

**Trabalho do Laboratorio de Bacteriologia e Sorologia do  
Departamento de Prophylaxia da Lepra - S. Paulo**

## **CULTURA DO MYCOBACTERIUM LEPRAE**

**(Verificação dos Trabalhos de Vaudremer)**

**MOACYR DE SOUZA LIMA**

Bacteriologista do D. P. L. S. Paulo

Desde a descoberta do bacillo de Hansen em 1873, que os experimentadores têm tentado cultivá-lo, usando meios e processos os mais diversos.

Os resultados obtidos foram contradictorios: para uns só foi possível cultivá-lo em meios anaerobios: para outros, só em meios aerobios. Alguns conseguiram, logo de inicio, culturas acido-resistentes; outros conseguiram germens não acido-resistentes, apresentando acido-resistencia, quando semeados em meios especiaes ou com arteficios de technica.

Algumas culturas apresentavam poder pathogenico para os animaes de Laboratorio, sem entretanto, produzir lesões leprosas; outras eram inocuas para esses mesmos animaes.

Em geral, todos esses germens não davam culturas depois da 4.<sup>a</sup> ou 5.<sup>a</sup> geração, isto é, não podiam ser repicados em serie.

Em 1935, Vaudremer publicou em a "Presse Medicale", os reo mycobacterium leprae possa ser cultivado e inoculado em animaes de experimentação.

Em 1935, Vaudremer publicou em a "Presse medicale", os resultados dos seus trabalhos sobre a cultura do bacillo de Hansen, concluindo tel-o isolado e cultivado. Este trabalho é interessante, pois ao contrario de trabalhos anteriores, affirma poder repical-o indefinidamente e a inoculação em animaes é positiva pelo menos para o macaco.

As culturas de Vaudremer não são acido-resistentes de inicio, mas, quando semeadas em meios especiaes adquirem essa propriedade, passageiramente,

Eis uni resumo ligeiro dos trabalhos de Vaudremer:

O material leproso (tuberculo ou sangue de doente febril) é semeado em caldo de batata glicerinado e meio de Raulin, modificado pelo *Aspergillus fumigatus* e filtrado em velas L3. Depois de tempo variavel (de accordo com a origem do material) obteve o seguinte cyclo evolutivo — bacillos acido-resistentes do material, em seguida elementos meningococciformes, bacillos cyanophilos curtos, bacillos cyanophilos longos e bacillos acido-resistentes.

A obtenção de bacillos acido-resistentes só possivel, quando o material é semeado em caldo de batata glicerinado com suporte inerte.

Esta acido-resistencia, em geral, aparece 7 a 20 dias depois das sementeiras, é passageira, não durando mais de 10 a 12 dias e não apparece nos meios contendo ovo ou asparagina; em seguida o bacillo degenera, apresentando esporos que são a sua forma de resistencia.

Estes, sendo repicados em caldo de batata, dão nascimento novamente ás formas pseudo-meningococcus, etc.

Vaudremer fez inoculações em animaes concluindo que é pathogenico para o rato e que no macaco, produz lesões identicas ás da lepra. No rato, a inoculação é feita depois do bloqueio do systema reticulo-endothelial, pelo methodo de Van Deirse. Estes anintaes morrem, um mez mais ou menos depois da inoculação, com grande emagrecimento, apresentando no figado um exsudato purulento, que sendo semeado em caldo de batata, dá nascimento a germens identicas ás formas pseudo meningococcicas, seguindo-se o cyclo evolutivo já descripto.

As provas de agglutinação foram positivas para os sôros leprosos e a prova therapeutica tambem foi positiva. Alguns doentes melhoraram com a vaccina feita com estes germens.

Fiz no Laboratorio do Departamento de Lepra as verificações de contrôle dos trabalhos de Vaudremer, dando nesta 1.<sup>a</sup> communicação a parte exclusivamente bacteriologica. A verificação experimental será communicada mais tarde, pois ainda estou aguardando os resultados das ultimas inoculações.

Para isolar os germens de Vaudremer fiz cerca de 10 culturas;

1.<sup>a</sup>) Sangue retirado por punção da veia em 17-2-36 de M. P. Forma mixta; temperatura 38,6. Semeado em caldo de batata glicerinado. Em 2-3-36 apparecimento de diplococcus semelhantes nos meningococcus (13 dias).

2.<sup>a</sup>) Sangue retirado por punção da veia em 17-2-30 de M. P. Semeado em Raulin modificado. Não houve apparecimento de germens.

3.<sup>a</sup>) Leproma semeado em 17-2-36 em meio de Raulin modificado.

Em 26-2-30 o meio estava completamente tomado por *aspergillus fumigatus*.

4.<sup>a</sup>) Leproma semeado em 18-2-36 em meio de Raulin modificado. Não houve aparecimento de germens.

5.<sup>a</sup>) Leproma semeado em 8-3-30 em meio de Raulin modificado. Não houve aparecimento de germens.

6.<sup>a</sup>) Sangue retirado por punção da veia, semeado em meio de Raulin modificado. Forma mixta com temperatura 37,9. Não houve aparecimento de germens.

7.<sup>a</sup>) Leproma semeado em meio de Raulin modificado em 8-3-36. Cultura contaminada pelo *aspergillus*.

8.<sup>a</sup>) Sangue retirado por punção da veia em 23-3-36, semeado em caldo de batata glicerinado. Esta cultura apareceu contaminada em 3-4-36.

9.<sup>a</sup>) Leproma semeado em 23-3-36 em caldo de batata. Em 30-3-36 aparecimento de germens diplococoides. (7 dias).

10.<sup>a</sup>) Leproma semeado em 26-3-36 em caldo de batata. Contaminada pelo *subtilis* em 30-3-36.

Resumindo:

Culturas feitas — 10 — sendo:

4 de sangue e

6 de tuberculoses

Culturas positivas 2, sendo uma de sangue e outra de leproma. Culturas negativas 3 e contaminadas 5.

Não foi possível isolar o germen de Vaudremer nas culturas feitas no meio de Raulin modificado, pois a sua esterilização por meia da filtração em velas sempre foi defeituosa.

Todas as nossas verificações foram feitas com as culturas isoladas do n.ºs 1 e 9.

Nas culturas positivas consegui obter o mesmo ciclo evolutivo descripto por Vaudremer, isto é, formas em coccus (pseudo-meningococcus), formas bacillares coradas em azul (bacillos cyanophilos); bacillos curtos no principio, longos em seguida e formas acido-resistentes e mais tarde formas em degenerescencia e esporos.

Entre os meus resultados e os de Vaudremer houve apenas difference de tempo. As formas bacillares cyanophilas levaram mais tempo para apparecer e ás formas acido-resistentes permaneceram menos tempo que os indicados. Os coccus obtidos na primeira

cultura de batata glicerinada, sendo semeados no mesmo meio, mas contendo 3% de óleo de oliva, dão nascimento ao mesmo tempo, a bacillus cyanophilos e bacillos acido-resistentes, predominando estes no fim de 72 horas, e desaparecendo pouco tempo depois.

No seu trabalho, Vaudremer usou o caldo de batata neutro ao tournesol, correspondendo a Ph 7,2. Variando a reacção do meio este germen não apresenta um desenvolvimento identico ao descripto.

Usando-se o meio com reacção mais alcalina (Ph 7,6 a Ph 7,8) as formas bacillares não apparecem, sendo substituidas por um mycelio fino, não havendo apparecimento de formas acido-resistentes.

Estes germens foram anda semeados em varios outros meios, que não os indicados por Vaudremer.

Em Petraghani, as formas diplococoides transformam-se em um mycelio fino, que se fragmenta ao se fazer o esfregaço.

As colonial são esbranquiçadas, destacando-se facilmente do meio. As culturas velhas apresentam esporos que pelo methodo de Ziehl-Neelsen coram em vermelho. Repicando-se este mycelio em caldo de carne glicerinado com 3% de óleo de oliva adquire em parte acido-resistencia. Esta também é passageira.

Em gelose glicerinada, as colonias, no começo, são de coloração branco alaranjada, tornando-se francamente alaranjada com o tempo.

Neste meio, os diplococoides meningococciformes dão origem a um mycelio.

Na batata glicerinada crescem abundantemente; colonias de côr alaranjada. Neste meio as formas pseudo meningococcus não evoluenn, dando esporos no fim de algum tempo; alguns (lestes são acido-resistentes.

Em gelose glicerinada e glycosada as colonias são identicas as observadas em gelose glicerinada, apenas mais abundantes. Em gelose simples, as culturas crescem facilmente, mas os germens não passam da forma pseudo meningococco. E' interessante notar que a coloração das colonias em gelose glicerinada é identica á coloração dos germens isolados por outros experimentadores como Kedrowsky, Duval, Acosta, Ota e Sato, etc.

Todas estas culturas semeadas em caldo glicerinado com óleo de oliva adquirem rapida, mas passageiramente acido-resistencia.

Eis um schema das formas obtidas em caldo glicerinado e meio de Petraghani:

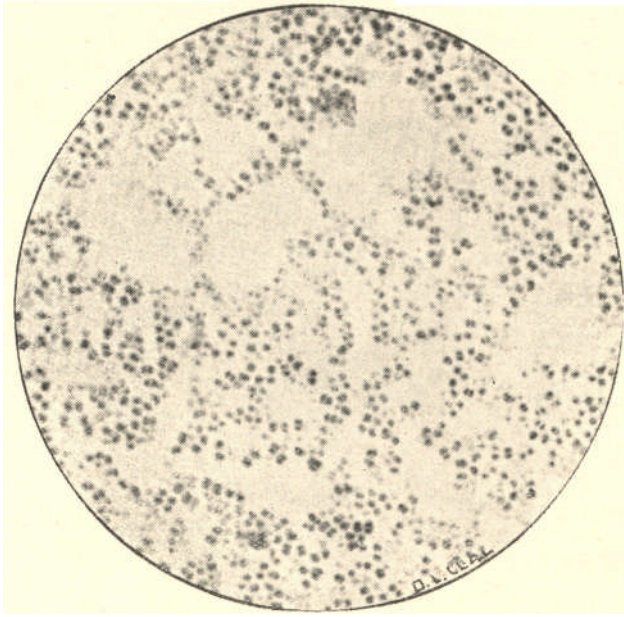


FIG. 1 *Microphot. dos diplococcos meningococciformes*  
(Aug. 1400 vezes)

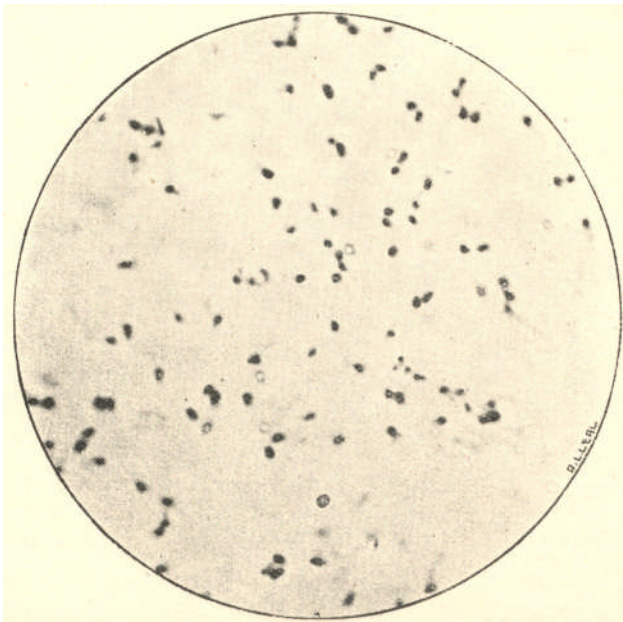


FIG. 3 *Coccus e bacillos cyanophilos curtos*

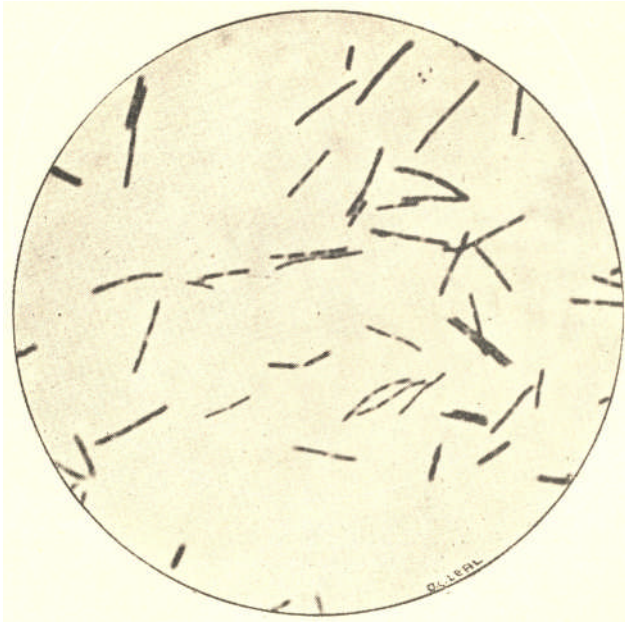


FIG . 4 Formas em degenerescencia e esporos

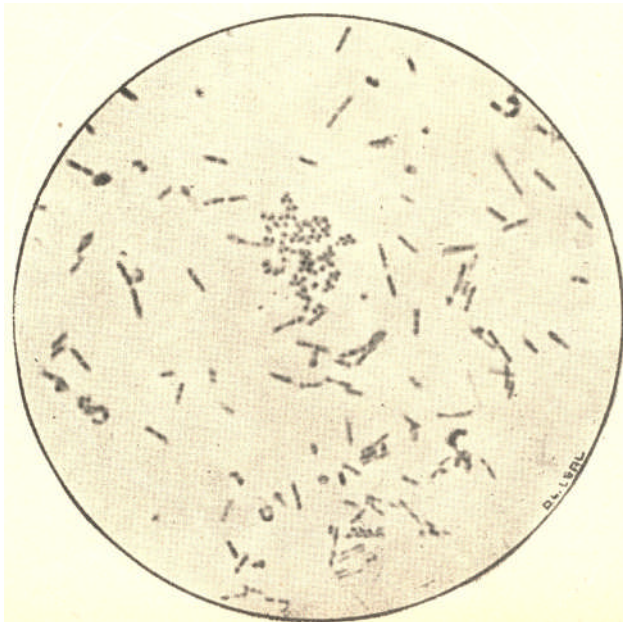


FIG. 5 Bacillos acido-resistentes (Microphot. 1400 vezes)

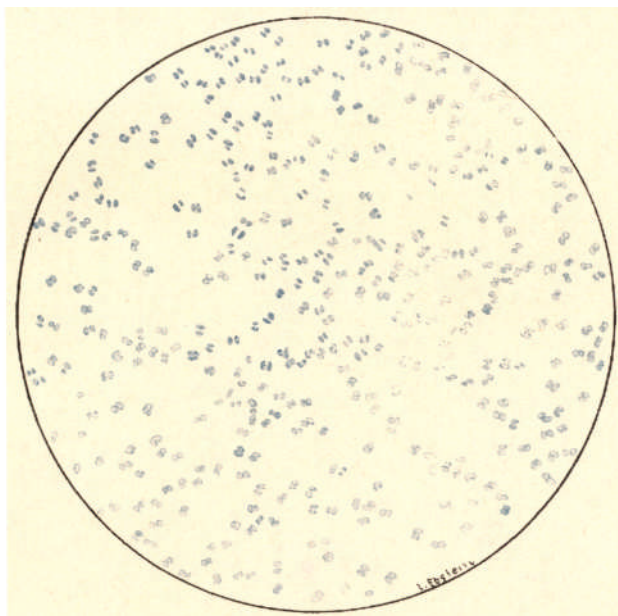


FIG 2  
Desenho da Fig. 1.  
*Diplococcus meningococciformes*  
(1.400 X)

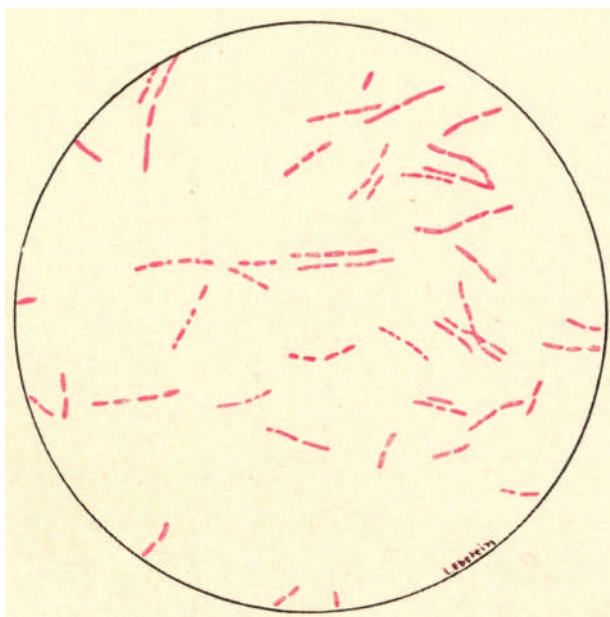


FIG. 6  
Desenho da Fig. 5  
Bacillos acido-resistentes (1.400 x)

### Conclusões

Vaudremer conseguiu isolar de doentes de lepra, um cogunllo, um actinomyces, com morphologia variavel, apresentando características diferentes conforme o meio de cultura usado. Não apresentam as características tinctoriaes do bacillo de Hansen, isto é, alcool-acido-resistencia, sinão passageiramente e assim mesmo usando-se meios especiaes.

Não-acredito que os germens cultivados por Vaudremer sejam o mycobacterium leprae, pelas seguintes razões:

1.º) As tentativas de cultura nem sempre dão resultados, falhando em mais de 50%;

2.º) Usando-se os mesmos meios que Vaudremer, apenas modificando o Ph, estes germens apresentam cyclos evolutivos diferentes;

3.º) Nas inoculações positivas feitas directamente do doente ao animal de laboratorio (inoculações na camara anterior do olho do coelho) nunca o bacillo se apresentou com morphologia diferente da já conhecida e suas propriedades tinctoriaes não se alteram;

4.º) Em culturas feitas com tecido leproso, os bacillos de Hansen persistem por algum tempo, desaparecendo depois e nunca apresentam modificações tinctoriaes ou morphologicas;

5.º) Nos cortes feitos de órgãos de individuos com lepra, nunca foram encontrados germens identicos aos descriptos por Vaudremer.

Todos os experimentadores que isolaram germens não acido-resistentes, de material leproso, procuram justificar a falta dessa propriedade; assim Reentjerna conclue que a acido-resistencia do b. de Hansen não pode ser considerada como um caracter especial, especifico, permanente, mas um attributo transitorio, porquanto a acido-resistencia diminue em meios desprovidos de gordura, augmentando ao contrario, nos meios que a contém em quantidade.

Sem attribuir uma importancia excessiva ás propriedades tinctoriaes do mycobacterium leprae, creio que a falta de outros é ainda hoje a sua melhor característica, e, de accordo com Weil, pode-se concluir que toda a cultura de germens não acido-resistentes, não é cultura de b. de Hansen, até prova em contrario.

Este problema será seguramente resolvido com as inoculações em animaes, cujos resultados serão communicados opportunamente.



