

LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA E QUÍMICA BIOLÓGICA
DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A água como meio transmissor do bacilo de Eberth

POR

AFONSO A. PINTO

Comunicação apresentada ao «Comptes-Rendus
des séances de la Société de Biologie»,
por intermédio da sua filial em Coimbra.

RC
MNCT
57
PIN

Dr. D. António Ramalho
Homenagem ao
Autor

Comunicação apresentada ao
«Comptes-Rendus des séances de la Société
de Biologie»,
por intermédio da sua filial em Coimbra

A água como meio transmissor do bacilo de Eberth

É um facto nitidamente averiguado e incontroverso ser a água de alimentação um dos principais veículos de que o bacilo tífico se serve para ir infectar os organismos receptivos, originando vastas epidemias conhecidas, em epidemiologia, com a designação de «epidemias de natureza hídrica».

Ninguém duvida hoje do papel importante que a água de consumo tem na génese destas epidemias: poluída especificamente pelos excretas dos doentes, ou portadores de gérmens, pôde esta água, directa ou indirectamente, levar o virus específico ao contacto da mucosa do tubo gastro-intestinal, aonde, pela absorção dos órgãos linfóides dêste departamento orgânico, e em especial pelo círculo hemo-linfático de Waldeyer, ser introduzida na espessura da economia aonde se multiplica, originando a doença.

Mas, se isto é um facto nitidamente averiguado por todos os epidemiologistas, não menos averiguado é êste outro: os insucessos, quási sistemáticos, que se teem obtido, quando pretendemos dar a prova cabal e decisiva, procurando a presença do bacilo tífico nas águas infectantes.



INSTITUTO DE HIGIENE E SANIDADE MUNICIPAL DE CASCAES

AC
INCT
57
PIN

Numerosos são os casos dêste género e, para só citar um, lembraremos o sucedido com a grande epidemia de natureza hídrica sucedida em Lisboa em Fevereiro de 1912, aonde não foi possível encontrar o bacilo tífico nas águas incriminadas, embora se tivessem executado 168 análises bacteriológicas no decurso da epidemia, empregando os melhores processos de análises conhecidos e executados por pessoas da mais alta probidade científica. E, no entanto, nenhuma dúvida existiu e existe da natureza hídrica desta epidemia: os caracteres de que ela se revestiu e o minucioso e sábio inquérito a que procedeu a comissão nomeada para dar o seu parecer sôbre as causas da epidemia, pode, não só demonstrar que foram as águas de abastecimento da capital a causa do mal, como ainda o momento preciso em que foram poluídas, as condições em que o foram, e isto com tal rigor matemático e rodeado de provas tão convincentes, que muito honram certamente as pessoas incumbidas de tal missão.

E como êste, outros e muitos outros factos. São tantos que já se põe como lema, não ser necessária a análise bacteriológica das águas para se reconhecer a natureza hídrica de uma epidemia; bastam só os seus caracteres epidemiológicos e os inquéritos a que se deve proceder em tais casos.

Mas a que devemos attribuir tal discordância?

Porque é que sendo as águas, em certos casos, o veículo do bacilo tífico, não se pode nelas reconhecer a sua presença?

Várias teem sido as explicações e, entre elas, a de

que o bacilo tífico já teria desaparecido no momento em que geralmente se procede às análises.

Efectivamente o bacilo tífico não tem uma duração indefinida nas águas; devido a causas várias e, entre elas, o antagonismo microbiano que se estabelece em águas fortemente poluídas, o bacilo tífico não leva a melhor, desaparecendo a breve trecho, numa média compreendida entre 20-30 dias. Ora as análises não são, geralmente, feitas após a eclusão dos primeiros casos, mas sim em plena eflorescência da epidemia, quando os seus caracteres nos revelam, em parte, a sua natureza provável; adicionada a esta demora o período de incubação da doença que é, em média, de 15 dias, lá decorre o tempo de vitalidade dos gérmens no meio hidrico, não se encontrando nele por já ter desaparecido.

Uma outra explicação, e esta mais racional, é a forte diluição em que se encontra o bacilo tífico quando infecta *d'embè* e momentâneamente as águas de abastecimento duma cidade. Renovando-se esta água constantemente, em menores percentagens se vai encontrando sucessivamente o vírus específico, de forma que, no momento da análise, poucos, muito poucos gérmens se encontram num pequeno volume dêste meio líquido.

Outro tanto sucede quando a poluição, não sendo massiça e feita duma só vez, se faz por pequeníssimas doses, *mas constantemente*, como sucede nas infiltrações da canalização ou dos depósitos por matéria virulenta. Nestes casos, ainda, é muito pequena a percen-

tagem dos bacilos tíficos na água. Ora, sendo estas águas virulentas, acompanhadas *sempre* de uma forte quantidade de gérmens satélites do gérmem infectante e, entre êles, o colibacilo, que pela sua morfologia e grande número de propriedades culturais se aproxima muito daquele, e, não possuindo nós, presentemente, um meio electivo que, à semelhança do que faz a água peptonada para o vibrião colérico, permita o desenvolvimento do bacilo tífico com exclusão dos outros gérmens, eis o grande óbice que tem ilaqueado os movimentos da maior parte dos bacteriologistas, não lhes permitindo o isolamento, nem tão pouco o reconhecimento do bacilo tífico nas águas, rodeado, como fica, de numerosas colónias do seu gérmem satélite que o ofuscam e mascaram no seu desenvolvimento.

Tem sido êste um dos mais difíceis e delicados problemas da bacteriologia que tem pôsto à prova a sagacidade dos mais valiosos experimentadores. Todos êles se teem esforçado por encontrar substâncias que, juntas aos diversos meios de cultura, impeçam o desenvolvimento dos outros gérmens com exclusão do bacilo tífico. Ora, se o teem conseguido para a maior parte dêles, outro tanto não succede com o bacilo coli, que tem escarnecido de todas essas substâncias antisépticas.

Por outro lado, todos teem procurado concentrar num pequeno volume a pequena quantidade de gérmens específicos existentes na água infectante e investigar depois, no resíduo a sua presença, semeando-nos diferentes meios de isolamento.

Calmette consegue-o filtrando, por vela Chamberland

aséptica, um grande volume de água; recolhe o depósito do filtro em fraco volume de água estéril e semeia esta emulsão microbiana.

Vallet e Schueder provocam no seio da massa líquida a formação de um precipitado, pela junção das substâncias químicas adequadas; êste precipitado arrastaria, na sua queda, os micróbios em suspensão na água, A sementeira dêste precipitado permitiria a descoberta do gérmen específico.

Altschüler e Schepilewski chegam ao mesmo resultado pela adição de sôro anti-tífico em doses suficientes para provocar a aglutinação dos gérmenes homólogos no seio da massa líquida; centrifugando e semeando, poderíamos obter resultados positivos.

Todos êstes processos, teóricamente bons, exigem que a operação se faça em grandes volumes de água pois, só assim, teríamos probabilidades de apanhar uma dose suficiente de gérmenes específicos. Tornam-se, por isso mesmo, processos pouco práticos.

Outro tanto não sucede ao processo de Hoffman e Ficker que, seguindo os processos de Vallet e Altschüler, o fazem, sómente, depois de terem multiplicado suficientemente os gérmenes em suspensão num litro de água a analisar. Ainda que a água contenha poucos gérmenes, êstes, após a sua multiplicação, podem chegar a encontrar-se em dose mais do que suficiente para a sua busca.

Sugestionados por êste processo, fizemos a nossa primeira série de experiências, seguindo, nas suas linhas gerais, o processo dêstes autores.

Fizemos da água a analisar um meio de cultura apropriado ao desenvolvimento dos bacilos coli e tífico e impróprio ao das bactérias estranhas; concentrámos, por filtração, em vela Chamberland esterilizada; semeámos, finalmente, em placas de gelose Endo, o depósito do filtro, depois de o termos emulsionado em sôro fisiológico estéril.

Para conseguir êste resultado, tivemos de modificar a composição do meio de Ficker, visto a solução de nutrose não atravessar o filtro Chamberland.

Eis como procedemos:

Água a analisar	820 ^{cm} 3
Soluto de peptona a 10%	100 »
Bilis humana estéril	50 »
Soluto de cafeína a 5%	20 »
Soluto de cristal violeta a 0,1%	10 »

Colocámos na estufa a 37° durante 18 horas, filtrando a seguir por Chamberland estéril.

Os solutos de cafeína e cristal violeta figuram como meios impeditivos das bacterias estranhas; os de peptona e bilis humana, como meios de proliferação dos bacilos coli e tífico.

A água de que nos servimos era da fonte da Feira, profundamente poluída, com um título coli-bacilar inferior a 0,1 ^{cm}3.

Esta água foi artificialmente infectada com bacilo tífico em doses determinadas, sucessivamente decrescentes, resultado que conseguimos por diluições sucessivas de uma ansa de cultura de 24 horas, em quantidades determinadas de sôro fisiológico estéril.

Semeámos assim uma série de quatro balões de litro nos quais existiam :

No primeiro $\frac{1}{100}$ de uma ansa de cultura de bacilo tífico

No segundo $\frac{1}{10.000}$ » » » » » »

No terceiro $\frac{1}{1.000.000}$ » » » » » »

No quarto $\frac{1}{100.000.000}$ » » » » » »

Assim feito, e antes de collocarmos na estufa para se produzir a multiplicação dos gérmens, verificámos se, por sementeira directa duma gota destas emulsões microbianas em placas de gelose Endo, seria possível revelar a existência do bacilo tífico, e eis o que observámos :

Sómente nas sementeiras do balão correspondentes à primeira diluição, isto é, com a dose de $\frac{1}{100}$ de ansa, encontrámos algumas colónias brancas, características do bacilo tífico, no meio de numerosas colónias vermelhas indicativas do coli bacilo.

No segundo balão só raríssimas colónias brancas apareciam, não se encontrando nenhuma nas placas correspondentes aos balões da terceira e quarta diluições.

Em todas elas, as colónias vermelhas eram numerosas e em número sensivelmente igual.

Concluimos destas experiências preliminares que, só

com doses bastante elevadas de bacilo tífico nas águas, correspondentes á dose de $\frac{1}{100}$ de ansa e quando muito à de $\frac{1}{10.000}$, podemos pesquisar directamente o gérmen na água infectada.

Com doses inferiores, tornou-se-nos isso impossível.

Tivemos pois de recorrer, nestes dois últimos casos, à multiplicação prévia dos gérmenes, colocando os balões da terceira e quarta diluições na estufa a 37° durante 18 horas.

Isto feito, filtrámos por Chamberland estéril; destacámos o depósito do filtro por compressa de gaze estéril num pequeno volume de caldo esterilizado; e fizemos sementeiras de uma gota do liquido em placas de gelose Endo, com pincel de platina, placas estas que foram em seguida colocadas na estufa a 37°.

Estas sementeiras foram de tal forma abundantes que tivemos de recorrer à diluição para podermos obter colónias isoladas nas referidas placas.

Com esta precaução, reconhecemos a existência de colónias brancas nos balões onde o exame directo se tinha tornado impotente, misturadas, é certo, com numerosíssimas colónias vermelhas que até chegavam a perturbar a leitura das placas. Efectivamente, as colónias de coli bacilo avermelham a gelose no sítio da sua implantação; esta côr difunde por uma maior extensão da gelose chegando mesmo a tornar rosadas as colónias brancas do bacilo tífico, implantadas agora como estão sob um fundo vermelho de gelose.

Necessário pois se torna fazer a leitura das placas o mais cedo possível afim de obviarmos a êste inconveniente, sem que, totalmente, o possamos remover.

Nesta segunda série de observações concluímos pois que, se é possível, por êste método, reconhecer a existência do bacilo tífico em águas infectadas nas doses insignificantes de uma centésima milionésima de ansa, desnecessário se torna, para o obter, fazer a concentração dos gérmens, depois de multiplicados, por velas Chamberland; basta sómente a sementeira directa da cultura nos meios de isolamento.

Segunda série de experiências

Na posse dos dados fornecidos pelas experiências anteriores fizemos nova série, contando previamente o número de gérmens com que infectavamos as águas — 19 e 38 micróbios respectivamente por litro de água.

Por outro lado, as culturas, depois de convenientemente desenvolvidas no meio electivo atrás descrito, eram tratadas pelo éter de petróleo, visto Shuscha e mais tarde Bierast e Hall reconhecerem ser esta substância mais tóxica para o coli bacilo do que para o bacilo tífico.

Para isso, deitámos num tubo de ensaio estéril, de paredes resistentes e rolhado convenientemente por rolhas de cautchouc também estéreis, cinco centímetros cúbicos de cultura, à qual adicionámos dois centíme-

tros cúbicos de éter de petróleo (0,660-0,680). O éter, devido à sua menor densidade, boiava à superfície; agitámos, então, fortemente a mistura durante meia hora, finda a qual deixámos em repouso uns minutos afim do éter se separar. Com pipeta Pasteur tirámos do fundo do tubo uma gota de cultura que espalhámos, por meio do pincel de platina, em várias placas de gelose Endo, que logo de seguida eram colocadas na estufa a 37°.

Continuámos a agitar a mistura éter-cultura durante mais uma hora, finda a qual, semeámos, por processos idênticos ao acima descrito, sendo também as placas colocadas na estufa.

No dia seguinte, fizemos idênticas sementeiras, tendo a mistura éter-cultura ficado em repouso durante 18 horas à temperatura do laboratório.

Finalmente, procedemos dum modo idêntico após 24 horas de contracto e, assim feito, eis o que observámos:

- a) *Cultura sem adição de éter*: numerosas colónias de coli bacilo e, entre elas, bastantes colónias brancas, ofuscadas pelas colónias vermelhas do gérmen satélite que comunicava à gelose a sua côr característica e por sua vez às colónias brancas de bacilo tífico.
- b) *Cultura com adição de éter e 1/2 hora de contracto*: Ainda bastantes colónias vermelhas entre as colónias brancas de bacilo tífico.
- c) *Cultura com éter e 1 1/2 hora de contracto*:

Ainda presença de colónias vermelhas, mas em muito menor número do que nos dois casos anteriores. As colónias brancas do bacilo tífico eram em número sensivelmente igual às das experiências anteriores.

d) *Cultura com éter, passadas 18 horas*: Ausência de colónias vermelhas; só existem colónias brancas na primeira placa semeada e em número sensivelmente menor do que nas placas da terceira experiência.

e) *Cultura com éter, passadas 24 horas*: Só existiam colónias brancas na primeira placa semeada; ausência completa de colónias vermelhas.

Em todas estas experiências eram identificadas as colónias brancas e vermelhas obtidas pelos processos de identificação conhecidos. Correspondiam, na verdade, respectivamente, ao bacilo tífico e coli bacilo com todos os atributos da espécie.

Mostram as experiências acima citadas que, não só é possível demonstrar-se a existência do bacilo tífico em águas fortemente poluídas, ainda que o bacilo tífico nelas exista na dose insignificante de 19 gérmens por litro, como, ainda, chegar a desembaraçar, por completo, o bacilo tífico do seu gérmem satélite que tantos embaraços tem causado aos experimentadores que se teem entregado a êste género de trabalho, graças à intervenção do éter de petróleo. Esta substância, tóxica para ambos os gérmens, tem no entanto uma acção bactericida mais rápida sôbre o coli bacilo, podendo

nós, graduando a acção do contacto, separar o bacilo tífico duma mistura feita com os dois.

Será susceptível de aperfeiçoamento a técnica que acabamos de expôr?

Quási com certeza e algumas experiências já realizámos nesse sentido. Convém verificar, em primeiro lugar, se, com águas infectadas, possivelmente na dose de 1 bacilo tífico por litro, ainda será possível conhecer nelas a sua existência. Muito útil seria também demonstrar por quanto tempo as águas artificialmente infectadas assim permanecerão, a ponto de reconhecermos, pelo processo que seguimos, a sua infecciosidade.

São experiências já iniciadas e que farão parte duma futura comunicação.





RÓ
MU
LO



CENTRO CIÊNCIA VIVA
UNIVERSIDADE COIMBRA

1329655515

