

Isolamento de bacilos ácido-alcool resistentes das águas dos efluentes das fossas "OMS" do Sanatório Padre Bento (S. Paulo) e do Hospital-Colônia Curupaity (Distrito Federal)

pelos

Dr. H. C. de Souza-Araujo

e

Celso S. C. Rossell

Estagiário do Laboratório de Leprologia do I. O. C.

(Com três clichês)

Nota prévia

Tendo recebido, aos 25 de Maio último, de Bogotá, gentilmente remetidas pelo Dr. Guillermo Muñoz Rivas, 28 culturas de bacilos ácido-alcool resistentes por êle isolados de várias procedências (sobretudo de material leproso), 7 das quais (25 %), provenientes de água de esgotos (águas negras), sendo 2 de Bogotá (6 E e 27 A), 2 do Leprosário Agua de Dios (2 C e 22 A) e 3 de Ibagué (24 A, 25 A e 19 B), resolvemos empreender, com águas dos efluentes das fossas dos nossos leprosários, um estudo semelhante, cujos primeiros resultados descrevemos nesta nota prévia, pois tais pesquisas serão continuadas por nós em 1947.

Essas sete amostras de culturas de Muñoz Rivas, repicadas em Bogotá em 8 de Abril e aqui em Manguinhos em 17 de Julho, em agar glicerinado e em meio de Loewenstein, são cromogênicas, variando do amarelo ouro ao alaranjado, tendo aumentado, com o correr do tempo, a sua pigmentação.

No dia 22 de Junho último um de nós (S. A.) trouxe de S. Paulo três amostras (duas séries de 3 tubos numerados 1, 2 e 3) de água do efluente do sistema de fossas OMS, do Sanatório Padre Bento, considerado como o mais perfeito, segundo o Engenheiro-Chefe do Departamento de Profilaxia da Lepra de S. Paulo, Dr. Adolpho de Carvalho, dos cinco leprosários da-

* Recebido para publicação em Dezembro de 1946.

quele Estado. (Vide Cliché I). Colhidas às 10 horas, às 11 horas nos foram entregues no aeroporto e às 15 entraram na geladeira do Instituto Oswaldo Cruz. Na manhã de 24 de junho, uma série dessas amostras (tubos 1, 2 e 3) foi entregue ao Dr. Gobert Araujo Costa, assistente da Secção de Bacteriologia, para análise bacteriológica. As amostras da outra série foram tratadas pelo método Petroff, por um de nós (C. R.) e os sedimentos semeados em meio de Loewenstein. Os esfregaços dos sedimentos 1 e 2 revelaram alguns bacilos a.a.r., após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. O exame do sedimento n.º 3 foi negativo, entretanto, dois tubos de Loewenstein semeados com este sedimento revelaram, 26 dias após (20 de Julho), uma colônia amarela, do tamanho duma cabeça de alfinete, num tubo, e noutro, uma colônia idêntica, porém esbranquiçada. O exame microscópico dessas culturas, feito a 25 de Julho, revelou bacilos a.a.r. e Gram positivos na cultura crême e elementos cocoides, também a.a.r., na colônia amarela. Essas culturas serão estudadas adiante, com várias idades.

Nesse interim o Dr. Goberto Araujo Costa nos informou que as três amostras de água que lhe mandámos para análise se revelaram extremamente contaminadas por bacterias do grupo *Coli aerógenes*, que são habitantes normais dos intestinos do homem e dos animais, podendo tornar-se, em certas condições, patogênicas.

Ao meio dia de 13 de Agosto último colocámos na geladeira do I.O.C. quatro amostras (tubos 1, 2, 3 e 4) de água do efluente da fossa O.M.S., do Hospital-Colônia Curupaity, colhidas, em tubos esterilizados, uma hora antes. Das 13,30 às 14,30 horas do mesmo dia essas amostras foram centrifugadas e os sedimentos tratados pelo método de Petroff, e após três novas centrifugações e lavagens foram semeados em meio de Loewenstein. Os esfregaços desses quatro sedimentos, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, revelaram raros bacilos a.a.r., em todos. O restante desses sedimentos, em quantidades mínimas, foi deixado na geladeira e no dia seguinte (14-8) emulsionados em sôro fisiológico e injectado, por via subcutânea, na axila direita de dois ratos brancos, que morreram dentro de 48 horas, com sinais de infecção geral. Depois dum mês de incubação, a 37.º C., alguns tubos apresentaram tenue germinação esbranquiçada. Ao 1.º de Outubro a amostra 2 tinha produzido culturas puras de bacilos a.a.r. e as amostras 1, 3 e 4 culturas impuras, contendo, entretanto, esses bacilos. Tratadas essas culturas pela soda caustica a 10% (método de Petroff), foi possível purificar as culturas 1 e 3, perdendo-se a 4.

Todas essas culturas de Curupaity são esbranquiçadas ou crêmes, diferentes, portanto, das do Sanatório Padre Bento. O seu estudo será feito adiante. Aproveitamos o ensejo para agradecer aos Drs. Lauro Souza Lima e

Thomaz Pompeu Rossas, respectivamente directores do Sanatório Padre Bento e do Hospital-Colônia Curupaity, pelo fornecimento da matéria prima que deu origem a estes estudos.

Descrição das Culturas obtidas da amostra 3 da água do efluente da fossa OMS do Sanatório Padre Bento (S. Paulo).

Esta descrição corresponde às fotografias 1 a 3, do cliché II, infelizmente muito pouco demonstrativas, devido à côr e úmidade das culturas.

Tubo 1 — Cultura de 1-8-46 proveniente da 2.^a geração de 25-7 em Loewenstein, examinada em 26-12-46 : Cobre $\frac{3}{4}$ da superfície do meio, que não fermentou e ainda conserva água de condensação. Germinação em camada delgada, finamente granulosa, de côr amarelo-ouro e aspecto liso e brilhante. O esfregaço desta cultura, corado pelo Ziehl-Neelsen, mostra bacilos curtos e médios (como se vê na microfotografia N.º 1), granulados na sua maioria, alguns em clava, outros elementos constituídos dum grande nódulo com uma cauda de protoplasma (forma em cometa) em róseo ou vermelho. Há, também, elementos pleomorficos menos corados, parecendo ser os mais jovens. Noutro tubo desta amostra, mais antigo (25-7-46), a germinação apresenta uma camada delgada, lisa e uniforme e outra sobreposta, saliente, granulosa, cobrindo metade da primeira. Esta cultura, de 5 meses, apresenta uma côr róseo-pardacento. O meio está integro. O esfregaço desta amostra, corado pelo Z-N apresenta o aspecto acima descrito; outro, corado pelo método Oliveira Castro, apresenta elementos granulados bem corados em rôxo, com protoplasma róseo.

Repicada em 12-12, com 14 dias já apresenta natável desenvolvimento, com superfície granulosa e côr mais pigmentada que a original.

Tubo 2 — Cultura original da sementeira de 24-6-46. Germinação cobrindo quase toda a superfície do meio, que não fermentou após decorridos seis meses. Germinação em camada delgada, de aspecto úmido e lúcido, granulosa e de côr alaranjada. Ao exame microscopico mostra-se nitidamente cooide a.a.r., com poucos elementos bacilares fortemente a.a.r. e Gram positivos. Desta cultura de 24-6-46 há dois tubos provenientes do sedimento tratado pela soda, uma cultura exuberante, amarela e granulosa e outra crême, em camada delgada e lisa.

Repicada em 12-12-46, em Loewenstein, começam a germinar colonias circulares, salientes, de côr alaranjada.

Tubo 3 — É outra amostra da mesma cultura do tubo 2, de 1-8-46, proveniente da 2.^a geração de 25-7. Tem 4 meses e 26 dias. O meio não fermentou, apenas clareou na parte superior. Germinação exuberante, cobrindo toda

a superfície do meio, finamente granulosa, tendo umas colônias circulares, salientes no centro; côr alaranjada e aspecto úmido e lúcido.

O esfregaço desta cultura é idêntico ao anterior do tubo 2. Corado pelo método Oliveira Castro os elementos se destacam lindamente pela coloração dos grânulos. Repicada em 12-12-46, em Loewenstein, está se desenvolvendo bem, com o mesmo aspecto úmido e lúcido e côr alaranjada.

Outro tubo da Amostra 3 (Sanatório Padre Bento): 2.^a geração em meio de Loewenstein, de 25 de Julho de 1946. Germinação parca, apresentando o mesmo aspecto e a mesma côr amarela da cultura do tubo 3. O meio apresenta, ainda, água de condensação e não fermentou. O esfregaço corado pelo Z-N apresenta massas de cocoides a.a.r. Outro esfregaço corado pelo Gram mostrou, em destaque, grânulos Gram-positivos dentro de protoplasma rosado-violeta.

As microfotografias 1 e 2 do Cliché III são dos esfregaços das duas amostras de culturas de germes a.a.r isolados da amostra 3 da água da fossa OMS do Sanatório Padre Bento (S. Paulo).

Descrição das culturas obtidas das Amostras 1, 2 e 3 da água do efluente da fossa OMS do Hospital-Colônia Curupaity (Distrito Federal).

Esta descrição é ilustrada com as fotografias 4, 5 e 6 do Cliché II e a microfotografia 3 do Cliché III. O tubo 4 mostra uma cultura de 3.^a geração da amostra 1, em meio de Loewenstein, de 1-10-46, portanto com 2 meses e 20 dias. O meio está íntegro, sem fermentação, apenas pigmentado em crême no seu terço superior. Germinação exuberante, cobrindo tôda a superfície do meio; côr crême, cultura granulosa e de aspecto sêco simulando uma cultura de *Mycobacterium tuberculosis*, do tipo eugônico. Foi inoculada em cobaios no dia 18 de Dezembro. O exame microscópico revelou cultura pura de bacilos a.a.r. homogêneos, fortemente a.a.r. e Gram positivos. A microfotografia 3 é desta amostra. Esta cultura repicada em Loewenstein em 12 de Dezembro germinou com extrema exuberância, afetando sempre o aspecto eugônico das culturas do bacilo Koch.

Um outro tubo desta mesma amostra, da idade de 2 meses e 20 dias, em Loewenstein, apresenta os mesmos caracteres da acima descrita, apenas com uma zona de pigmentação rosada no terço superior da cultura, indicando uma daquelas mutações descritas por J. G. Lacôrte nas culturas do *Mycobacterium tuberculosis*. Esfregaços desta cultura, corados pelo Z-N, mostram bacilos granulosos fortemente ácido-álcool resistentes, com a morfologia do bacilo de Koch. Esfregaço corado pelo método de Oliveira Castro

mostra os bacilos, sob tôdas as suas formas, com granulações nitidamente coradas. Êsses bacilos são também Gram positivos.

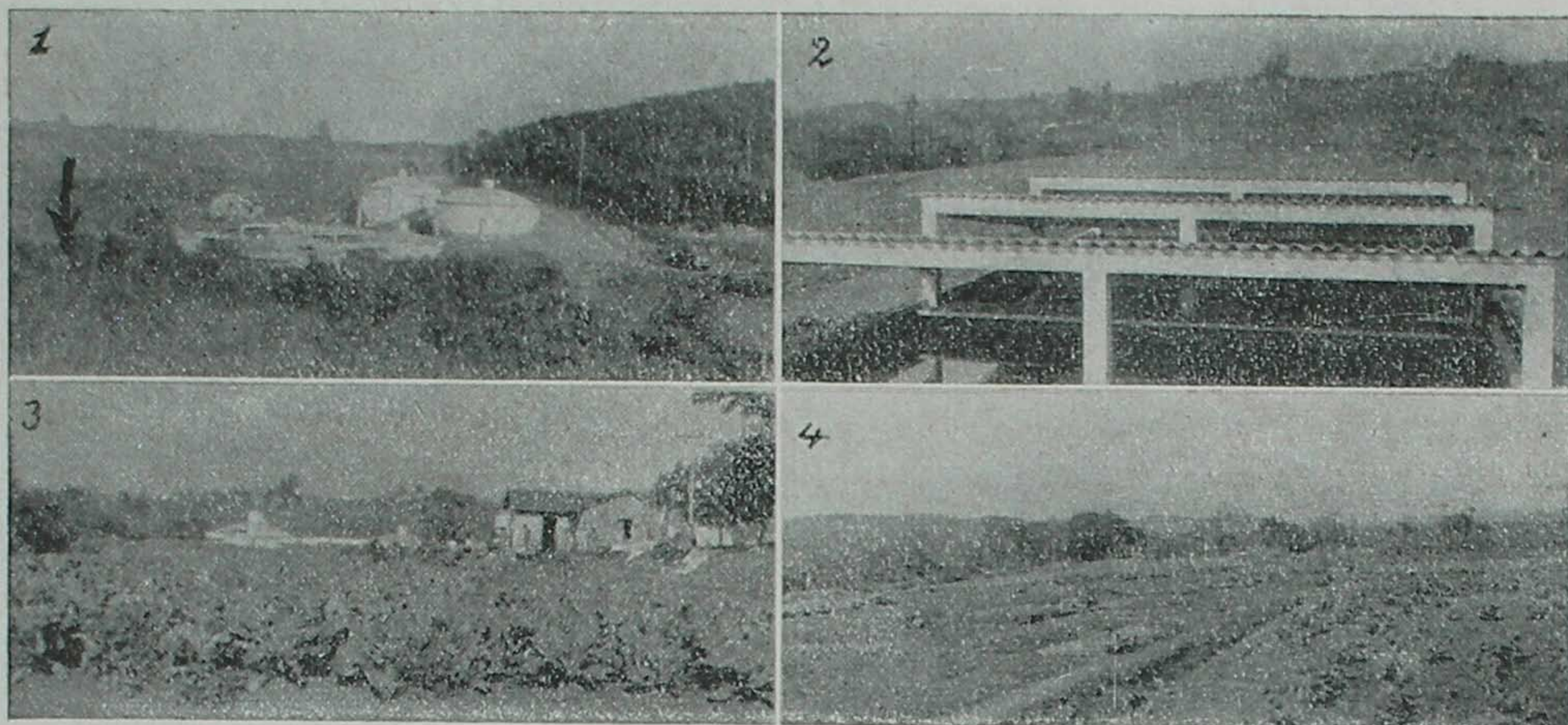
Esta mesma cultura da Amostra 1, de 3.^a geração, em caldo glicerinado a 5% (1-10-46) apresenta tênue véu branco e depósito, no fundo do tubo, de 2 milm. de espessura, da mesma côr que o véu. O meio, em repouso, apresenta-se perfeitamente límpido; agitado, apresenta côr leitosa. Os esfregaços do véu provaram tratar-se de cultura pura de bacilos a.a.r. e Gram positivos. A germinação desta cultura em caldo foi parca, em comparação com as cromogênicas, isoladas de material leproso.

Tubo 5 — Êste tubo é representado na foto do Cliché II. Trata-se, também, de cultura de 3.^a geração, em Loewenstein, mas da água da amostra 2. Idade: 1-10-46. Germinação exuberante, cobrindo quasi totalmente a superfície do meio, que se apresenta íntegro, sem água de condensação. A cultura é tôda granulosa, sêca (tipo eugônico da cultura do bacilo de Koch); de côr crême, tendo no centro uma zona de mutação, pigmentada de róseo.

O esfregaço corado pelo método de Oliveira Castro revelou bacilos normais, granuloses, e outros maiores, rosados, com nódulos escuros, os quais êle Castro identifica aos descritos em 1881 por Alberto Neisser. Tais elementos são Gram positivos. Esta cultura da amostra 2, semeada em caldo glicerinado (1-10-46), produziu tênue véu e depósito esbranquiçado. Esfregaços do véu corados pelo Z-N e pelo método Oliveira Castro revelaram tratar-se de cultura pura de germes a.a.r., predominando a forma bacilar nitidamente granulosa. Repicada em 12-12, está germinando bem.

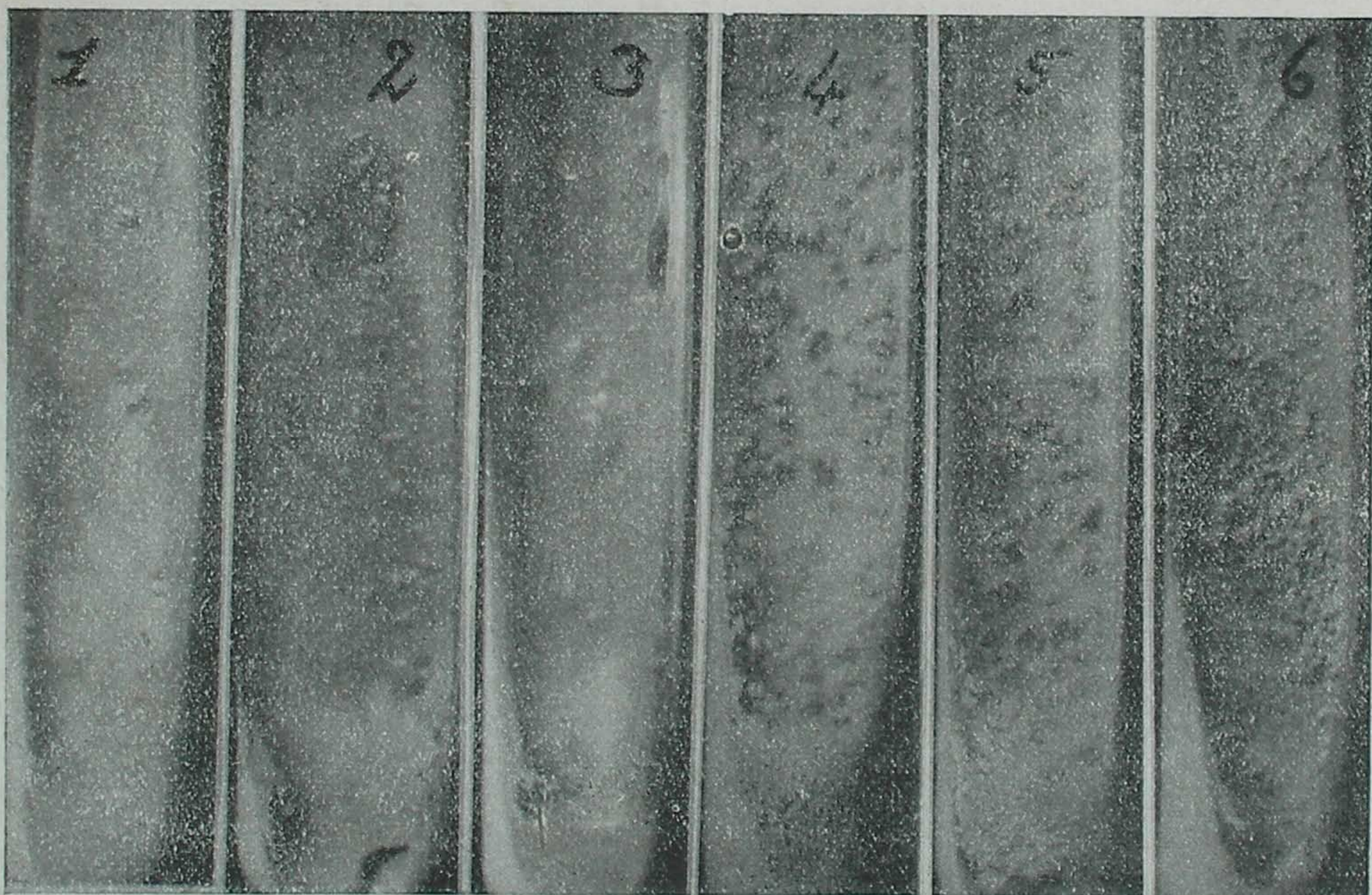
Tubo 6 — Cultura de 3.^a geração (2-10-46) do bacilo isolado da água amostra 3 da fossa OMS do Hospital-Colônia de Curupaity. A sua germinação em Loewenstein abrange 3/4 da superfície do meio que está fendido na parte inferior. Cultura crême, granulosa, de aspecto sêco, apresentando, no seu têrço superior, uma zona (1 cm²) de pigmentação rosada, com tendência ao alaranjado. Desta amostra 3 temos dois tubos com idêntica mutação. Quanto ao exame microscópico, os seus esfregaços corados tanto pelo Ziehl-Neelsen, como pelo Oliveira Castro ou Gram, mostram tratar-se de cultura idêntica, sinão a mesma, das amostras 1 e 2: bacilos homogêneos, granuloses, uns; outros com protuberâncias numa ou nas duas extremidades ou só no centro. No caldo glicerinado não há turvação do meio e germina parcamente.

Tôdas as culturas de Curupaity assemelham-se, macro e microscópica-mente, com algumas das amostras de culturas de *Mycobacterium tuberculosis*



Cliché I — Aspectos das fossas sistema OMS, do Sanatório Padre Bento (São Paulo), no centro da horta desse estabelecimento, a qual é irrigada com as águas do respectivo efluente (localizado pela flecha na foto 1) e adubada pelo lodo, dessecado no depósito coberto, da foto 2. As fotos 3 e 4 mostram aspectos da horta do Sanatório.

(Fotos Dr. Souza-Araujo, 21-6-46).



Cliché II — Fotos 1, 2 e 3 — Culturas da amostra n.º 3 da água do efluente da fossa OMS do Sanatório Padre Bento. Cultura 1 — amarelo-ouro, humida e lisa (bacilos a.a.r.). Culturas 2 e 3 — granuladas, húmidas e de cor alaranjada (elementos a. a. r. cocoides).

Fotos 4, 5 e 6 — Culturas das amostras 1, 2 e 3 da água do efluente da fossa OMS do Hospital-Colônia Curupaity. Todas elas são cremes, granuladas, secas (aspecto eugônico) Bacilos a.a.r..

(Fotos J. Pinto).

que isolámos, em 1941, de escarro de leprosos suspeitos de sofrerem também de tuberculose, tanto do leprosário de Curupaity, como de outros leprosários. Tais culturas foram, na ocasião, examinadas pelo Dr. Saenz, do Instituto Pasteur, de Paris, reconhecido como grande entendido no assunto.

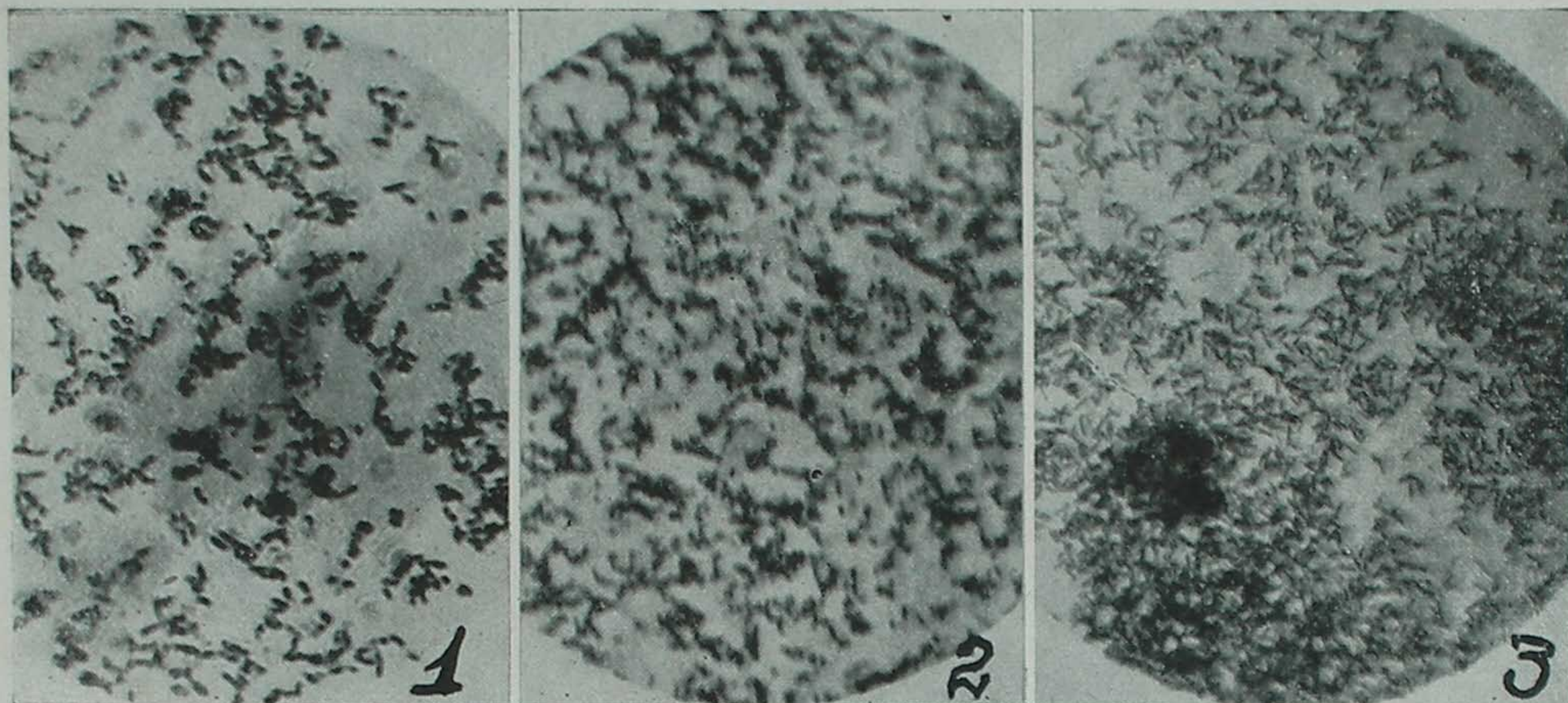
SUMÁRIO

Sumariando êstes estudos vemos que tôdas as três amostras da água do efluente da fossa OMS do Sanatório Padre Bento continham bacilos a.a.r., sendo que do tubo n.º 3 conseguimos isolar duas amostras de germens a.a.r., uma cocoide e outra bacilar, como sóe acontecer, nas culturas raramente obtidas de material de lepra humana. O Bacteriologista Gobert Araujo Costa, do I.O. Cruz, verificou que essas águas estavam fortemente contaminadas de bactérias do grupo *Coli aerógenes*.

As quatro amostras de água da fossa OMS do Hospital-Colônia Curupaity revelaram, no exame directo dos seus sedimentos tratados pelo método de Petroff, a presença de bacilos a.a.r. e de tôdas elas obtivemos culturas de tais bacilos, sendo que três delas ainda sobrevivem. Por serem estas amostras idênticas, inoculámos apenas uma delas em duas cobaias. O resto daqueles sedimentos, emulsionados juntos e inoculados em dois ratos brancos, no dia seguinte à sua sementeira, causou a morte deles dentro de 48 horas, com sinais de infecção generalizada.

CONCLUSÕES

- 1 — Confirmámos os estudos feitos na Colômbia pelo Dr. Guillermo Muñoz Rivas.
- 2 — As duas amostras de culturas de germes a.a.r. obtidas da água (tubo 3) do efluente da fossa OMS do Sanatório Padre Bento (a qual é utilizada para irrigar a horta dêsse estabelecimento), são idênticas às obtidas de material leproso.
- 3 — As três amostras de culturas de bacilos a.a.r. obtidas de três amostras da água da fossa OMS do Hospital-Colônia de Curupaity, assemelham-se a outras por um de nós (S. A.) obtidas de escarros de leprosos suspeitos de sofrerem também de tuberculose pulmonar.
- 4 — A depuração biológica processada nas fossas do tipo OMS é imperfeita, pois não destrói sequer as bactérias banais de origem intestinal.



Cliché III — As microfotografias 1 e 2 são das duas amostras de germes a.a.r. isolados da amostra 3 da água do efluente da fossa OMS do Sanatório Padre Bento (S. Paulo). A microfotografia 3 é de esfregaço de uma das três culturas de bacilos a.a.r. isolados das amostras de água do efluente da fossa do Hospital-Colônia Curupaity (D. F.).

(Microfotos de J. Pinto).

ADITAMENTO

Um de nós (Celso Rossell) examinando, no dia 3 de Janeiro de 1947, sedimentos de água da fossa OMS do leprosário Colonia Santa Fé (Sul de Minas), captada, no seu último efluente, em tubos de ensaio esterilizados, uma hora antes, encontrou abundantes bacilos ácido-alcool resistentes, de tamanho mediano, isolados ou em pequenos grupos, granuloso pela coloração Ziehl-Neelsen. Após essa verificação tratámos os sedimentos das quatro amostras da referida água, pelo método de PETROFF e após duas lavagens dos sedimentos com água destilada esterilizada, seguidas de centrifugações, semeámos com êles 8 tubos de meio de LOEWENSTEIN, que foram deixados na estufa a 37°C durante 3 semanas. Periódicamente eram inspecionados.

No dia 21 de Janeiro, após 18 dias de incubação, encontrámos, em 5 desses 8 tubos, abundantes colônias crêmes, de vários tamanhos, desde as mínimas até 1 e 2 mm. As colônias eram verrucoides e de aspecto sêco. Feitos esfregaços de material colhido nos 5 tubos e corados pelo Z-N revelaram, em dois, culturas puras de bacilos a.a.r., que repicámos em 4 tubos de Loewenstein e 1 de agar glicerinado (21-1-47). Os outros 3 tubos foram desprezados porque estavam contaminados. Em todos êles havia, entretanto, bacilos a.a.r. No dia 21 de Fevereiro, um mês após as repicagens, verificamos que 2 dos tubos de Loewenstein estavam contaminados assim como um outro dos 2 tubos da cultura original. Nesta data (25-II) as culturas apresentam o seguinte aspecto:

1) Um tubo de cultura de 3-1-47 em Loewenstein (Original): A germinação cobre toda a superfície do meio, apresentando-se sob a forma de camada granulosa, de cor creme, com ligeira fermentação no fundo do tubo. Esfregações desta cultura corados pelo Ziehl-Neelsen, Oliveira Castro e Gram revelaram bacilos a.a.r. pleomorficos, granulados, Gram positivos.

2) Um tubo de cultura de 21-1-47 em Loewenstein (2.^a geração com 35 dias): A germinação cobre totalmente a superfície do meio; colônias verrucosas, de aspecto seco e cor creme. Na água de condensação há um véo rugoso, que sobe 1cm. pela parede do tubo. O exame microscopico desta cultura revelou aspecto, morfologia e propriedades tinctoriais idênticos aos da cultura original.

3) Um tubo de cultura de 21-1-47 (2.^a geração) em agar glicerinado: A germinação cobre quasi totalmente a superfície do meio, com colônias dum creme pardacento, granuladas e de aspecto húmido. Esfregaços desta cultura, corados pelos métodos de Ziehl-Neelsen, Oliveira Castro e Gram revelaram exclusivamente bacilos a.a.r. e Gram positivos.

Nesta data foram repicadas as culturas dos três tubos.

Manguinhos, 25 de fevereiro de 1947.