

O COMPORTAMENTO DO "*MYCOBACTERIUM LEPRÆMURIUM*" NOS TESTES DE REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO E DO TETRAZÓLIO (*)

N. PLANET (**)
B. S. OLIVEIRA JR. (***)

C. M. CARVALHO (***)
A. C. MAURI (***)

A impossibilidade de obtenção de culturas de bacilos da lepra, tanto humana quanto murina, faz com que a única fonte disponível desses germes seja as lesões leprosas por esses agentes produzidas em seus hospedeiros eletivos.

As lesões (lepromas) são riquíssimas em bacilos e, admitindo-se o que parece óbvio que, nestas circunstâncias as bactérias estejam em pleno gôzo de sua capacidade vital, êste material prestar-se-á admiravelmente ao estudo de suas mais importantes propriedades biológicas.

E' estranhável mesmo que êste material sempre disponível tenha, sido tão pouco aproveitado pelos pesquisadores para o estudo das propriedades fisiológicas do bacilo da lepra.

Embora os bacilos de Hansen e de Stefansky não se reproduzam, a não ser nos tecidos que infectam, eles mantêm-se vivos ao menos por algum tempo após a sua separação, o que permite verificações importantes sobre vários aspectos do seu metabolismo, viabilidade, vitalidade, ação de várias substâncias, etc.

Prudhomme ⁵ já indicára esta possibilidade demonstrando que suspensões de *M. lepraemurium*, livres de células e restos de tecidos, agem sobre várias substâncias indicadoras de óxido-redução.

Hanks ⁴, mais recentemente, verificou uma série de fatores que interferem com os mesmos fenômenos. Posteriormente, o mesmo autor ^{3,4}, utilizando material de lepromas de ratos infectados, estudou as relações entre o *M. lepraemurium* e o *M. phlei* pela medida da capacidade de transferência de hidrogênio.

No mesmo sentido realizámos uma série de experiências para verificar o comportamento do *M. lepraemurium* frente a um sistema indicador da ação das dehidrogenases desta bactéria.

(*) Trabalho realizado em parte no Serviço de Pesquisas Científicas do Departamento de Profilaxia da Lepra e, em parte, no Instituto Biológico de São Paulo.

(**) Instituto Biológico de São Paulo.

(***) Serviço de Pesquisas Científicas do D.P.L. do Estado de São Paulo e Fundação Paulista Contra a Lepra.

MATERIAL

Utilizámos suspensões de *M. lepraemurium* preparadas a partir de lepromas subcutâneos ou de lesões viscerais (principalmente do fígado e nódulos peritoniais) de ratos inoculados há 4-7 meses.

Os lepromas subcutâneos ou órgãos foram retirados assépticamente após a morte dos animais em câmara de gás, finamente fragmentados com tesoura e triturados em almofariz de porcelana com cerca de 1/10 do seu volume de soro fisiológico e pequena quantidade de areia fina (isenta de detritos orgânicos). A trituração se fez até que a massa de tecidos tivesse aspecto homogêneo; a seguir juntou-se à massa triturada um volume de soro fisiológico equivalente à 10 vezes o seu volume. Por decantação durante alguns minutos, foram separadas as partículas mais pesadas de areia e o sobrenadante foi centrifugado à baixa rotação (500-1.000 r.p.m. durante 5 minutos). O sedimento foi desprezado e o sobrenadante novamente submetido à centrifugação, porém a 3.500-4.500 r.p.m. durante 30 a 40 minutos. O sobrenadante foi desprezado, isento ou praticamente isento de bacilos; a massa sedimentada foi ressuspensa em soro fisiológico até perfazer o volume do sobrenadante desprezado. Essa operação foi repetida 3 ou 4 vezes, até que, por exame bacterioscópico, não foram encontrados restos de tecido organizados. O sedimento foi então ressuspensa e homogenizado em soro fisiológico em quantidade variável de acôrdo com a concentração bacilar desejada. Neste trabalho empregamos suspensões bacilares de concentrações variáveis, correspondendo aproximadamente aos tubos 6 e 3 da escala de Mac Farland.

MÉTODOS

Para os testes do azul de metileno foi utilizada a técnica de redução do corante de Thunberg, descrita por Cardoso e Almeida¹; no entanto, no decorrer da experiência verificamos que era necessário reduzir a quantidade do indicador, tendo em vista que não nos era possível dispor de suspensões bacilares muito concentradas. Por esse motivo, em todas as experiências realizadas, exceto nas preliminares, as quantidades de azul de metileno foram reduzidas à 0,1 ml. ao em vez de 0,5 ml.

Para os testes de redução do sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio) foi empregado o mesmo método de Thunberg, cuja técnica foi descrita detalhadamente por Cardoso e Almeida ² nos estudos sobre a vitalidade do BCG.

Das experiências anotadas foram feitos contrôles bacteriológicos para verificação da presença de germes banais de contaminação (aeróbios e anaeróbios) e somente foram consideradas as que tiveram o respectivo contrôlo bacteriológico negativo.

RESULTADOS

Nas experiências preliminares verificamos que o tempo de descoramento do azul de metileno, como seria de esperar, dependeu da concentração inicial da suspensão; assim, numa primeira série de experiências com uma suspensão rica em bacilos (correspondente a bacilos provenientes de lepromas subcutâneos e equivalente ao tubo n° 6 da escala de Mac Farland), verificou-se que o descoramento do azul de metileno completou-se após 1 hora, quando se utilizou 1 ml. da suspensão, e 0,5 ml. da solução de azul de metileno. Essa mesma suspensão bacilar diluída 5 vezes (0,2 ml.) frente ao mesmo sistema não provocou descoramento apreciável durante todo o período de observação (5 a 6 horas).

Em outra série de experiências com material também proveniente de lesão subcutânea, resolvemos conservar a quantidade da suspensão bacilar (1 ml. de suspensão correspondente aproximadamente ao tubo n° 5 da escala de Mac Farland) e reduzir a quantidade da solução de azul de metileno a 0,1 ml., o que resultou em apreciável redução do tempo de descoramento (30 minutos).

Essa modificação da técnica permitiu o emprêgo de suspensões bacilares mais diluídas, o que era importante, tendo em vista a pequena quantidade de material disponível. Dêsse modo, empenhamo-nos em nova série de experiências, utilizando apenas 0,5 ml. de suspensão bacilar (tubo n° 3 da escala de Mac Farland) e 0,1 ml. da solução de azul de metileno. Nestas condições pudemos observar a redução do indicador em cerca de 3 horas. A suspensão bacilar utilizada havia sido preparada a partir de lesões viscerais.

Com a técnica da redução do sal de tetrazólio foi realizada apenas uma série de experiências com suspensão bacilar correspondente ao tubo n° 6 da escala de Mac Farland e proveniente de lesões subcutâneas.

Verificamos que o teste é positivo, isto é, o *M. leppraemurium* tem capacidade de reduzir o tetrazólio, porém, o tempo necessário para que a reação se processe é muito longo. Em nossos ensaios verificamos que são necessárias 18 horas para que a reação se desenvolva, nas condições em que os executámos. Além disso, foi verificado que a quantidade de formazana produzida é proporcional à concentração bacilar. Executámos nossas experiências com apenas 3 concentrações bacilares, correspondentes a 0,2, 0,3 e 0,5 ml. da suspensão inicial; ao fim de 18 horas de contato em banho-maria a 37°C., a quantidade de formazana indicada pela côr vermelha, era apenas perceptível no tubo contendo 0,2 ml. da suspensão bacilar, evidente no tubo com 0,3 ml. e muito nítida no tubo contendo 0,5 ml.

Tôdas as experiências realizadas foram feitas em duplicata, com idênticas concentrações bacilares, porém esterilizadas pelo calor (100°C. durante 15 minutos) e serviram como contrôle. Do mesmo modo foram feitos contrôles com os líquidos de suspensão dos bacilos para a verificação de

qualquer poder redutor dos mesmos. Esses contrôles (com bacilos mortos e líquidos sobrenadantes) não demonstraram nenhum poder redutor, seja nos testes do azul de metileno, seja nos testes do tetrazólio.

DISCUSSÃO

Nossas experiências confirmaram os resultados obtidos por Prudhomme⁵ e por Hanks^{3, 4}, que demonstraram claramente possuir o *M. lepraemurium* dehidrogenases evidenciáveis em diversos sistemas de óxido-redução.

Em nossos trabalhos procuramos estudar o comportamento do *M. lepraemurium* através dos testes do azul de metileno e do tetrazólio, tentando estabelecer as condições mais importantes para a sua utilização.

As experiências permitiram concluir com bastante segurança que estes métodos oferecem excelente meio de estudo para a biologia do bacilo de Stefansky.

Certas dificuldades apresentam-se na padronização dos referidos testes e pensamos sejam necessárias novas experiências para sua perfeita utilização. Não obstante, pelos resultados por nós obtidos, pudemos estabelecer os principais fatores que integram estes métodos. Verificamos que a concentração de bacilos é fator predominante, dela dependendo o tempo de decoloramento do azul de metileno ou a formação de formazana. A procedência da suspensão bacilar é indiferente, pois obtivemos resultados concordantes utilizando bacilos de lesões cutâneas e viscerais.

Dada a relativa escassez ou dificuldade na obtenção dos bacilos, a questão do seu emprêgo "econômico" é muito importante, sendo este o motivo que nos levou a reduzir a quantidade de azul de metileno. Esta medida proporcionou testes mais rápidos e nítidos do que quando usamos quantidades maiores do reagente.

Em nossas experiências tivemos a oportunidade de verificar de maneira bastante significativa que a "vitalidade" do *M. lepraemurium* decresce sensivelmente após alguns dias de conservação na geladeira em suspensão fisiológica. Em duas séries de experiências, uma com material colhido e testado no mesmo dia e outra com material colhido há 10 dias e conservado em geladeira, pudemos observar diferenças nítidas de comportamento quanto à sua capacidade de redução do azul de metileno; a última amostra revelou menor capacidade redutora.

A utilização deste método oferece possibilidade de se determinar a viabilidade dos bacilos de lepra murina em suspensão.

E' digno de menção o tempo relativamente longo necessário para que o *M. lepraemurium* revele poder redutor do azul de metileno e capacidade de transformar o tetrazólio em formazana, comparativamente aos resultados obtidos por outros autores, com outros germes ácido-resistentes, —

BCG, *M. phlei*, etc. — que proporcionalmente têm poder de descolorar ou transformar muito mais rápido.

Se a explicação deste fato depende realmente de um metabolismo mais baixo do *M. lepraemurium* ou de condições particulares relativas à superfície do bacilo, ainda é uma questão a ser resolvida.

CONCLUSÕES

1. O *Mycobacterium lepraemurium* é dotado da capacidade de redução do azul de metileno e de transformação do tetrazólio em formazana;
2. Os testes do azul de metileno e do tetrazólio desenvolvem-se muito lentamente;
3. São diretamente proporcionais à concentração de germes e decrescem com o tempo de conservação das suspensões na geladeira.

SUMMARY

Using *M. lepraemurium* suspensions obtained from leproma of rats inoculated by subcutaneous route or from nodules of the peritoneal cavity, the AA. have tested the capacity of these bacilli in reduce the methylene blue and formation of formazan from the tetrazolium.

The time or intensity of reduction of methylene blue or formation of formazan are proportional to the concentration of bacilli in the suspensions and is increased with the storage in the refrigerator at PC.

In comparison with tests performed upon other acid fast bacilli the ones with *M. lepraemurium* are developed very slowly.

REFERÊNCIAS

- 1 — Cardoso, D. M. & Almeida, W. F. — Padronização do BCG — Rev. Brasil. Tuberc., **18**:1, 1950.
- 2 — Cardoso, D. M., Nazario, G., Amaral, J. P., & Almeida, W. F. — Padronização do BCG. II. Rev. Brasil. Tuberc., **20**:89, 1952.
- 8 — Hanks, J. H. — Measurement of the hydrogen transfer capacity of mycobacteria. J. Bact., **62**:521, 1951.
- 4 — Hanks, J. H. — The biological significance of the hydrogen transfer capacity of murine leprosy bacilli. J. Bact., **62**:529, 1951.
- 5 — Prudhomme, R. O. — Moyen de reconnaître in vitro si le bacille de Stefansky est mort ou vivant. Ann. Inst. Pasteur, **61**:513, 1938.