

INSTITUTO DE HIGIENE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO
DIRETOR: PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

BOLETIM N. 84

**O FILTRADO DO MYCOBACTERIUM DE STEFANSK
NA LEPRO MURINA**

J. M. GOMES
ASSISTENTE DE CLÍNICA DO INSTITUTO
DE HIGIENE DE SÃO PAULO

IMPRENSA OFICIAL DO ESTADO
São Paulo ————— 1945

BOLETINS DO INSTITUTO DE HIGIENE

- N.º 1 — Sobre algumas medidas antimaláricas em Malaia (Dr. S. T. Darling) — 1919.
- N.º 2 — Pesquisas recentes sobre a opilação na Indonésia (Dr. S. T. Darling) — 1919.
- N.º 3 — Intoxicação pelo Betanaftol no tratamento da uncinarirose (Dr. W. G. Smillie) — 1920.
- N.º 4-5 — O predomínio da *Leptospira ictero-hemorrhagiae* nos ratos de São Paulo — Bacilos semelhantes aos da peste encontrados nos ratos da cidade de São Paulo (Dr. W. G. Smillie) — 1920.
- N.º 6 — Ensaio de calorimetria alimentar (Drs. G. H. de Paula Souza e L. A. Wanderley) — 1921.
- N.º 7 — Existência e disseminação do *Ancilostoma duodenale* no Brasil (Dr. W. G. Smillie) — 1922.
- N.º 8 — A febre tifóide em São Paulo, e o seu histórico (Dr. Emílio Ribas) — 1922.
- N.º 9 — Profilaxia do impaludismo no Brasil (Dr. Belisário Penna) — 1922.
- N.º 10 — Profilaxia das doenças venéreas (Dr. E. Rabello) — 1922.
- N.º 11 — Investigações sobre a uncinarirose (Dr. W. G. Smillie) — 1922.
- N.º 12 — Estudo epidemiológico da febre tifóide em São Paulo (Dr. F. Borges Vieira) — 1922.
- N.º 13 — Estudo dos componentes do óleo essencial de quenopódio. Sua aplicação na profilaxia da ancilostomose (Dr. S. B. Pessoa) — 1923.
- N.º 14 — Valor da desinfecção na profilaxia das doenças infectuosas (Dr. F. Borges Vieira) — 1923.
- N.º 15 — Alimentação na idade escolar e pré-escolar (Dr. A. de Almeida Jor.) — 1923.
- N.º 16 — Investigações sobre alguns métodos para avaliação da capacidade respiratória (Dr. A. de Almeida Jor.) — 1923.
- N.º 17 — O Estado de São Paulo e alguns dos seus serviços de saúde pública (Dr. G. H. de Paula Souza) — 1923.
- N.º 18 — Algumas considerações sobre a mortalidade infantil em São Paulo (Dr. G. H. de Paula Souza) — 1923.
- N.º 19 — Serviço de Estatística Sanitária (Dr. G. H. de Paula Souza) — 1924.
- N.º 20 — Sugestões para a melhoria da Legislação Sanitária Estadual sobre gêneros alimentícios (Drs. G. H. de Paula Souza e Nicolino Morena) — 1924.
- N.º 21 — A prova de Schick na escola (Dr. F. Borges Vieira) — 1924.
- N.º 22 — A educação higiênica na escola (Dr. Nuno Guerner) — 1924.
- N.º 23 — Contribuição ao estudo das reações biológicas na cisticercose (Drs. Gastão Fleury da Silveira, Samuel B. Pessoa e Clóvis Correia) — 1927.
- N.º 24 — Portadores de germes. Pesquisas de laboratório sobre as febres tifóide e paratifóide em São Paulo (Dr. A. Santiago) — 1927.
- N.º 25 — Sobre a reação de Kahn (Drs. F. Borges Vieira e Gastão Fleury da Silveira) — 1927.
- N.º 26 — Colesterinemia na lepra (Drs. J. M. Gomes, Carlos Leitão Filho e Alexandre Wancolle) — 1928.
- N.º 27 — Lepra? (Dr. J. M. Gomes) — 1928.
- N.º 28 — Tentativa de seleção profissional (Dr. Monteiro de Camargo) — 1928.
- N.º 29 — Considerações sobre a epidemiologia de algumas doenças transmissíveis na cidade de São Paulo — Brasil (Dr. F. Borges Vieira) — 1928.
- N.º 30 — Sobre a nova técnica da reação de Kahn (Dr. Gastão Fleury da Silveira) — 1928.
- N.º 31 — Modificação do poder coagulante do soro sanguíneo no decorso da febre tifóide (Dr. Benjamin Ribeiro) — 1928.
- N.º 32 — Contribuição ao estudo das reações biológicas na cisticercose (II) — (Drs. Fleury Silveira e S. B. Pessoa) — 1928.

INSTITUTO DE HIGIENE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO
DIRETOR: PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

BOLETIM N. 84

O FILTRADO DO MYCOBACTERIUM DE STEFANSK NA LEPRO MURINA

J. M. GOMES

ASSISTENTE DE CLÍNICA DO INSTITUTO
DE HIGIENE DE SÃO PAULO

IMPrensa OFICIAL DO ESTADO
São Paulo ————— 1945

O FILTRADO DO MYCOBACTERIUM DE STEFANSKI NA LEPRO MURINA

INTRODUÇÃO

Nossos estudos sobre lepra murina começaram em 1924. Investigávamos, então, qual seria a incidência da doença espontânea nos ratos de São Paulo, continuando, assim, um inquérito começado há anos por Pais Azevedo.

Não era a pesquisa pura e simples de uma epizootia banal o que nos interessava. Acompanhando o que realizava Marchoux em seu laboratório, procurávamos também extrair o maior proveito possível desses conhecimentos para aplicá-los à lepra humana.

O organismo tem recursos apropriados a opôr aos parasitas que o invadem, e as reações não são tão individualizadas a ponto de se não arregimentar em grupos.

Assim as doenças de Hansen e de Stefanski. A aproximação faz-se pelo grau de parentesco dos micro-organismos e pelo modo mais ou menos equivalente de reagir ao seu parasitismo.

Curioso é, porem, que na lepra humana, por exemplo, as reações de tecido oferecem tão grandes dissimilaridades, como se estivessem em ação germes diferentes.

A estrutura histológica da lepra maculosa é uma, a da lepra tuberculóide é outra, e muito diversa é a da forma lepromatosa.

O primeiro caso caracteriza-se apenas por certo grau de inflamação crônica e os bacilos são raros; no segundo caso a reação do tecido é mais intensa e mais difícil ainda o achado de bacilos; no terceiro caso são abundantes as células de Virchow e os bacilos incontáveis.

Estará a reação de tecido subordinada à morfologia ou ao número restrito de bacilos? Ou será relativo grau de imunidade natural que degrada o germe a ponto de reduzi-lo às proporções granulares?

Seja o que for. O que por ora interessa é que as granulações bacilares existem e nada impede que muitas delas sejam filtráveis, como são filtráveis certos bacilos.

Foram estas considerações que orientaram nosso espírito para o estudo das formas filtráveis do M. de Stefanski, cuja importância parece decisiva na infecção leprotica.

Nas lesões incipientes da lepra não se encontra bacilo ou seu número é tão pequeno que, responsabilizá-lo pela extensão das máculas presentes é conferir-lhe tão alto grau de virulência que sabemos ele não possuir.

E' mais aceitavel, pois, a hipótese da existência de formas abaixo da visibilidade, formas que, na opinião de vários pesquisadores, constituem a parte ativa da infecção

EXISTE REALMENTE UM "ULTRA-VIRUS"?

Descrito pela primeira vez por Cardoso Fontes, em 1910, o estado "ultra-virus" ou melhor, infra-microbiano, como chama Ch. Nicolle, das bactérias não é ainda aceito pela universalidade dos bacteriologistas.

Entre os muitos pesquisadores que lhe saíram ao embargo salientam-se, pelo rigor da técnica e número copioso de experiências os sábios americanos E. J. Walker e M. Sweeney ("Jour. Infect. Dis.", vol. 54 — 1934)

Fizeram uso dos filtros Seitz, Berkefeld N, V e W, Chamberland L² e L³.

Em 41 filtrados do bacilo da tuberculose encontraram bacilos ácido-resistentes em 25, isto é, 61%.

Acham que o meio da suspensão, o tempo, a pressão da filtração e a quantidade do líquido não exercem grande papel na passagem dos bacilos.

As pesquisas de Fontes já haviam assinalado que a inoculação do filtrado não dava lugar à tuberculose típica, com lesões viscerais, mas encontrava-se hipertrofia dos gânglios linfáticos e do baço.

As experiências de Walker e Sweeney concordam plenamente com as de Fontes, Calmette e associados, no que se refere ao tipo da tuberculose, mas, dizem os autores americanos que, mesmo que se não possa excluir a passagem de um "ultra-virus", juntamente com os bacilos ácido-resistentes, através dos filtros, acham desnecessária a aceitação de sua existência hipotética para explicar os fenômenos observados e que o problema da infecciosidade do filtrado é uma simples questão de interpretação.

A doutrina do "ultra-virus" veio trazer um abalo muito grande na bacteriologia, na epidemiologia e na clínica e, quaisquer que sejam suas consequências, não podemos ficar siderados nesse impasse.

Membro da grande família dos Mycobacteria, era natural que estas pesquisas fossem também levadas ao M. de Hansen, mas, não se prestando esta bactéria a infecções experimentais de laboratório, por falta de um animal sensível, os estudos se conduziram ao M. de Stefanski, o responsável pela lepra murina.

Creio ter sido Markianos ("An. Inst. Pasteur", março de 1931) o primeiro a fazer estudos de filtrados de lepra murina.

Suas conclusões, de que participou Marchoux, são pela existência de um "ultra-virus", que evoluiria para formas granulares, constituindo fases de uma vida cíclica.

John Lowe ("Indian Jour. Med. Res.", out. 1937, vol. XXV, n. 2) procurou verificar as conclusões de Markianos, rodeando-se de todas as precauções necessárias para se livrar dos erros, quase inevitáveis, no estado atual dos conhecimentos da física e da química.

Começa por advertir que se encontram normalmente nos gânglios de animais sadios bacilos ácido-resistentes que poderiam ser tomados pelo germe evoluído de nossos filtrados.

Cooper e Petroff (Op. cit. "Jour. Infect. Dis.") encontraram-nos em cobaias normais, na proporção de 33%.

Temo-lo também observado comumente em gânglios de camundongos normais.

Lowe trabalhou com os filtros L², L³ e L⁵. Inoculou 27 ratos com filtrados em L², 26 em L³ e 12 em L⁵.

Na primeira série 2 ratos revelaram bacilos ácido-resistentes; na segunda 2 ratos desenvolveram infecção generalizada; na terceira, nenhum.

Inicialmente acha que, para se considerar positiva uma experiência, é necessário que haja, pelo menos, 50% de positividade.

Nega, portanto, a existência da forma filtravel no M. de Stefanski, explicando os resultados positivos por erros experimentais.

As conclusões de Lowe parecem categóricas demais para pesquisas biológicas. Ninguém nega a afinidade do M. de Stefanski para o rato, e muitíssimas vezes os murideos passam incólumes de uma inoculação com germes virulentos.

Em todos os dramas da patologia há sempre a considerar o "terreno", fator quase sempre decisivo nas infecções.

Outros autores igualmente respeitáveis têm investigado neste setor, como Peltier e Mmlle. Choucroum ("Bull. Soc. Path. Exot.", fev. 1936) e Yoshima Watanabe ("The Kitasato Arch. of Exp. Med.", out. 1936), mas detiveram-se mais nos bacilos que passaram através dos filtros, e a cuja presença atribuem as lesões encontradas. Suas experiências não chegam a invalidar a idéia do estado infra-microbiano.

Por nossa parte andamos também estudando o debatido problema. Em 19 animais inoculados com filtrado de leproma murino, 16 foram positivos ("Rev. Bras. de Lepr.", dez 1936). Houve, portanto, mais de 50% de positividade, condição que Lowe apresenta para tomar em consideração a hipótese da fase infra-microbiana.

PROPRIEDADE DE "ULTRA-VIRUS"

Há um divórcio essencial entre os pesquisadores que aceitam e os que negam a existência do "ultra-virus" ou a desnecessidade da hipótese de sua existência.

Os primeiros, sem desconhecer a passagem de germes organizados através dos filtros, fundam sua doutrina mais nos fatos da patologia do que no rigor das filtrações; os segundos dão mais importância à permeabilidade dos filtros, porque têm as vistas fixadas no velho postulado de Koch — "uma forma especial de germe é associada a cada doença e esta forma fica imutável, sem relação com o número de vezes que a infecção seja transferida de um animal a outro".

Vaudremer ("Le Mouvement Sanitaire", abril de 1935) assim se expressa a respeito do "ultra-virus": "O germe possui em patologia experimental e humana uma qualidade virulenta que lhe é peculiar e determina uma infecção tuberculosa particular, diferente da provocada pelo bacilo da tuberculose, classicamente conhecida."

Com efeito, desde Fontes se sabe que os animais inoculados com o filtrado do bacilo de Koch apresentam infecção ganglionar e caquexia.

Os que combatem a existência do “ultra-virus” argumentam, entretanto, que esses fenômenos são devidos aos venenos difundidos no filtrado.

E assim o problema tem continuado no mesmo pé à espera de novos progressos a serem realizados, talvez, em outros setores da Ciência.

Entende Vaudremer que o “virus” não representa papel dominante na tuberculose-doença, o que vale dizer, nada significa em relação às medidas profiláticas contra a infecção.

Por outro lado, verificou-se que nos 3 primeiros meses os filhos de mãe tuberculosa encerram o “virus” filtravel no sangue e, como Debré e Delong (“C. R. de Soc. de Biol.”, T. XCI, pág. 1.242 — Cl. XII, 1924) observaram a passagem de anti-corpos tuberculosos da mãe à criança, anti-corpos que persistem no sangue do recém-nascido, em taxa decrescente, precisamente 3 meses, os autores franceses foram levados a admitir uma resistência anti-tuberculosa transmitida e originada do “ultra-virus”.

J. Valtis e F. van Deinse (“An. Inst. Pasteur”, julho-dezembro de 1934, n. 1, T. LXII) publicaram interessante pesquisa sobre elementos ativantes da infecção bacilar.

Observando que as substâncias céreo-gordurosas do bacilo de Koch, extraídas pela acetona, agravam a tuberculose experimental, procuraram saber se essa ação se exerceria sobre os elementos filtraveis do germe tuberculoso, que habitualmente não são suberculígenos, nem cultivaveis.

Demonstraram que injeções subcutâneas do extrato acetônico do bacilo de Koch favorecem a formação de lesões tuberculosas nas cobaias precedentemente inoculadas com os elementos filtraveis do bacilo de Koch e tornam possível a obtenção de culturas.

Os bacilos isolados das cobaias assim tratadas, cultivados em meios com ovo, têm o aspecto liso e gorduroso, lembrando as culturas do bacilo aviário.

Os germes são curtos e lisos.

Injetados na cobaia, dão lesões ganglionares, como as do “virus-filtravel”, e curaveis; no coelho dão uma tuberculose tipo Yersin.

Continuando por alguns meses o tratamento pelo extrato acetônico e semeando os órgãos dos animais, obtêm-se culturas

rugosas, tipo "mamífero", e virulentas para a cobaia e para o coelho.

A questão da virulência, ligada às culturas lisas ou rugosas, tem merecido estudos interessantes.

Vários autores americanos apresentam conclusões que discrepam das conclusões dos autores franceses.

Kenneth Smithburn ("Am. Review of Tub.", nov. de 1937, n. 5) retomou o estudo e demonstrou que as variantes coloniais derivadas de tipos avirulentos são avirulentas e que o pH do meio de cultura é o único fator que controla a forma da colônia e virulência.

As pesquisas de Valtis e van Deinse são muito interessantes, não só do ponto de vista doutrinário, como também porque demonstram que há uma substância capaz de induzir o filtrado bacteriano a grandes modificações.

Parece que ainda se não retirou destas pesquisas tudo o que elas podem dar, mesmo como simples hipóteses de trabalho.

Os autores que combatem o "virus" não poderão dizer, à vista destes resultados, que os venenos bacilares é que foram exaltados, mas ninguém lhes nega o direito de afirmar que, se alguns bacilos atravessaram o filtro, foram eles que receberam ativação pelo extrato acetônico e as culturas obtidas derivariam desses bacilos.

Apenas não poderão negar que o tipo de infecção é outro e idêntico ao dos que afirmam que o "virus" tem sua patologia própria.

E na lepra?

Na lepra, que eu saiba, muito pouco se tem feito para demonstrar uma patologia própria ao "virus".

A não ser Muir e Chatterjee, que lançam timidamente a hipótese da existência de um virus localizado na extremidade dos nervos periféricos, constituindo o marco inicial da infecção, e J. Manalang, que afirma ser um virus a parte ativa da infecção leprotica, poucos mais se referem ao assunto.

F. Velasco ("Rev. Phil. Med. & Pharm.", set. 1934) estudou 27 famílias de leprosos nas quais só 7 progenitores eram bacteriologicamente positivos.

Nessas 27 famílias havia 125 crianças, das quais 80 foram examinadas. Destas, 61, ou seja, 76, 3% eram leprosas.

E conclue: "Os pais clinicamente positivos e bacteriologicamente negativos albergam provavelmente uma forma invisível ou anacido-resistente do bacilo, mas aparentemente podem transmitir a doença, como os bacteriologicamente positivos".

Tratando-se de clínica humana, em que dificilmente se podem conhecer as relações de convivência, uma afirmação destas tem de ficar sob a caução de uma condicional.

Estes problemas só podem ser resolvidos, de fato, por experiências rigorosas de laboratório.

Há alguns anos iniciamos estudos sobre a inoculação de filtrados do M. de Stefanski (filtro Seitz), controlando as experiências com a inoculação de bacilos lavados e centrifugados ("Rev. Bras. de Lepr.", dez. de 1936).

Os animais foram sacrificados ou morreram de 14 a 122 dias.

Não obtivemos um caso sequer de lepra progressiva. A infecção foi num crescendo até mais ou menos 60 dias e declinava para desaparecer do 3.º ao 4.º mês.

Muitos foram os ratos que morreram de caquexia.

Os controles desenvolveram infecção mais branda, se é que os bacilos encontrados não foram os mesmos inoculados, porque, fazendo os lepromas em glicerina e água destilada, partes iguais, durante 5, 6, 11 e 30 dias, é possível que os bacilos houvessem perdido a virulência.

Esta circunstância é tanto mais de aceitar, quanto a maior quantidade de germes obtida foi com a inoculação do tecido que só esteve 5 dias na glicerina.

Há, portanto, no bacilo de Stefanski uma forma granular que resiste à glicerina e passa através do filtro Seitz.

Inoculamos nos ratos um filtrado que, se por ventura encerrassemos bacilos, estes bacilos estariam mortos ou sem virulência, e a multiplicação de germes, que se verificou, fez-se à custa das granulações e não dos poucos bacilos que acaso passaram através do filtro.

Seu estado precário, fartamente demonstrado nos controles, não poderia permitir multiplicação num organismo sadio.

Mais tarde ("Rev. Bras. de Lepr.", março de 1938) repetimos com material recente a mesma pesquisa, empregando desta vez a via ocular.

O controle consistiu na suspensão do bacilo lavado, mais ou menos 1 bacilo por campo microscópico.

Até o 10.º dia só encontramos bacilos ácido-resistentes nos animais que receberam instilação do filtrado. Os controles começaram a revelar granulações ácido-resistentes no 10.º dia.

Mas há ainda uma objeção: quem nos dirá se os germes encontrados nos ratos inoculados com filtrados não são bacilos ácido-resistentes saprófitas?

Em setembro de 1938 ("Rev. Bras. de Lepr."), fazendo pesquisas sobre a eliminação de "virus" na lepra murina, inoculamos filtrado da mucosa nasal de ratos previamente inoculados com filtrado de leproma.

Em 15 animais, 7 revelaram bacilos ácido-resistentes nos gânglios linfáticos: 5 foram duvidosos e 3 negativos.

A inoculação de filtrado da mucosa nasal de ratos "normais" sempre resultou negativa.

Parece forçar demais o fator "coincidência", dizendo que eram saprófitas banais os bacilos ácido-resistentes da experiência.

Em relação às pesquisas de Valtis e van Deinse, respeito aos extratos acetônicos do bacilo de Koch, sabemos hoje que a substância corante dos Mycobacteria é constituída de carotenóides.

Esta substância parece exercer papel importante na vida microbiana.

Na lepra tuberculoide, sabem-no todos, não se encontram bacilos ou os bacilos são raros. Tratando doentes de lepra tuberculoide com uma suspensão de carotenóides ("Tratamento da lepra à luz de novas idéias", J. M. Gomes, 1941) observamos logo às primeiras injeções, forte congestão das lesões e grande cópia de bacilos ácido-resistentes lisos, mostrando assim que a lesão é determinada por outra forma microbiana que não a bacilar e a evolução fez-se ao influxo ativante do carotenóide.

A RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA EM BACTERIOLOGIA

Sabe-se desde os primórdios da bacteriologia que os raios solares exercem ação bactericida e que os raios ultra-violetas são os mais poderosos agentes deste fenômeno.

Os resultados dependem da intensidade luminosa e do tempo de exposição.

Uma irradiação curta, incapaz de heliocução, determina apenas ao micróbio a perda de muitas de suas propriedades secretoras, o que certamente se refletirá na própria morfologia.

As toxinas resistem muito mais aos raios ultra-violetas

F. Arloing e Dufaut observaram atenuação do "virus" filtravel da tuberculose sob a ação dos raios U. V.

Os raios de onda curta já têm sido aproveitados no preparo de vacinas. Aplicadas imediatamente após a irradiação, não há fenômeno geral ou local importante, mas, se se deixarem os bacilos em maceração no soro fisiológico, formam-se produtos tóxicos.

IRRADIAÇÃO DOS FILTRADOS

Continuando nossas pesquisas em vista da demonstração de um estado granular filtravel no M. de Stefanski, ("Brasil-Médico", 28-6-941) submetemos filtrados de lepromas de ratos à irradiação U. V..

Técnica:

Não tendo à mão placas de quartzo, que deixam passar todas as radiações U. V., usamos o vidro comum, que praticamente as absorve todas, a partir de 320 milimicrons para baixo.

Assim, nossa experiência aproveitou apenas a pequena margem que vai de 320 a 390 milimicrons, e o máximo de ação abiótica encontra-se entre 260 e 270.

O pH do líquido pode variar, sem grandes perturbações, segundo Saidmann, de 4.5 a 7.5.

O material foi sempre suspenso em sol, fisiológica.

R. O. Prudhomme ("Intern. J. of Lepr.", jan.-março 1938) estudou a ação dos raios U. V. sobre o M. de Stefanski, fazendo-os atravessar uma placa de quartzo, isto é, aproveitando sua totalidade..

Antes, porém, procurou verificar a resistência de uma cultura de 24 horas de Estafilococo, suspensa em sol. fisiológica, reduzida à opacidade de 50° no fotometro V. Y. B.

A esterilização deu-se em 15 segundos, a 20 centímetros do foco.

Seguindo a mesma técnica com o M. de Stefanski, verificou que este micro-organismo perde a ação patogênica para o rato em 2 minutos.

Pelas lavagens e centrifugações sucessivas, é de presumir que seu material encerrasse exclusivamente bacilos.

Como as condições em que nos colocamos eram diferentes, começamos também por verificar a ação abiótica dos raios U. V. sobre uma cultura de Estafilococo dourado, empregando apenas as radiações mais próximas da luz visível (320 a 390).

A cultura era recente, de 11 horas, suspensa em sol. fisiológica e diluída a 200 milhões por cc. Encerrou-se em ampolas de vidro de 2 cc.

As irradiações duraram 5, 10, 15 e 20 minutos à distância de 20 centímetros.

Semeado o material em gelose inclinada, só deixou de crescer o que foi exposto durante 20 minutos.

Tomamos depois leproma de rato que fôra sacrificado havia poucas semanas e estava conservado em parafina. Triturado no gral e suspenso em sol. fisiológica, filtramo-lo em papel, para desembaraçar o material dos fragmentos de tecidos. Filtramos depois em Seitz e só foi aproveitado o resíduo depositado no disco de amianto, após centrifugações sucessivas (bacilos lavados).

A suspensão bacteriana — mais ou menos 10 bacilos por campo microscópico — foi inoculada em camondongos — 0,5 cc. em cada — após irradiação por 10, 15, 20 e 25 minutos, a 20 minutos do foco (lâmpada Hanovia, 110 volts).

Apenas no 36.º dia de inoculação encontramos bacilos num camodongo que recebera material irradiado durante 10 minutos.

Passamos, então, a estudar a ação dos raios U. V. sobre o filtrado do M. de Stefanski.

As irradiações duraram 5, 10 e 15 minutos.

Em 37 animais inoculados houve 10 positivities, ao passo que os contrôles, não irradiados, só deram 1 caso positivo.

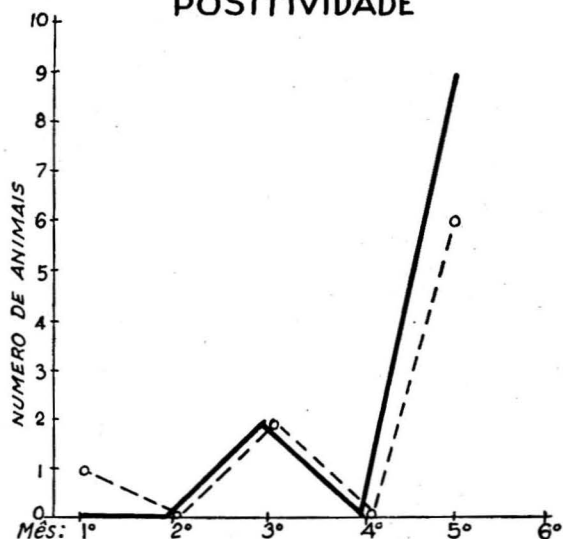
Releva ainda observar que só numa experiência trabalhamos com material recente. Nas outras o filtrado encontrava-se nos limites finais de atividade.

Nossas conclusões foram as seguintes: os elementos filtráveis do M. de Stefanski resistem à irradiação U. V. durante 15 minutos, nas condições de nossa experiência. A ação exercida até essa dosagem foi ativante, isto é, a evolução fez-se mais apressadamente, mas os bacilos evoluídos têm fraca virulência e são logo destruídos. Mesmo fazendo agir sobre os animais causas debilitantes, como a dieta esterilizada e a refrigeração, não foi possível conferir, não digo a lepra murina, mas sobrevida prolongada ao germe.

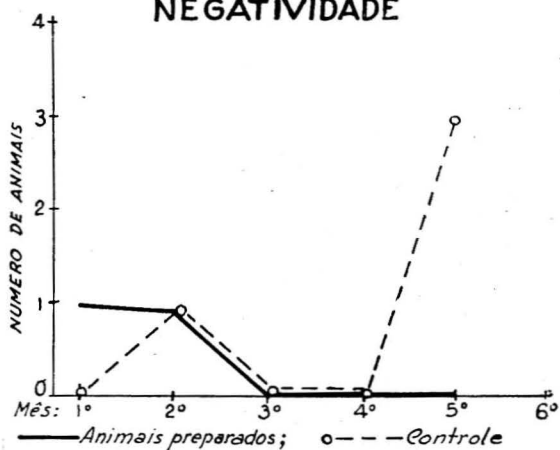
Mais ainda: a resistência do filtrado é superior à do bacilo, fato que se deve incorporar aos argumentos que pleiteiam pela existência de uma fase infra-microbiana na ciclogenia do M. de Stefanski, porque, mesmo que hajam passado alguns bacilos através do filtro, a irradiação U. V. os inutilizou.

QUADRO I — (INTERVALO DE 60 DIAS)

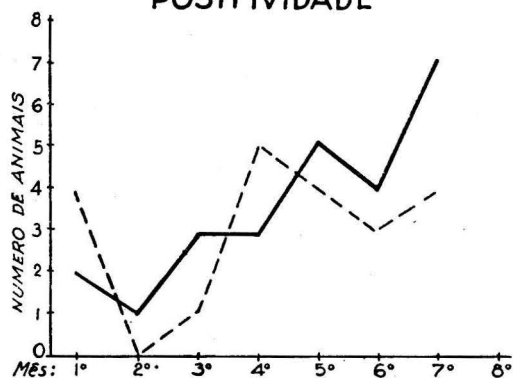
POSITIVIDADE



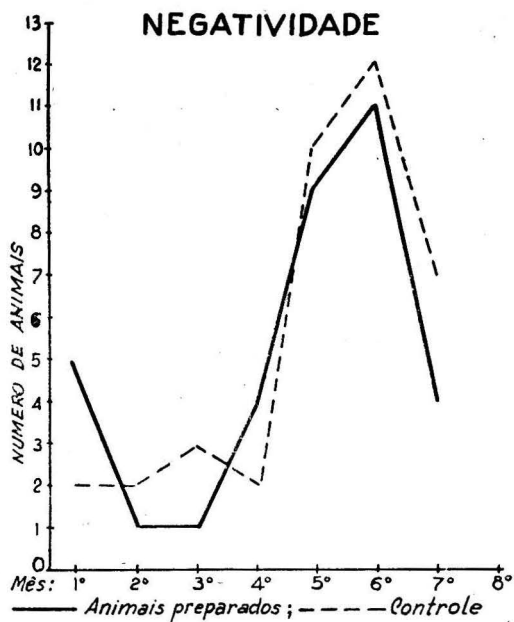
NEGATIVIDADE



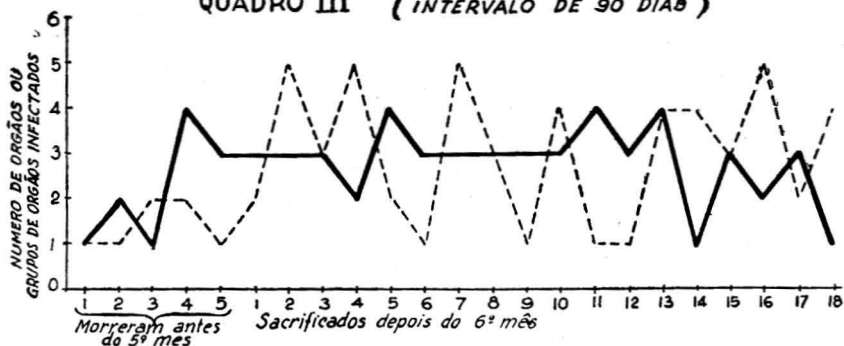
QUADRO II (FILTRADO IRRADIADO) POSITIVIDADE



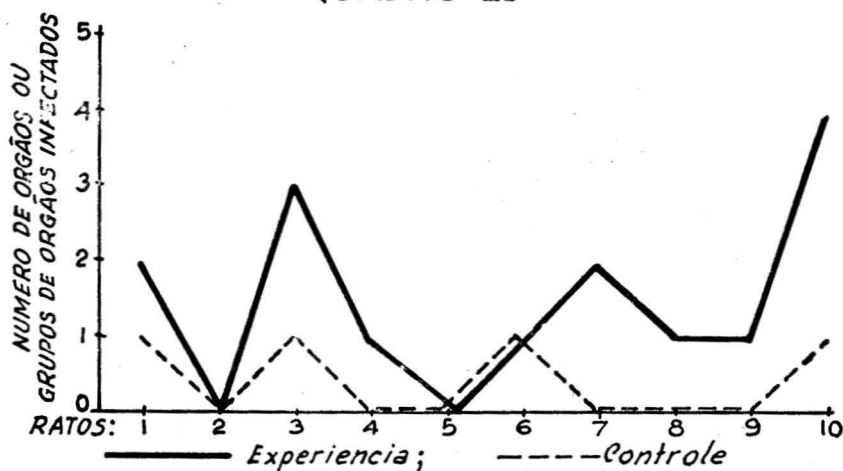
NEGATIVIDADE



QUADRO III (INTERVALO DE 90 DIAS)



QUADRO IV



QUAL A FUNÇÃO DO FILTRADO?

Demonstrada, assim, no M. de Stefanski a existência de uma forma granular, que passa através do filtro de Seitz, forma com a qual não conseguimos desenvolver a lepra murina progressiva, qual será sua função?

Levando em consideração que, 2 meses depois da inoculação do filtrado é que se encontra maior número de bacilos evoluídos, injetamos, após esse tempo, com material infectante ativo, camondongos previamente preparados por filtrados.

O resultado vai expresso no Quadro I, cuja análise será feita depois.

Repetimos depois a experiência, intervalando desta vez as inoculações do filtrado e material infectante de 90 dias.

A pesquisa foi realizada com 30 ratos, levando cada um 1 cc. de filtrado. A suspensão bacteriana encerrava mais ou menos 50 germes por campo microscópico.

Alguns ratos morreram antes de inoculada a suspensão bacteriana. Outros antes do fim da experiência, que deveria ser de 6 meses.

Como já observáramos, o filtrado é tóxico. Morreram 10 ratos da experiência e 3 contrôles.

Uma vez morto um rato, sacrificávamos outro da série correspondente.

Até o 5.º mês não se observou leproma em qualquer das séries, mas a infecção foi mais copiosa e maior a dispersão de germes nos ratos da experiência.

Dáí por diante, a quase totalidade dos ratos apresentava leproma na fossa inguinal direita, em geral mais volumoso na série da experiência. Em compensação, a dispersão de germes foi maior nos contrôles.

O Quadro que adicionamos (Quadro III) difere do I, porque nele desprezamos o fator tempo.

As linhas horizontais representam grupos de órgãos infectados (gânglios inguinais direitos, esquerdos, axilares direitos e esquerdos, fígado, baço, mucosa nasal), cada um deles corresponde a uma linha e cada coluna vertical representa um rato.

Vê-se que a infecção lavrou mais intensa e rapidamente nos animais da experiência, no princípio; depois equivale-se em ambos, havendo, entretanto, a impressão de relativa proteção nos ratos da experiência, porque, se é verdade que o leproma foi quase sempre maior nestes casos, a dispersão dos germes foi menor.

FILTRADOS IRRADIADOS

Verificado que o bacilo evoluído do filtrado irradiado tem o desenvolvimento mais precoce e a vida mais breve, sendo logo destruído pelo organismo, procuramos indagar o seu comportamento relacionado com a inoculação de material ativo.

I Experiência:

Tomamos 20 ratos mais ou menos da mesma idade, submetidos durante várias gerações à mesma alimentação. Inoculamos em cada um 1 cc de filtrado do M. de Stefanski, irradiado durante 10 minutos a 20 centímetros do foco, nas mesmas condições de pesquisas anteriores.

As inoculações foram repetidas por mais 2 vezes com 10 dias de intervalo.

Deixamos passar mais 10 dias e inoculamos subcutaneamente 1 cc de suspensão de triturado de leproma — mais ou menos 20 germes por campo microscópico.

Outros 20 ratos, inoculados com a mesma suspensão, serviram de controle.

Deveriam ser sacrificados no fim de 5 meses.

Por descuido de um empregado, misturaram-se os ratos de uma gaiola com os respectivos controles. Os animais foram sacrificados e não figuram neste trabalho, de modo que só restaram 14 para a leitura dos resultados. Destes, nem todos chegaram ao termo da experiência. Morreram antes do tempo.

Se, a certo respeito foi isso um mal, não deixou, entretanto, de trazer algum proveito, porque tivemos oportunidade de observar a curva numérica dos germes no organismo do rato, constituindo essa multiplicação fato interessante no curso da pesquisa.

II Experiência:

Tomamos 30 ratos. Inoculamos por 3 vezes 1 cc de filtrado irradiado, nas mesmas condições e 10 dias depois 1 cc de suspensão de leproma — 20 a 30 germes por campo microscópico.

Outros 30 ratos serviriam de controle.

Morreram 3 ratos. A pesquisa ficou reduzida a 27 animais.

Houve também aqui grande número de mortes precoces, mas muitos ratos puderam ser levados facilmente até o 7.^o mês e cujos resultados são mostrados nos Quadros anexos. (II)

INTERPRETAÇÃO

Antes de mais nada, é mister esclarecer certos fatos de que depende a interpretação, a fim de que nas mãos de outros pesquisadores nosso pensamento seja bem compreendido.

Infecção progressiva:

No cômputo de infecção progressiva não levamos em conta a multiplicação massiva observada nos dois primeiros meses após a inoculação do filtrado, porque a experiência já nos ensinou que esse número copioso de germes tem existência efêmera e desaparece no fim de pouco tempo.

Do 4.^o mês em diante é que realmente se pode ver progressão no estado infeccioso e o critério que adotamos para assim considerar foi: maior número de órgãos infectados, número elevado de germes +++ (até 50 bacilos na lâmina; ++++ mais de 50, ou a presença de globis).

Nos animais preparados com filtrado não irradiado houve 22 casos de lepra progressiva; nos controles também 22 casos.

Nos animais preparados com filtrados irradiados, 13 casos; nos controles 6.

Casos de morte:

Já dissemos que nem todos os ratos puderam ser levados ao termo das experiências. Doenças intercorrentes mortais, entre as quais avulta a pneumonia caseosa ou caquexia, atingiram muitos animais e tivemos de sacrificar outros da série correspondente.

Dos ratos preparados com filtrado não irradiado morreram 14; dos controles 7.

Com filtrado irradiado 8; controles 13.

Vemos assim, de um modo geral, que o filtrado agravou as condições infecciosas, deu maior número de animais infectados, mas parece que acaba reduzindo, até certo ponto a dispersão dos germes.

Quanto à letalidade, vemos que é grande com o filtrado não irradiado, mas a irradiação diminui seu poder tóxico.

Ação combinada:

Afinal, tendo reconhecido que o filtrado do M. de Stefanski, sem ser um agente capaz de, por si só, produzir a lepra murina, exerce aparentemente um papel “preparador”, vejamos em experiência de outra ordem qual possa ser realmente sua função.

Tomamos uma série de 10 ratos. Inoculamos 1 cc de filtrado do M. de Stefanski. Dez dias depois inoculamos 1 cc de suspensão de bacilos lavados e centrifugados, mais ou menos 50 germes por campo microscópico.

Os contrôles foram inoculados unicamente com bacilos lavados.

O material fôra conservado em bloco de parafina liquefeita, processo que mantém os germes em atividade por muito tempo.

A técnica usada foi a seguinte: trituração do leproma no gral. Suspensão em sol. fisiológica. Filtração em papel esterilizado para reter os fragmentos do tecido. Filtração em Seitz. Lavagem do disco de amianto. Aspiração do líquido. Centrifugação. Pipetagem do líquido sobrenadante. Nova adição de sol. fisiológica. Centrifugação. Pipetagem. Depositar uma gota do resíduo em lâmina, corar e contar mais ou menos os germes. Reduzi-los a cerca de 50 bacilos por campo, pela adição de sol. fisiológica e inocular em animais.

A experiência deveria durar 6 meses, mas 3 ratos morreram 2 aos 3 e meio e. 1 aos 5 e meio meses — e tivemos de sacrificar outros tantos contrôles.

Tempo	Experiência	Contrôles
3 1/2 meses	Inguinal D +; E +	Ing. D +
3 1/2 ”	Negativo	Negativo
5 1/2 ”	Ax. E +; ing. D +; baço ++	Ax. D. +
6 ”	Ing. D + +	Negativo
6 ”	Negativo	Negativo
6 ”	Ing. E +	Ing. E +
6 ”	Ax. D + + +; ing. D +	Negativo
6 ”	Ing. D +	Negativo
6 ”	Ing. D + +	Negativo
6 ”	Ax. D + + + +; E + ing. D +; E +	Ing. D +

Entre os animais de experiência houve 2 negativos; nos controles 6, e as 4 positivities reduziram-se à infecção paucibacilar de um só grupo de gânglios, possivelmente os mesmos bacilos

injetados e que não tiveram ainda tempo de ser destruídos, ao passo que entre os ratos da experiência a infecção atingiu vários gânglios, o número de germes foi muito maior, apresentando alguns a aparência de lepra progressiva (Quadro IV).

QUAL A SIGNIFICAÇÃO DESTE FENÔMENO?

Richard Shope ("J. Exp. Med.", out. 1932) estudando a etiologia da influenza suína (hog flu), reconheceu que a infecção se faz à custa de dois fatores — um, filtrável, que exerce o papel de agente excitante, e o bacilo *Haemophilus influenzae suis* — filtrado e bacilo agindo sinergicamente.

Nossas pesquisas são ainda em número reduzido e os animais deveriam ser mantidos em observação por mais tempo, mas, dada a importância de que o assunto se reveste, deixamos aqui neste fim de trabalho, como uma espécie de "nota prévia", a possibilidade de se dar na lepra fenômeno semelhante, constituindo tal circunstância talvez uma das incógnitas que cercariam ainda a etiologia da lepra.

RESUMO

Existe no M. de Stefanski e possivelmente nos *Mycobacteria*, em geral, uma forma granular filtrável. Muitos bacilos passam através dos filtros bacteriológicos, mas o que interessa neste trabalho é a parte finamente granular dos mesmos germes. A existência dessa forma filtrável demonstra-se, no M. tuberculosis, por exemplo, pelas lesões que determina, pois tem uma patologia própria. Na lepra humana parece ser a responsável por certos fenômenos verificados na lepra incipiente, mas ainda não há provas definidas a tal respeito. Na lepra murina mostramos sua existência filtrando em Seitz uma suspensão de leproma conservado em glicerina e água destilada, partes iguais, e inoculando em ratos. A glicerina afeta a virulência do bacilo de tal sorte que, num material assim conservado durante 30 dias, os germes lavados e reduzidos o mais possível à forma bacilar não filtrável e inoculados em ratos, foram logo destruídos. Entretanto, os animais injetados com filtrado apresentaram, na maior parte dos casos, grande proliferação de bacilos. Os filtrados resistem também melhor à irradiação ultra-violeta do que os bacilos lavados. Por todas estas razões não é possível negar a existência, no M. de Stefanski, de uma forma infra-microbiana filtrável. Noutra série de experiência mostramos que esse tipo de germe elimina-se pela narina do rato previamente inoculado com filtrado, mesmo na ausência dos bacilos organizados. Procurando saber que função exerceriam os elementos filtráveis, vimos que, inoculados até 60 dias antes da injeção de uma suspensão de leproma ativo, promovem maior infecciosidade, parecendo ter uma "ação preparadora".

Notou-se, porém, que intervalando de 90 dias, a dispersão dos germes foi menor do que nos controles, sendo, no entanto, mais volumoso

o leproma inicial. Com a inoculação de filtrado irradiado, observou-se fato semelhante, mas a toxicidade é menor. Com estes elementos buscamos, enfim, verificar como se processaria a infecção leprotica. Inoculamos filtrado de M. de Stefanski numa série de ratos e 10 dias depois bacilos lavados. Os controles só receberam bacilos lavados. No fim de 6 meses só houve dispersão de germes e começo de lepra progressiva nos primeiros; os segundos nada ou muito pouco apresentaram. Há a impressão que a lepra se faz em dois tempos: a) infecção pelos elementos filtráveis (elementos preparadores) e b) infecção pelos bacilos organizados. Para conclusões definitivas, há entretanto, necessidade de pesquisas mais numerosas em tempo mais dilatado de observação.

ABSTRACT

A filterable granular form of *M. Stefanski* and possibly *Mycobacteria* exists. Many bacilli pass through bacteriological filters but in this paper we are interested only in the finely granular part of this germs. An existence of this filterable form is shown in *M. tuberculosis*, as an instance, by the lesion produced and which have their own pathology. In human leprosy this form seems responsible for certain phenomena seen in incipient cases but there is no definite proof. In murine leprosy we have shown its existence by filtering in Stiez a leproma suspension preserved in glycerine and distilled water, in equal parts, which was inoculated in rats. Glycerine acts in such a manner on the virulence of the bacilli that in material kept for 30 days, the washed germs which were reduced as much as possible to a non filterable form and were then inoculated in rats were soon destroyed. On the other hand animals injected with the filtrate showed in most cases great bacilli proliferation. The filtrates also resist more to ultraviolet irradiation than washed bacilli. For this reasons given above it is not possible doubt the existence on *M. Stefanski* of a filterable inframicrobian form. In another series of experiments we have already show that this type of germ is eliminated by the rats nose previously inoculated with filtrates even in the absence of organized bacilli. In an effort to know what function these filterable elements have, we observed that, when inoculate until 60 days before the injection of an active leproma suspension, they gave higher infectivity and seemed to have a "sensitized action". We observed too that an interval of 90 days was made the germ dispersion was smaller than in the control lot, being however of greater volume the initial leproma. With the inoculation of irradiated filtrate a similar fact was observed but toxicity was smaller. With this data we tried to observe how the infection would process. We inoculated filtrate of *M. of Stefanski* in a series of rats after 10 days washed bacilli. Controls received only washed bacilli.

At the end of six months dispersion of germs was observed and the first appearance of progressive leprosy in the first lot, in the second lot nothing or very few showed symptoms. There is an impression that leprosy appears in two phases: a) infection by filterable elements (preparatory elements) and b) infection by the organized bacilli. Definitive conclusions can, however, only be reached when more numerous investigations are made over a lengthier span of time.