediatamente do vermelho ao amarelo. Entre 5 e 30 minutos, os bacilos em suspensão na mistura se coram de vermelho, se são virulentos, e de amarelo, se são avirulentos.

Nova solução tampão:

Para substituir a solução tampão recomendada por DUBOS, que oferece certos inconvenientes — entre os quais o fato de o barbiturato de sódio, sendo entorpecente, estar sujeito à fiscalização das autoridades sanitárias e, portanto, não poder ser obtido com facilidade — e seguindo a própria recomendação dos autores, que mandam usar um

outro tampão alcalino, resolvemos, com a colaboração do químico MOACYR ANDRADE, do I.O.C., experimentar outros tampões alcalinos. Chegámos então à conclusão de que o tampão de borato (tampão Politzsch) satisfaz perfeitamente. Realizámos várias reações positivas e negativas, comparativamente com os dois tampões (de barbiturato e de borato) tendo havido perfeita concordância de resultados.

E' o seguinte o tampão utilizado:

Solução A:

Ácido bórico 1/5 M: Pesar 12,368 g da substância e diluir a 1.000 cm³, com água destilada.

Solução B:

Borato de sódio 1/20 M: Pesar 19,071 g do sal e diluir a 1.000 cm³ de água destilada.

Para preparar o tampão, misturar:

| | |
|------------------------|----------|
| Solução A | 1 parte |
| Solução B | 9 partes |
| Cloreto de sódio | 5% |

O pH final da solução deverá estar em torno de 9.0.

A leitura da reação é quase imediata. O depósito de bactérias toma coloração que varia do vermelho intenso (++) , róseo (+) ao amarelo (—), em contraste com o líquido sobrenadadamente, que fica sempre amarelo.

5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentaremos os nossos resultados em tabelas e quadros, assim organizados:

QUADRO 1

FLUOROMICROSCOPIA E TESTE DE VIRULÊNCIA EM VÁRIAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

| N.º da cultura | N.º da coleção | Coleção | Espécies | Fluorescência | Teste de Virulência |
|----------------|----------------|-----------|---|---------------|---------------------|
| 40 | 8.236 | A.T.C.C. | <i>M. tuberculosis, hominis</i> | ++ | ++ |
| 37 | 9.805 | A.T.C.C. | <i>M. tuberculosis, bovis</i> | ++ | ++ |
| 38 | 7.992 | A.T.C.C. | <i>Mycobacterium avium</i> | + | — |
| — | — | — | <i>Mycobacterium leprae</i> | ++ | ? |
| — | — | — | <i>Mycobacterium lepraemurium</i> | ++ | ? |
| 42 | 110 | Hyg. Lab. | <i>Mycobacterium ranæ</i> (C. W. MacCoy) | — | — |
| 36 | 10.142 | A.T.C.C. | <i>Mycobacterium phlei</i> | ++ | — |
| 41 | 35 | A.T.C.C. | <i>Mycobacterium berolinensis</i> | + | — |
| 189 | 30 | Carville | <i>Mycobacterium piscium</i> | — | — |
| 197 | 58 | Carville | <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> | — | — |
| — | — | — | <i>Mycobacterium spp.</i> (diversas)..... | + e — | + e — |

Nêste quadro, apresentamos uma visão de conjunto das 10 espécies de micobactérias examinadas, num total de 123 amostras. Apenas, como é óbvio, fizemos fluoromicroscopia direta em material humano e de rato, para *Mycobacterium leprae* e *M. lepraemurium*, tendo ambas as espécies se revelado fortemente fluorescentes à auramina, podendo admitir-se idêntica vantagem do microscópio fluorescente sôbre as colorações de ZIEHL no diagnóstico da lepra, como já tem sido comprovado por outros pesquisadores, no que se refere à tuberculose.

As 30 amostras de *Mycobacterium tuberculosis* deram fluorescência e reação de DUBOS fortemente positivas, confirmando os resultados de DUBOS com 22 amostras, e de HAUDUROY, com 58. Apenas as micobactérias de animais de sangue frio (*ranae* e *piscium*) revelaram-se negativas à fluorescência, sendo que as amostras de *Mycobacterium avium*, *berolinensis* e *phlei* demonstram fluorescência positiva e reação de DUBOS negativa. Recebemos de Carville a amostra n.º 58 com a denominação de *Mycobacterium paratuberculosis*. Entretanto, não pudemos esclarecer se se trata do bacilo de JOHNE. Esta cultura deu fluorescência e reação de DUBOS negativas.

As 89 amostras de micobactérias que não comportavam classificação por espécies (paratuberculosos) deram resultados variáveis, confirmando, portanto, as conclusões de HAUDUROY em 67 paratuberculosos. Ele encontrou 4 amostras positivas ao teste de virulência, com poder patogênico anormal para cobaios.

A amostra B.C.G. examinada por HAUDUROY deu reação fracamente positiva ao teste de virulência.

QUADRO 2

FLUOROMICROSCOPIA E TESTE DE VIRULÊNCIA. RESULTADOS DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS POR GRUPOS

| Nº DA TABELA | Micobactérias | F+V+ | F+V- | F-V+ | F-V- | Tot. | Percent. |
|-------------------------|---|--------------|--------------|-----------|--------------|------------|---------------|
| 1 | M. tuberculosis, hominis e bovis..... | 30 | 0 | 0 | 0 | 30 | 24.2% |
| 2 | Mic. cromogênicas do escarro..... | 0 | 9 | 0 | 1 | 10 | 8.6% |
| 3 | Mic. de lepra humana..... | 6 | 19 | 0 | 6 | 31 | 25.3% |
| 4 | Mic. de hematófagos exp inf. em lep.... | 10 | 3 | 0 | 5 | 18 | 14.6% |
| 5 | Mic. de lepra murina..... | 2 | 5 | 0 | 1 | 8 | 6.2% |
| 6 | Mic. de animais de sangue frio..... | 0 | 9 | 0 | 3 | 12 | 9.8% |
| 7 | Mic. de efluentes de fossas..... | 6 | 1 | 0 | 2 | 9 | 7.3% |
| 8 | Mic. de pós de aposentos de leproso.... | 4 | 1 | 0 | 0 | 5 | 4.0% |
| TOTAIS..... | | 58 | 47 | 0 | 18 | 123 | 100.0% |
| Percentuais..... | | 47.1% | 38.2% | 0% | 14.7% | — | — |

Das 123 culturas examinadas, em 58 ambos os testes deram positivos; apenas 30 eram de bacilos da tuberculose. 47 tiveram a fluorescência positiva e o teste de virulência negativo, das quais 19 eram de micobactérias isoladas de lesões leprosas. Não se verificaram testes de virulência positivos em culturas não fluorescentes. Em 18 culturas ambos os testes foram negativos.

QUADRO 3

FLUOROMICROSCOPIA E TESTE DE VIRULÊNCIA. PERCENTUAIS DOS RESULTADOS DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS POR GRUPOS

| N.º DA TABELA | Micobactérias | F+V+ | F+V- | F-V+ | F-V- |
|---------------|---|------|------|------|------|
| 1 | M. tuberculosis, hominis e bovis..... | 100% | 0% | 0% | 0% |
| 2 | Mic. cromogênicas de escarro..... | 0% | 90% | 0% | 10% |
| 3 | Mic. de lepra humana..... | 19% | 62% | 0% | 19% |
| 4 | Mic. de hematófagos exp. inf. em leprosos.. | 55% | 17% | 0% | 28% |
| 5 | Mic. de lepra murina..... | 25% | 62% | 0% | 13% |
| 6 | Mic. de animais de sangue frio..... | 0% | 75% | 0% | 25% |
| 7 | Mic. de efluentes de fossas..... | 66% | 11% | 0% | 23% |
| 8 | Mic. de pós de aposentos de leprosos..... | 80% | 20% | 0% | 0% |

No quadro 3, apresentamos os percentuais referentes ao quadro 2. De 47% das culturas em que ambas as reações deram positivas, convém ressaltar que apenas 24% do total foi identificado como sendo *Mycobacterium tuberculosis* e, portanto, com os resultados positivos esperados. Dos demais grupos, apenas nos efluentes de fossas terá sido possível e provável o isolamento do *Mycobacterium tuberculosis*, o qual representa apenas 7% do total das culturas examinadas. 38% das culturas deu fluorescência positiva e virulência negativa. Apenas cerca de 14% teve ambas as reações negativas. Tal percentual pode ser interpretado como sendo a fluorescência um característico independente da ácido-álcool-resistência revelada pelas anilinas e comumente observada pelas colorações tipo Ziehl.

QUADRO 4

FLUOROMICROSCOPIA E TESTE DE VIRULÊNCIA. RESULTADOS DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS, ISOLADAMENTE

| N.º DA TABELA | Micobactérias | F+ | F- | V+ | V- |
|---------------|---|------------|------------|------------|------------|
| 1 | M. tuberculosis, hominis e bovis..... | 30 | 0 | 30 | 0 |
| 2 | Mic. cromogênicas de escarro..... | 9 | 1 | 0 | 10 |
| 3 | Mic. de lepra humana..... | 25 | 6 | 6 | 25 |
| 4 | Mic. de hematófagos exp. inf. em leprosos.. | 13 | 5 | 10 | 8 |
| 5 | Mic. de lepra murina..... | 7 | 1 | 2 | 6 |
| 6 | Mic. de animais de sangue frio..... | 9 | 3 | 0 | 12 |
| 7 | Mic. de efluentes de fossas..... | 7 | 2 | 6 | 3 |
| 8 | Mic. de pós de aposentos de leprosos..... | 5 | 0 | 4 | 1 |
| | TOTAIS | 105 | 18 | 58 | 65 |
| | Percentuais | 85% | 15% | 47% | 53% |

Apreciando os resultados separadamente, observamos no quadro 4 que 85% das culturas deu fluorescência positiva e 15%, negativa. Quanto ao teste de virulência, em 47% deu positivo e em 53%, negativo.

QUADRO 5

FLUOROMICROSCOPIA E TESTE DE VIRULÊNCIA. PERCENTUAIS DOS RESULTADOS DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS, ISOLADAMENTE

| N.º DA TABELA | Micobactérias | F + | F — | V + | V — |
|---------------|--|------|-----|------|------|
| 1 | M. tuberculosis, hominis e bovis..... | 100% | 0% | 100% | 0% |
| 2 | Mic. cromogênicas de escarro..... | 90% | 10% | 0% | 100% |
| 3 | Mic. de lepra humana..... | 80% | 20% | 20% | 80% |
| 4 | Mic. de hematófagos exp. inf. em leproso.. | 77% | 23% | 55% | 45% |
| 5 | Mic. de lepra murina..... | 87% | 13% | 25% | 75% |
| 6 | Mic. de animais de sangue frio..... | 75% | 25% | 0% | 100% |
| 7 | Mic. de efluentes de fossas..... | 77% | 23% | 66% | 34% |
| 8 | Mic. de pós de aposentos de leproso..... | 100% | 0% | 80% | 20% |

Por êste quadro, verificamos que apenas o grupo de *Mycobacterium tuberculosis hominis e bovis* deu 100% de positividade em ambos os testes, e que êste grupo representa 24% do total das amostras examinadas. Os percentuais de positividade encontrados nas micobactérias isoladas de leproso através de hematófagos foram de 77 e 55% respectivamente, para a fluorescência e virulência. O teste de virulência foi negativo em 100% das culturas cromogênicas isoladas de escarro e nas de animais de sangue frio. O fato de encontrarmos vários graus de positividade no teste de virulência fora do grupo constituído pelo *M. tuberculosis*, impede que consideremos o teste de virulência como característico da espécie. Nas micobactérias isoladas de efluentes de fossas e terra de aposentos, nas quais possivelmente existirão bacilos da tuberculose, encontramos respectivamente, 66% e 80% de testes positivos.

QUADRO 6

FLUOROMICROSCOPIA E TESTE DE VIRULÊNCIA. RESULTADOS DAS CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS QUANTO AO PIGMENTO E INTENSIDADE DAS COLORAÇÕES DE ZIEHL, FLUORESCÊNCIA E TESTE DE VIRULÊNCIA

| N.º DA TABELA | Micobactérias | Pigm. | | Ziehl | | Fluoresc. | | | Virulência | | |
|---------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | | + | — | ++ | + | ++ | + | — | ++ | + | — |
| 1 | M. tuberculosis, hominis e bovis..... | 0 | 30 | 30 | 0 | 30 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 |
| 2 | Mic. cromogênicas de escarro | 10 | 0 | 2 | 8 | 6 | 3 | 1 | 0 | 0 | 10 |
| 3 | Mic. de lepra humana..... | 27 | 4 | 12 | 19 | 15 | 10 | 6 | 0 | 6 | 25 |
| 4 | Mic. de hematófagos exp. inf. leproso..... | 10 | 8 | 11 | 7 | 7 | 6 | 5 | 4 | 6 | 8 |
| 5 | Mic. de lepra murina..... | 4 | 4 | 3 | 5 | 4 | 3 | 1 | 2 | 0 | 6 |
| 6 | Mic. de animais de sangue frio | 3 | 9 | 5 | 7 | 2 | 7 | 3 | 0 | 0 | 12 |
| 7 | Mic. de efluentes de fossas.. | 3 | 6 | 6 | 3 | 4 | 3 | 2 | 6 | 0 | 3 |
| 8 | Mic. de pós de aposentos de leproso..... | 1 | 4 | 3 | 2 | 3 | 2 | 0 | 3 | 1 | 1 |
| | TOTAIS..... | 58 | 65 | 72 | 51 | 71 | 34 | 18 | 45 | 13 | 65 |
| | Percentuais..... | 47 | 53 | 58 | 42 | 57 | 27 | 16 | 36 | 10 | 54 |

A questão do pigmento e da intensidade das reações (coloração de ZIEHL, fluorescência e virulência) foi por nós observada. Assim, 47% das culturas examinadas revelou cromogênicidade. Quanto à coloração de ZIEHL, também notámos que a intensidade de coloração não é a mesma e parece ter certa relação com a intensidade da fluorescência, embora não seja absoluta esta concordância. 58% das culturas demonstrou forte ácido-resistência ao Ziehl, enquanto que os outros 42% o foram de bacilos pouco corados. Apenas 57% das culturas revelou forte fluorescência, 27%, fraca fluorescência ou apenas grânulos fluorescentes, e 16% não se mostrou fluorescente. No que se refere ao teste de virulência, 36% deu reação forte, 10%, fraca e 54%, negativa.

Análise dos resultados por grupos de culturas

Criámos os seguintes sinais para determinação da intensidade das colorações de ZIEHL, da fluorescência e do teste de virulência.

- (++) coloração ou reação fortemente positiva
 (+) coloração ou reação fracamente positiva
 (—) coloração ou reação negativa

TABELA 1

CULTURAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, VARIEDADES *HOMINIS* E *BOVIS*, EXAMINADOS PELA FLUOROMICROSCOPIA E PROVA DE DUBOS PARA VIRULÊNCIA. (30 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | Identificação | Fluor. | Virul. |
|---|--|--------|--------|
| <i>Mycobacterium tuberculosis, hominis</i> | | | |
| 4 | Amostra Ratti das coleções IOC e LCT..... | ++ | ++ |
| 28 | N.º 15.959, do Laboratório Central de Tuberculose... | ++ | ++ |
| 30 | C.M. » » » » » ... | ++ | ++ |
| 31 | — » » » » » ... | ++ | ++ |
| 40 | N.º 8.236 da A.T.C.C. (amostra H37 do N.I.H.)..... | ++ | ++ |
| 155 | A.A. de escarro de leproso, isolada por S.A..... | ++ | ++ |
| 156 | M.R. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 157 | A.S. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 158 | R.T. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 159 | A.L. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 160 | V.C. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 161 | C.A. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 162 | A.P. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 163 | F.F.G. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 169 | G.V. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 171 | D.S. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 173 | Min. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 174 | A.G. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 175 | C.S. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 186 | J.P.S. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 188 | G.R. » » » » » » » | ++ | ++ |
| 187 | G.S. » » » » » » » | ++ | ++ |

TABELA 1 (conclusão)

CULTURAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, VARIEDADES *HOMINIS* E *BOVIS*, EXAMINADOS PELA FLUOROMICROSCOPIA E PROVA DE DUBOS PARA VIRULÊNCIA. (30 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | Identificação | Fluor. | Virul. |
|--|--|--------|--------|
| 176 | amostra cedida pelo Dr. A. CURY, do I.O.C..... | ++ | ++ |
| 209 | amostra da coleção do I.O.C..... | ++ | ++ |
| 210 | amostra da coleção do I.O.C..... | ++ | ++ |
| Mycobacterium tuberculosis, bovis | | | |
| 2 | amostra Vallée das coleções do I.O.C. e L.C.T..... | ++ | ++ |
| 37 | N.º 9.805 da A.T.C.C..... | ++ | ++ |
| 179 | do Instituto de Biologia Animal do M.A..... | ++ | ++ |
| 196 | N.º 11 da coleção Carville..... | ++ | ++ |
| 180 | do Instituto de Biologia Animal do M.A..... | ++ | ++ |

Tabela 1 — apresentamos os resultados de 30 culturas, sendo 25 de *Mycobacterium tuberculosis*, variedade *hominis* e 5 da variedade *bovis*, inclusive a conhecida amostra H37 que foi também examinada por DUBOS no seu trabalho original, juntamente com 22 culturas.

Estas culturas apresentaram-se não cromogênicas, puras, com a ácido-álcool-resistência controlada pela coloração de ZIEHL. Sobre a fluorescência em culturas de micobactérias, não conseguimos consultar bibliografia; somente em material de exame direto para diagnóstico da tuberculose. Todas as culturas demonstraram-se fortemente fluorescentes à auramina e deram reação citoquímica para virulência também fortemente positiva. Das 123 culturas examinadas, as de *Mycobacterium tuberculosis* representam 24%.

TABELA 2

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS CROMOGÊNICAS ISOLADAS DE ESCARRO. (10 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|-----------------------------|--|----------|-------|--------|--------|
| Culturas do Lab. C. de Tub. | | | | | |
| 35 | 4.131 — cedida pelo Dr. F. MAGARÃO.... | amarelo | ++ | + | — |
| 99 | 19.913 — » » » | » | + | ++ | — |
| 100 | 19.906 — » » » | » | + | + | — |
| 101 | 19.967 — » » » | » | + | — | — |
| 128 | 4.637 — » » » | » | + | ++ | — |
| 129 | 20.317 — » » » | » | + | ++ | — |
| 130 | 20.321 — » » » | » | + | ++ | — |
| 29 | — — cedida pelo Dr. R. LAGOA..... | » | + | + | — |
| 44 | I.M. — cedida pelo Dr. G. PACHECO..... | » | ++ | ++ | — |
| 45 | H.S. — cedida pelo Dr. G. PEREIRA..... | » | + | ++ | — |

A tabela 2 consta dos resultados de 10 culturas cromogênicas isoladas de escarro, em sua maioria fornecidas pelo Dr. FONTES MAGARÃO, Chefe do Laboratório Central de Tuberculose da Prefeitura do Distrito Federal. Notamos que apenas duas foram fortemente ácido-álcool resistentes ao Ziehl, três, fracamente fluorescentes e duas, negativas. Em tôdas o teste de virulência deu negativo. Eram culturas cujos caracteres culturais apenas, seriam suficientes para distingui-las do bacilo da tuberculose.

Tabela 3 — Consiste nos resultados de 30 culturas de Micobactérias isoladas diretamente de leprosos, das quais 18 são de coleções clássicas (A.T.C.C., Lister Institute, N.I.H. e Carville). As demais nos foram cedidas pelo Dr. SOUZA ARAÚJO, algumas das quais por êle isoladas (17-18-19). Das 30 culturas, em apenas 6 o teste de virulência deu

TABELA 3

MICROBACTÉRIAS ISOLADAS DIRETAMENTE DE LEPROSOS (30 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|----------------|-------------------------------------|----------|-------|--------|--------|
| 21 | 509 — do Inst. Lister — lesão..... | tijolo | + | ++ | — |
| 23 | 510 — » » » — » | laranja | + | + | — |
| 134 | 511 — » » » — » | amarelo | + | + | — |
| 135 | 512 — » » » — » | amarelo | + | — | — |
| 18 | 514 — » » » — » | tijolo | + | ++ | — |
| 194 | 515 — » » » — » | amarelo | + | + | — |
| 166 | 516 — » » » — » | amarelo | + | ++ | — |
| 15 | 517 — » » » — » | amarelo | + | — | — |
| 12 | 518 — » » » — » | tijolo | + | + | — |
| 168 | 519 — » » » — » | amarelo | + | — | — |
| 17 | 521 — » » » — » | amarelo | + | + | — |
| 19 | 522 — » » » — » | tijolo | + | — | — |
| 22 | 4243 — A.T.C.C. — » | amarelo | + | + | — |
| 51 | 362 — N.I.H. — » | creme | + | + | — |
| 154 | 771 — N.I.H. — » | s/pig. | + | + | — |
| 195 | 130 — Carville — » | amarelo | + | + | — |
| 198 | 112 — » — » | amarelo | + | — | — |
| 59 | 2A — da col. M. Rivas — hemoc..... | laranja | ++ | ++ | + |
| 60 | 9A — » » » — » | laranja | ++ | ++ | + |
| 69 | 2B — » » » — » | amarelo | ++ | — | — |
| 84 | 17E — » » » — ossos..... | s/pig. | ++ | ++ | — |
| 46 | “Hecke” » » S. Araujo — lesão..... | s/pig. | ++ | ++ | — |
| 47 | “José” » » » — » | amarelo | ++ | ++ | — |
| 48 | “Chaves” » » » — » | amarelo | ++ | ++ | — |
| 49 | “Emília” » » » — » | amarelo | ++ | ++ | — |
| 151 | A.A. » » » — escarro..... | amarelo | ++ | ++ | + |
| 152 | C.S. » » » — » | amarelo | ++ | ++ | + |
| 153 | J.P.S. » » » — » | amarelo | + | ++ | — |
| 56 | — — isol. por J.M.C. — lesão..... | amarelo | + | + | — |
| 61 | 14A — da col. M. Rivas — hemoc..... | amarelo | ++ | ++ | + |
| 199 | 8A — » » » — medula..... | amarelo | ++ | ++ | + |

fracamente positivo, sendo que 4 da coleção MUNOZ RIVAS. Conseguimos esclarecer que nas culturas 151 e 152, cromogênicas, isoladas por SOUZA ARAÚJO, houve concomitância de crescimento com o bacilo da tuberculose, certamente responsável pela reação de virulência fracamente positiva.

Estas reações positivas em absoluto não se confundem com as reações características do bacilo da tuberculose. Quanto à fluorescência, encontramos 11 com fraca fluorescência, isto é, apenas grânulos fluorescentes ou bacilos com intensidade de fluorescência mais fraca do que a do bacilo da tuberculose. Seis deram fluorescência negativa. Tivemos ocasião de examinar amostras de várias culturas de micobactérias depois de passagens em animais ou de sofrerem numerosas repicagens. Da cultura 46 examinámos 15 amostras, sem que houvesse notáveis diferenças de resultados. Da cultura 47 examinámos 6 amostras e da 48, 25. Nestas duas últimas culturas, notámos alguns resultados discordantes, mas não pudemos concluir se são devidos a algum fator específico, se ligados à idade da cultura ou se ao animal de passagem. Na verdade, algumas dessas culturas são patogênicas para animais de laboratório e talvez que êste teste dê também reações fracamente positivas nas micobactérias dêste tipo.

No grupo dos paratuberculosos, também observámos discordância entre a fluorescência e a coloração de ZIEHL, não só em amostras diferentes como na mesma amostra em várias repicagens, mas não sabemos se está ou não ligada à idade da cultura, como já foi observado para a coloração de ZIEHL (CALMETTE, pg. 183).

Tudo leva a crêr que o mecanismo de impregnação das anilinas e dos fluoróchromos seja idêntico, através das substâncias lipóídicas da superfície dos bacilos.

Na tabela 4 apresentamos 18 culturas isoladas de hematófagos experimentalmente infetados em leprosos. Nêste grupo, os resultados foram mais extraordinários, pois encontramos 10 culturas com o teste de virulência positivo, das quais 4 fortemente positivos e facilmente confundíveis com os testes feitos com as culturas de *Mycobacterium tuberculosis*. Das 7 culturas com teste de DUBOS negativo, 4 revelaram-se negativas à fluorescência. As reações positivas eram, em sua maioria, procedentes da coleção RIVAS, não cromogênicas, e foram isoladas de pulgas experimentalmente infetadas em leprosos. Idêntico achado foi feito por HAUDUROY e POSTERNAK em recente trabalho, com uma amostra da mesma procedência e também isolada de pulga. Não notámos, entretanto, grande diferença na intensidade destas reações e as encontradas com as culturas de bacilos da tuberculose, que permitiu àquêles pesquisadores estabelecerem uma anotação especial, (+++). Naturalmente que êstes achados requerem um estudo mais cuidadoso destas culturas, para que possamos concluir sôbre a sua virulência para animais de laboratório ou mesmo para o homem, e assim interpretarmos esta positividade da reação de DUBOS em culturas não rotuladas, como do bacilo da tuberculose.

TABELA 4

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS ISOLADAS DE HEMATÓFAGOS EXPERIMENTALMENTE INFETADOS EM LEPROSOS (18 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------|-------|--------|--------|
| 25 | 9033 | — ATCC — de A. cayennense... | amarelo | + | + | — |
| 26 | 9034 | — » — » ... | amarelo | + | + | — |
| 27 | 9035 | — » — de B. microplus... | tijolo | + | + | — |
| 114 | IV | — S.A. — de B. microplus... | amarelo | + | + | + |
| 147 | VI | — » — de T. infestans... | amarelo | ++ | — | — |
| 85 | 30E(52) | — M.R. — de larvas de pulgas | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 86 | 31E | — » — » » » » | amarelo | ++ | ++ | ++ |
| 87 | 32E(53) | — » — » » » » | s/pig. | ++ | ++ | + |
| 88 | 33E(54) | — » — » » » » | s/pig. | ++ | ++ | + |
| 89 | 34E | — » — » » » » | s/pig. | ++ | + | + |
| 90 | 35E(55) | — » — » » » » | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 91 | 36E(56) | — » — » » » » | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 94 | IG | — » — » » » » | s/pig. | ++ | — | — |
| 96 | C.P.5 | — » — » » » » | s/pig. | ++ | — | — |
| 122 | P.T. III | — Rossell — de culicídeo(15-16).. | amarelo | ++ | + | + |
| 124 | Sta. Fé | — » — » » » .. | amarelo | + | — | — |
| 126 | Sobrinho | — » — » » » .. | amarelo | + | — | — |
| 127 | P—E.T. | — » — » » » .. | amarelo | + | ++ | + |

TABELA 5

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS OBTIDAS DE RATOS COM LEPRO MURINA (8)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|----------------|--------------------------------|----------------------------------|----------|-------|--------|--------|
| 54 | 366 | — N.I.H. am. Rat I A.M.S..... | laranja | + | + | — |
| 10 | 368 | — N.I.H..... | tijolo | ++ | + | — |
| 50 | 68 | — A.T.C.C. — Rat MacCoy..... | cromog. | + | + | — |
| 5 | St.I | — isolada por Souza Araujo | tijolo | + | ++ | — |
| 107 | St.II | — » » » | s/pig. | + | ++ | — |
| 6 | St.III | — » » » | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 7 | St.IV | — » » » | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 58 | | — isolada por J. M. Gomes..... | creme | + | — | — |

Das 8 culturas de rato com lepra murina, encontramos, em duas isoladas por SOUZA ARAÚJO, o teste de virulência fortemente positivo. Tais culturas, inoculadas em cobaias, não produziram lesões tuberculosas. Estas culturas revelaram-se fortemente fluorescentes e não cromogênicas.

TABELA 6

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS OBTIDAS DE ANIMAIS DE SANGUE FRIO, DIRETAMENTE OU COM AJUDA DE CARRAPATOS. (12 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|------------------------------|---|----------|-------|--------|--------|
| 42 | 110 — Myc. ranae Hyg. Lab. (McCoy)..... | s/pig. | + | — | — |
| 177 | M. giae — isol. por Darzins..... | s/pig. | + | + | — |
| Coleção Souza Araujo— | | | | | |
| 136 | de Bufo marinus com A. rotundatum..... | s/pig. | + | — | — |
| 137 | Idem de Nova Iguassú I — J.V..... | amarelo | ++ | + | — |
| 138 | Idem Museu Nacional — J.C..... | amarelo | + | ++ | — |
| 139 | Idem..... | tijolo | ++ | ++ | — |
| 140 | Idem Nova Iguassú II..... | s/pig. | ++ | ++ | — |
| 141 | Idem Pavuna II..... | s/pig. | ++ | + | — |
| 185 | Idem Pavuna I..... | s/pig. | + | + | — |
| 142 | de Bufo crucifer com A. rot. M.N..... | s/pig. | + | + | — |
| 143 | de giboia com A. rotundatum..... | s/pig. | + | + | — |
| 184 | de Bufo marinus com A. cayennense..... | s/pig. | + | + | — |

As 12 culturas isoladas de animais de sangue frio, com a ajuda de carrapatos, revelaram-se negativas ao teste de virulência. Essas culturas em sua maioria demonstraram-se não cromogênicas e com fraca fluorescência ou fluorescência negativa, uma vez que apenas 3 deram fluorescência fortemente positiva.

TABELA 7

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS ISOLADAS DE EFLUENTES DE FOSSA (9 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|-----------------------------|--------------------------------------|----------|-------|--------|--------|
| Coleção Souza Araujo | | | | | |
| 125 | Amostra Sanatório Padre Bento 3..... | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 148 | » Hosp Col. Curupaity I..... | s/pig. | + | + | ++ |
| 118 | » » » II..... | s/pig. | + | + | ++ |
| 119 | » Sanatório Padre Bento 1..... | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| Coleção Muñoz Rivas | | | | | |
| 64 | do Leprocomio Agua de Dios..... | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 65 | de Ibagui N.º 7..... | amarelo | ++ | + | — |
| 66 | amostra 17 de Ibagui N.º 8..... | amarelo | ++ | ++ | ++ |
| 67 | de Bogotá N.º 1..... | amarelo | + | — | — |
| 206 | Hosp. S. Carlos..... | s/pig. | ++ | — | — |

Tabela 7 — Também no grupo de 9 culturas isoladas de efluentes de fossas, encontramos 6 com reação de DUBOS positiva. É muito provável que algumas, ou todas elas, sejam de *Mycobacterium tuberculosis* não só pelo aspecto das culturas — não cromogênicas e fortemente fluorescentes — como pela viabilidade do isolamento desse germe nos efluentes de fossa.

TABELA 8

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS ISOLADAS DE TERRA DE LEPROSARIO (PÓ DE APOSENTOS). COLEÇÃO MUÑOZ RIVAS — COLÔMBIA. (5 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | N.º da coleção — Identificação | Pigmento | Ziehl | Fluor. | Virul. |
|----------------|------------------------------------|----------|-------|--------|--------|
| 76 | 4E(32) — Lep. Contratacion—24..... | amarelo | ++ | ++ | ++ |
| 77 | 5E(60) — » » —29..... | s/pig. | ++ | ++ | ++ |
| 79 | 9E — » » —41..... | s/pig. | + | ++ | ++ |
| 95 | 2G — | s/pig. | + | + | + |
| 203 | (61) — » » — | s/pig. | ++ | + | — |

A Tabela 8 consta de bactérias isoladas de terras colhidas em aposentos de leprosos, por MUÑOZ RIVAS. Não temos maiores informes sobre estas culturas. Entretanto, não nos parece fora de cogitação que as 4 culturas que deram reação positiva possam ser de bacilo da tuberculose. Apenas uma com pigmento amarelo, deu teste de virulência negativo.

Num grupo de 21 culturas recebidas recentemente da coleção MUÑOZ RIVAS, de diversas procedências, apenas nos foi possível fazer o coloração de ZIEHL e a fluorescência, pois o seu crescimento não comportava a reação de DUBOS, que requer uma regular massa de cultura. Destas, 8 foram fortemente fluorescentes, 4 fracamente e 9 negativas, o que mais uma vez confirma que nem sempre estão em concordância a ácido-álcool-resistência verificada pelas anilinas e pela auramina.

Já na fase final do nosso trabalho, examinámos duas amostras, Nos. 81 e 83, isoladas por RIVAS, de ossos de pessoas normais, as quais demonstraram-se fortemente fluorescentes e com a reação de virulência fortemente positiva. Também a amostra 204, de artrópodos, deu reação de virulência fraca. Outros testes negativos foram obtidos nas culturas 74, de galináceos, 202, de rãs, e 208, de môsca sugadora.

TABELA 9

CULTURAS DE MICOBACTÉRIAS DE DIVERSAS PROCEDÊNCIAS, NAS QUAIS
NÃO FOI POSSÍVEL SER FEITO O TESTE DE DUBOS.
COLEÇÃO MUNOZ RIVAS. (21 CULTURAS)

| N.º DA CULTURA | Ref. da coleção — Identificação | Ziehl | Fluor. |
|----------------|---|-------|--------|
| 62 | 15A(12) — de hemocultura de leproso..... | ++ | ++ |
| 63 | 20A(16) — de ossos de leproso..... | ++ | + |
| 201 | (51) — de gânglio mesentérico de leproso..... | ++ | ++ |
| 205 | (64) — de ossos de leproso..... | ++ | ++ |
| 207 | (70) — de ossos de leproso..... | ++ | ++ |
| 81 | 11E(36) — de ossos de pessoas normais..... | ++ | ++ |
| 83 | 16E — de ossos de pessoas normais..... | + | + |
| 70 | 19B — de água de fossa — Ibaguí..... | + | — |
| 71 | 22B — de água de fossa — Agua de Dios..... | + | — |
| 72 | 2C — de água de fossa — Bogotá..... | + | ++ |
| 97 | (67) — de água de fossa..... | ++ | — |
| 75 | 2E(30) — de terra de leprosário..... | ++ | ++ |
| 80 | 10E — de terra de leprosário..... | + | — |
| 92 | 1F — de terra de leprosário..... | + | — |
| 93 | 2F — de terra de leprosário..... | + | — |
| 68 | 28A — de pés de galinha..... | + | — |
| 73 | 6D — de intestino de mosca..... | + | — |
| 74 | 1E — de patas de galináceo..... | + | + |
| 202 | 1C(57) — de rãs..... | ++ | + |
| 204 | (63) — de artrópodos (corrodentia)..... | ++ | ++ |
| 208 | (71) — de intestino de mosca sugadora..... | ++ | — |

Não foi incluída na tabela de resultados, a amostra 607, da ATCC, recebida por aquela coleção como sendo a amostra original de KOCH, já tendo sido demonstrado em trabalho especial, por TOBIE (20), não ser de *Mycobacterium tuberculosis*, o que foi agora novamente reafirmado pelo teste de virulência e pela fluorescência, que foram negativos com a aludida amostra.

LISTA DE CULTURAS

NUMERAÇÃO CORRESPONDENTE DAS DIVERSAS COLEÇÕES

| I.O.C. | Lister Inst. N.C.T.C. | A.T.C.C. | Tulane Univ. G. W. Duval | Carville | N.I.H. | Histórico |
|--------|--------------------------|----------|--------------------------------|----------|--------|---------------------|
| 21 | 509 | 4242 | 115 | 115 | — | Kedrowsky-Kraus |
| 23 | 510 | 4244 | 113 | — | — | Rost-Williams |
| 134 | 511 | — | — | — | — | Navarro Bayon |
| 135 | 512 | 4237 | 105 | — | — | Clegg I |
| 18 | 514 | 4239 | 104 | 102 | — | Duvals Chrome |
| 194 | 515 | 4241 | 114 | 117 | — | Levy Chrome-Kraus |
| 166 | 516 | 4235 | 107 | 105 | — | Brinckerhoff I |
| 15 | 517 | 4236 | 108 | 109 | — | Brinckerhoff II |
| 12 | 518 | 4233 | 112 | — | — | Lepra 18 |
| 168 | 519 | 4234 | 110 | — | — | Barry |
| 17 | 521 | 4238 | 109 | — | — | Currie |
| 19 | 522 | 4240 | 111 | — | 364 | Elly |
| 50 | — | 68 | — | — | 361 | Needham (rato) |
| 51 | — | — | — | — | 362 | Human F |
| 54 | — | 69 | — | — | 366 | Rat I A.M.S. |
| 10 | — | 67 | — | — | 368 | Rat MacCoy |
| 154 | — | — | — | — | 771 | Badger 102 |
| 22 | — | 4243 | 129 | — | — | Lombardo Pellegrini |
| 25 | — | 9033 | — | — | — | St. leprae II S.A. |
| 26 | — | 9034 | — | — | — | St. leprae III S.A. |
| 27 | — | 9035 | — | — | — | St. leprae V S.A. |
| 36 | — | 10142 | — | — | — | Myco. phlei |
| 37 | — | 9805 | — | — | — | Myco. tub. bovis |
| 38 | — | 7992 | — | — | — | Myco. avium |
| 39 | — | 607 | — | — | — | Mycobacterium sp. |
| 40 | — | 8236 | — | — | H37 | Myco. tub. hominis |
| 41 | 524 | 356 | — | — | — | Myco. berolinensis |
| 42 | — | — | — | — | — | 110 Myco. ranae |
| 195 | — | — | — | 130 | — | M. leprae Kulinski |
| 196 | — | — | — | 11 | — | M. tub. bovis |
| 197 | — | — | — | 58 | — | M. paratuberculosis |
| 198 | — | — | — | 112 | — | M. leprae Kral |

CONCLUSÕES

Fluoromicroscopia:

Não existe perfeita concordância entre a ácido-álcool-resistência verificada pela coloração de ZIEHL e pela fluorescência com a auramina. Em 123 culturas de micobactérias, cêrca de 14% demonstrou-se não fluorescente.

A intensidade da fluorescência não é a mesma em tôdas as culturas de micobactérias, havendo amostras que apenas apresentam granulações fluorescentes.

A fluoromicroscopia, embora se apresente como proporcionando melhores resultados do que as demais colorações, não serve para firmar diagnóstico definitivo da tuberculose. Mesmo quando positiva a bacterioscopia, deve haver confirmação pela cultura ou inoculação.

A fluorescência é uma propriedade muito variável com as espécies de micobactérias, especialmente no grupo dos paratuberculosos. Ela foi sempre positiva com o *Mycobacterium tuberculosis* e suas variedades *hominis* e *bovis*.

Teste citoquímico para virulência

Nas 30 culturas de *Mycobacterium tuberculosis*, o teste de virulência foi fortemente positivo, podendo esta prova ser de grande utilidade na determinação da virulência das amostras recentemente isoladas.

A reação continua positiva, mesmo nas culturas envelhecidas ou mortas pelo calor.

Em 10 amostras de micobactérias cromogênicas isoladas de escarro, e 12, de animais de sangue frio, o teste de virulência foi negativo. Também o mesmo resultado foi obtido em amostras de *Mycobacterium avium*, *phlei* e *berolinensis*.

O tampão de borato de sódio com pH 9.0 substitui perfeitamente o tampão de barbiturato de sódio recomendado por DUBOS e MIDDLEBROOK.

Excetuando as culturas rotuladas como *Mycobacterium tuberculosis*, o teste de virulência foi positivo em 30% das demais culturas examinadas, o que impede que consideremos êste teste como exclusivo das amostras virulentas de bacilo da tuberculose.

Não foi observada qualquer relação entre a fluorescência e o teste de virulência. Apenas não foram observadas culturas com a fluorescência negativa e o teste de virulência positivo.

O aproveitamento dêsses dois caracteres na classificação das micobactérias merece ser estudado cuidadosamente.

BIBLIOGRAFIA

- 2 — ARENS, KARL
O diagnóstico do *Mycobacterium tuberculosis* pela fluoromicroscopia. Rev. Brasileira de Tuberculose. Julho-Agosto de 1949, pg. 103.
- 2 — BERGEY
Manual of Determinative Bacteriology-Sixth edition — 1948.
- 3 — BLOCH, HUBERT
Studies on the virulence of Tubercle bacilli: isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. — The Jour. of Exper. Med. 91:197, 1950.
- 4 — BOGENS, EMIL
Detection of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. — Amer. Rev. Tuberc. vol. XLIV — sept. 1941.
- 5 — CALMETTE, A.
L'Infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme e chez les animaux. — Masson — Paris — 4.^a ed.
- 6 — DARZINS, E.
Tuberculose das gias (*Leptodactylus pentadactylus*) Arquivos do Instituto Brasileiro para Investigações da Tuberculose — Bahia.

- 7 — DUBOS, R. and GARDNER MIDDLEBROOK
Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. Amer. Rev. Tuberc. 58, dec. 1948.
 - 8 — ELLINGER, P.
Fluorescence microscopy in biology — Biol. Rev. 1940, 15, 323.
 - 9 — HAUDUROY, M. P. et Y. POSTERNAK
Recherche des bacilles tuberculeux dans les expectorations par la microscope en fluorescence. Compt. Rend. Soc. Biol. 155, 755, 1941.
 - 10 — HAUDUROY, M. P. et Y. POSTERNAK
Sur une réaction permettant de distinguer les mycobacteries virulentes des mycobacteries avirulentes. Compt. Rend. de l'Académie de Science.
 - 11 — HAUDUTOY, P. et Y. POSTERNAK
Sur une réaction cytochimique en rapport avec la virulence des mycobacteries. Annales de l'Institut Pasteur, Paris. Tome 77, juillet, 1949, pg. 91.
 - 12 — HAUDUROY, PAUL
Inventaire et description des bacilles para-tuberculeux. Masson et Cie. — 1946.
 - 13 — LEVADITI, JEAN-C. et J. AUGIER
Variante de la technique de Machiavello applicable a la microscopie en fluorescence des bacteries. — Annales de l'Institut Pasteur, Paris — 1949, 76, 194.
 - 14 — RICHARDS, O. W., KLINE, E. K. and LEACHE, R. E.
Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. — Amer. Rev. Tuberc. 44, 255, 1941.
 - 15 — ROSSELL, CELSO S. C.
Novos cultivos cromogênicos de bacilos ácido-álcool-resistentes de mosquitos (Culicini), capturados sobre leprosos. II nota. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz — Tomo 45, Fasc. IV, 1947.
 - 16 — ROSSELL, CELSO S. C.
Cultura cromogênica de um bacilo ácido-álcool-resistente isolado de mosquito (Culinini), capturado sobre leprosos, em plena natureza, com retrocultura obtida de rato branco. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Tomo 44, Fasc. III, 1946.
 - 17 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE e CELSO ROSSELL
Isolamento de bacilos ácido-álcool-resistentes das águas de efluentes das fossas OMS do Sanatório Padre Bento (S. Paulo) e do Hospital Colônia de Curupaiti (D. Federal). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 44, Fasc. IV, 1946.
 - 18 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
Estudo bacteriológico de escarros de leprosos tuberculosos em tratamento com a estreptomicina, com exibição de culturas obtidas. O Hospital, Maio, 1949.
 - 19 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
Discovery and isolation of acid-alcohol-resistant bacillus of tick (*Amblyoma rotundatum*) captured on toad (*Bufo marinus*): *Mycobacterium lutzi*, n. sp. Preliminary report. — Brasil Médico, 62:17-19 Jan 17, 3, 1948.
 - 20 — TOBIE, W. C.
Mycobacterium tuberculosis N.º 607 and similar doubtful tubercle bacilli. Am. Rev. Tub. vol. LVIII, pg. 693.
-