

# TRABALHO DO INSTITUTO BACTERIOLOGICO DE S. PAULO

Diretor J. P. Carvalho Lima

## CULTURA DO BACILO DA LEPRO

J. P. CARVALHO LIMA e MARIA ARANTES

A dificuldade ou impossibilidade de se cultivar, no laboratório, o *Mycobacterium leprae* tem sido grande obstaculo a novas tentativas. Ha sempre o receio de iniciar o estudo duma questão que outros encerraram sem resultado satisfatório. Mais de sessenta anos já decorreram desde a descoberta de Hansen e o bacilo da lepra vem resistindo ao carinho com que os bacteriologistas prometem trata-lo nos tubos de cultura .

Não é nosso propósito enumerar os trabalhos sobre o assunto nem relatar resultados pró ou contra. Vamos apenas registrar a marcha dos ensaios que vimos realizando, ha anos, e por fim deduzir se vale a pena prosseguir.

Empregámos para as nossas culturas o meio sintético de Sauton<sup>1</sup>, modificado. Esse meio bastante conhecido é empregado com exito na cultura do bacilo de Koch.

Meio de Sauton

Asparagina .....	4	grs.
Glicerina .....	60	cc.
Ácido citrico .....	2	grs.
Fosfato bi-potássico .....	0,5	
Sulfato de magnésio .....	0,5	
Citrato de ferro amoniacal .....	0,05	
Agua destilada .....	1.000	cc.

Alcalinizar com amoniaco puro, pH 7,2. Distribuir e esterilizar durante vinte minutos a 121°C.

---

( \*) Trabalho do Instituto Bacteriologico de São Paulo lido na reunião científica de 30-9-39.

#### Modificação:

A primeira modificação que fizemos no meio de Sauton foi a seguinte: ajustar o pH a 7.8 e adicionar, depois de esterilizado, a cada 5 cc. de meio, 1-2 cc. de infusão concentrada de carne esteril, de pH 7.5, dosada com soda e mais 0,25 cc. de solução de glicose a 10% e de 0,1 a 0,5 cc. de solução de cloreto de sódio a 20%.

Uma segunda modificação foi feita, introduzindo no meio original de Sauton extrato de glandulas, como hipófise, tiroide, ganglio e glandula mamaria, obtido macerando, durante 48 horas, 1 gr. de glandula triturada em 3 cc. de solução fisiológica. Filtrar em vela Chamberland e empregar na quantidade de 0,05 a 0,2 cc. pura ou 0,5 cc. da diluição a 1 por 10.

#### Material:

O material usado para as culturas foi a serosidade de tuberculos não ulcerados. Com seringa esterilizada injeta-se no tuberculo alguns decimos do meio de cultura e aspira-se em seguida o material, sempre escasso. Semeia-se, deixando cair algumas gotas nos tubos de cultura.

Foi usado material de 36 casos de lepra com diagnóstico clinico e bacteriológico bem comprovados, sendo diversos com reação leprótica.

#### Resultado:

Em 30 casos o resultado foi inicialmente positivo, notando-se o crescimento do 4.º ao 6.º dia em diante. Em 4 casos o crescimento foi variavelmente tardio e em 2 o resultado foi inteiramente negativo.

#### Aspecto macroscópico:

Do 4.º ao 6.º dia em diante. Em 4 casos o crescimento foi variavelmente tardio e em 2 o resultado foi inteiramente negativo.

Os grumos são cor de perola (amarelo claro) e apresentam pigmento cinzento. São, ás vêses numerosos. Em 1 caso foram contados 11, dos quais 2 de 2 mm. aproximadamente.

Os grumos foram evidenciados nitidamente em 8 casos, e os véus em 5.

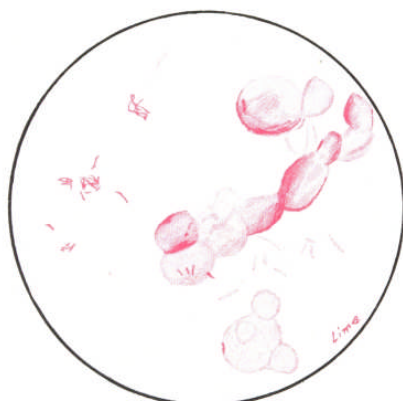
#### Aspecto microscópico:

O exame microscópico dos grumos, após coloração para ácido resistentes, revela bacilos ácido-resistentes em grande numero.

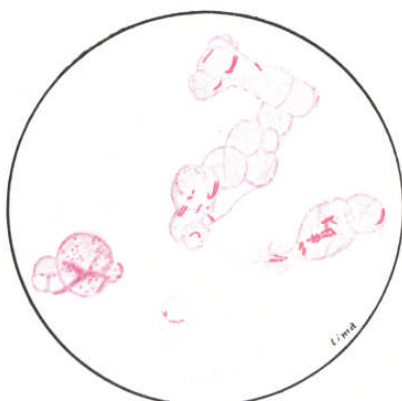
As preparações de material dos véus, além de bacilos ácido-resistentes, revelam células esféricas, igualmente ácido-resistentes, umas repletas de bacilos ácido-resistentes, outras encerrando apenas um bacilo e algumas células cianofilas, parecendo-nos que o citoplasma se apresenta com finas granulações. Essas células dispõem-



Celulas ácido-resistentes contendo finas granulações ácidos-resistentes ou bacilos ácido-resistentes.



Celulas ácido-resistentes agrupadas- algumas contendo bacilos ácidos-resistentes.



Celulas ácido-resistentes com broto.

se, isoladas ou agrupadas e, às véses, dispostas em linha, dando a idéa de micelio gemulante. Nesses agrupamentos observamos umas células maiores que outras, como se fossem células mães. A membrana celular é muito delicada e translúcida. Essa fase foi observada em tempo variavel e perdura de 24 a 72 horas. Depois desaparece, percebendo-se em torno das globias e dos bacilos, uma zona clara que não toma o corante pelo metodo de Gabbet. Tem-se a impressão de que ocorre o amolecimento da membrana, conservando-se, porém, as bacterias congregadas.

Verificámos nas culturas acentuado pléomorfismo. As granulações salientam-se nos primeiros dias, e nas culturas envelhecidas os bacilos tornam-se vacuolados.

Nos meios com glandula mamaria, os bacilos retêm fortemente o corante.

Sub-culturas:

Das culturas obtidas, 3 mantiveram-se em sub-culturas successivas durante 5 mēses, fazendo-se os transplantes cada 8-15 dias.

Nas culturas mais velhas, conservadas na estufa, os bacilos apresentam-se vacuolados, desprovidos de granulações e fracamente corados, como acontece nas culturas velhas do bacilo da tuberculose. Uma vés repicados retomam a vitalidade, com reaparecimento das granulações, corando-se fortemente pela fucsina.

Nas sub-culturas não verificámos os véus. Mesmo os grumos já não são distintos, mas tão sómente notados ao se prepararem os esfregaços. Este fato indica, provavelmente, menor atividade do crescimento.

Fases do crescimento:

No estudo dos casos observados foi-nos possivel acompanhar as fases do crescimento do bacilo. Assim, no caso dum doente de Cunha, que foi o mais típico, semeada a serosidade dum tuberculo no dia 3-7-938, em meio de Sauton modificado, após 72 horas de estufa a 37°, havia bacilos ácido-resistentes isolados e agrupados e tambem bacilos longos, semelhantes a fungos, fracamente corados pela fucsina.

Para controle a cultura foi repicada, em duplicata, no meio de Sabouraud, em agar-sangue e agar-sôro. Uns tubos ficaram em temperatura ambiente, outros foram para a estufa a 37°C. durante 30 dias. Nada vegetou.

Em 15-9-938, fizemos nova preparação da cultura inicial. Observámos aumento de bacilos ácido-resistentes isolados, reunidos em globias e de bacilos longos que se tornaram completamente cianofilos. Repicámos essa cultura em 3-9-938, para o mesmo meio.

Em 8-9-938 nova preparação revelou numerosos bacilos cianófilos capsulados com pequenos corpusculos em torno da parte in-

terna da capsula, e rarissimos bacilos curtos ácido-resistentes tambem capsulados, mas contendo corpusculos bem maiores, semelhantes a coco-bacilos e tambem ácido-resistentes. Não encontrámos outras formas.

Essa observação vem a favor dos autores que admitem um ciclo evolutivo para o bacilo da Lepra.

Conclusão:

Foi tentada a cultura do *Mycobacterium leprae*, em meio de Sauton modificado, em 36 casos de lepra, diagnosticados clinica e bacteriológicamente. Em 30 casos houve cultura inicial a partir do 4.º-6.º dia. Em 4 casos o crescimento foi variavelmente tardio e em 2 casos os resultados foram completamente negativos. Em 3 casos as sub-culturas foram possiveis até 5 meses.

Macroscópicamente as culturas apresentam grumos côr de perola e com pigmentação cinzenta, e, delicados véus na superficie. Os exames microscópicos successivos permitiram evidenciar diferentes fases de crescimento do germe, corroborando a opinião dos autores que admitem um ciclo evolutivo do *Mycobacterium leprae*. Não é possível, ainda, conclusão definitiva, mas, esses resultados nos obrigam a prosseguir.

#### S U M M A R Y

We have tried cultivating, in modified Sauton's medium, ***Mycobacterium leprae*** from 36 clinically and bacteriologically verified cases of leprosy. In 30 cases there was an initial growth from the 4-6th day. In 4 cases, growth was variably belated and twice completely negative results ensued. In 3 cases, subcultures were possible during 5 months.

Macroscopically, the growth presents pearl coloured clots with gray pigmentation and delicate veils on the surface. Successive microscopic examination, brought to evidence different phases of the germ's evolution, thus ascertaining the opinion of those who admit a cycle in the evolution of ***Mycobacterium leprae***.

As it is, one is not able yet to reach a definite conclusion, but these results compel us to proceed with our experiments.

---

#### R E F E R E N C I A

1. SAUTON: C. R. Ac. Sc., 1912, CLV, 860-861.