

CULTURA PROFISSIONAL

UM EXERCÍCIO DE GUERRA BIOLÓGICA

Cap Art DIÓGENES VIEIRA SILVA

A 8 de março de 1952 a Secretaria de Assuntos Estrangeiros da República Popular Chinesa, segundo notícias divulgadas pelas agências telegráficas, acusou os Estados Unidos de, em flagrante violação, não apenas do território chinês, mas também das leis da guerra, ter realizado uma agressão de guerra biológica contra as populações do nordeste, estendendo-se a mesma, posteriormente, à Província de Tsingtao e outras. O comando das tropas da ONU desmentiu as acusações, tendo as autoridades chinesas replicado que a agressão foi levada a cabo por meio do lançamento de bombas e outros invólucros contendo ratos e pulgas infeccionados com a *Pasteurella pestis*, acrescentando, como comprovante da afirmativa anterior, a declaração de que a região contaminada era das que se achavam isentas da peste já há algum tempo. Também utilizaram as autoridades chinesas, como argumento, o fato da epidemia ter grassado no verão, quando havia muito mais probabilidade de ocorrência de epidemias durante o inverno. Quem se interessa pelo assunto deve se recordar da troca de acusações e argumentos, com a divulgação até de fotografias da munição utilizada.

Posteriormente, novas acusações surgiram, em que a forma de ataque fôra modificada para o lançamento de mósca, peixes e algodão em rama, contaminados com bactérias intestinais (*S. typhi*, *Salmonella schottmulleri*, *Shigella*) que causaram inúmeras baixas entre os combatentes chineses, além das *C. anthracis* que provocaram epizootias nos rebanhos cavalari, suíno e vacum. Também outras bactérias disseminadas em tais ataques causaram a destruição de inúmeras plantações de soja, segundo as acusações oficiais do Governo Chinês.

Nos primeiros meses do ano de 1953 essas acusações foram levadas ao plenário das Nações Unidas pelo bloco soviético, sendo veementemente negadas pela delegação norte-americana que propôs se solicitasse uma investigação completa a respeito, a cargo da Cruz Vermelha Internacional. Essa sugestão não foi aceita pelos sino-coreanos que não consideraram tal entidade competente para essa investigação, sugerindo,

por outro lado, uma comissão internacional para apuração dos fatos. Nenhum dos blocos cedendo em suas preferências, chegou-se, como em inúmeras outras ocasiões, a um impasse, jamais solucionado.

Repugna-nos aceitar tais acusações como verídicas, porém, devemos reconhecer que não há forma mais ou menos bárbara de guerra, sendo bárbara a própria guerra. E os Estados Unidos provavelmente se encontram em excelentes condições para desencadear um ataque de guerra biológica, tendo desde a última guerra mundial encarado com seriedade os estudos com ela relacionados, desde os primeiros informes de George W. Merck, consultor do Secretário da Guerra a respeito de guerra biológica, até a construção dos laboratórios do "Chemical Corps em Camp Detrick, Frederick — Maryland, em abril de 1943, onde se desenvolveram os estudos dessa especialidade, não apenas sob o ponto de vista defensivo, mas também sob o aspecto ofensivo.

Além disso, os Estados Unidos não subscreveram tratados proibindo qualquer forma de guerra, achando-se, por conseguinte, livres para conduzir a guerra de acordo com seus interesses, desde que essa condução traga como consequência a Vitória. Se consultarmos a Convenção de Haya de 1907, lá encontraremos a proibição do emprego de venenos ou armas envenenadas, proibição essa que o Exército norte-americano considera como abrangendo também a guerra biológica. Posteriormente, no Protocolo de Genebra de 1925 surge especificamente a proibição da guerra biológica, tendo sido ratificado por quarenta e uma nações, dentre as quais a França, Inglaterra, Alemanha e Rússia. No entanto, nem o Japão e nem os Estados Unidos o subscreveram sendo de se notar que a 8 de abril de 1946 o mesmo foi retirado do Senado norte-americano pelo presidente Truman.

Muito se tem falado e escrito a respeito da proscrição das formas bárbaras de guerra, dentre as quais avulta a biológica, porém, o Vencedor é quem dita as leis da Guerra, de modo que sempre que uma delas fôr necessária para a derrota do inimigo, acreditamos que nada impedirá que seja usada. E o Exército norte-americano não se tem descuidado de sua preparação para fazer face à eventualidade de uma guerra total em que os agentes biológicos sejam empregados em larga escala.

Em janeiro de 1957 tivemos oportunidade de na "Chemical Corps School", em Fort Mc Clellan, Anniston — Alabama, tomar parte em um exercício de guerra biológica, em que, após a disseminação do agente, os alunos deveriam colher amostras na região contaminada, para, posteriormente, em laboratório, determinar a existência ou não de contaminação, bem como qual o agente utilizado.

Foi um exercício que, pelos apontamentos tomados, acredito possa ser reproduzido em nosso meio, principalmente com uma união de esforços do pessoal da Companhia Escola de Guerra Química com elementos do Batalhão Osvaldo Cruz e Instituto de Biologia para o indispensável apoio material aos integrantes daquela subunidade.

Dividiremos, portanto, o presente trabalho, em duas partes principais: a primeira relacionada com a construção de uma caixa de coleta de amostras, material êsse indispensável ao exercício, e a segunda referente à conduta do exercício de guerra biológica propriamente dito.

I — CAIXA DE COLETA DE AMOSTRAS

Nosso primeiro contacto, na Escola de Guerra Química do Exército norte-americano, com o setor de Guerra Biológica foi com um oficial especializado no assunto e, fato para nós curioso, também *veterinário* (todos que passaram pelos bancos escolares da Es I E sabem que um dos oficiais brasileiros que mais impulso deu ao estudo da

guerra biológica, no nosso curso de especialização de Guerra Química, também era do serviço de veterinária), o Major D. Hubbard. Posteriormente, ao passarmos para o laboratório, tivemos a companhia constante do Cap. Stahl que possuía um curso de bacteriologia de dois anos, tirado em Universidade civil. Nosso primeiro dia de laboratório, 22 de janeiro de 1957, foi pleno de revelações e novos conhecimentos, porém, ao lado dos conjuntos de coleta de amostras padronizados pela Marinha, e lá existentes, havia uma caixa simples e tósca, não padronizada, que era a preferida dos instruídos, e também dos instrutores.

a) *Generalidades* :

O Corpo Químico do Exército norte-americano não possui Caixa de Coleta de Amostras padronizada, razão pela qual a que usamos e que tentaremos descrever a seguir, é usada pelos componentes de suas equipes de guerra biológica, satisfazendo plenamente nos exercícios, além de poder ser construída facilmente com materiais de pronta obtenção em qualquer enfermaria, laboratório ou posto médico.

Consta essencialmente de uma pequena caixa de madeira, contendo em seu interior todo o material necessário à coleta de amostras no campo.

b) *Caixa*:

É uma caixa de madeira fina (figura 1), para que seu peso seja o menor possível. A madeira usada, nas que tivemos oportunidade de ver, tinha a espessura de $1/3$ de polegada, e suas dimensões externas são as constantes da figura 4. É dotada de uma alça de transporte que pode ser metálica ou também de madeira, o que será mais econômico. Para melhor conservação, convém que se pinte a caixa.

Sua face anterior se abate, uma vez aberta a tampa, possibilitando-nos, conforme a figura 1 nos mostra, fácil acesso ao material de coleta de amostras, além de nos fornecer uma superfície para tomada de apontamentos, bem como nos coloca à vista a ficha de instruções afixada na parte interior da tampa, e reproduzida na figura 6.

Possui a caixa duas tábuas perfuradas, nas quais são colocadas as provetas de coleta de amostras, evitando que se desloquem ou caiam quando estivermos manejando o material.

c) *Provetas*:

No interior da caixa temos dezesseis provetas, fáceis de obter em qualquer enfermaria ou laboratório, ou mesmo no comércio. Essas provetas são divididas, conforme sua utilização, como se segue:

(1) *Amostras líquidas*:

Três provetas se destinam à tomada de amostras líquidas. Têm aproximadamente 125 mm de comprimento por 19 mm de diâmetro,



Fig. 1 — A caixa de coleta de amostras aberta, mostrando a disposição de material no seu interior.

sendo roscadas na sua parte superior, onde se atarracha a tampa. Contém em seu interior tubos de vidro com 6 mm de diâmetro por 114 mm de comprimento que são usados como pipetas.

(2) Amostras de superfícies:

Seis outros tubos ou provetas, semelhantes aos anteriores, se destinam à coleta de amostras em superfícies contaminadas. Em seu interior contém pequenos esfregões esterilizados que podem ser confeccionados trançando-se algodão absorvente em uma das extremidades de pequenas varetas de vidro normalmente utilizadas em laboratórios ou em outros setores médicos. Esses esfregões antes de serem usados devem ser umedecidos na gelatina diluída contida no interior de uma outra proveta.

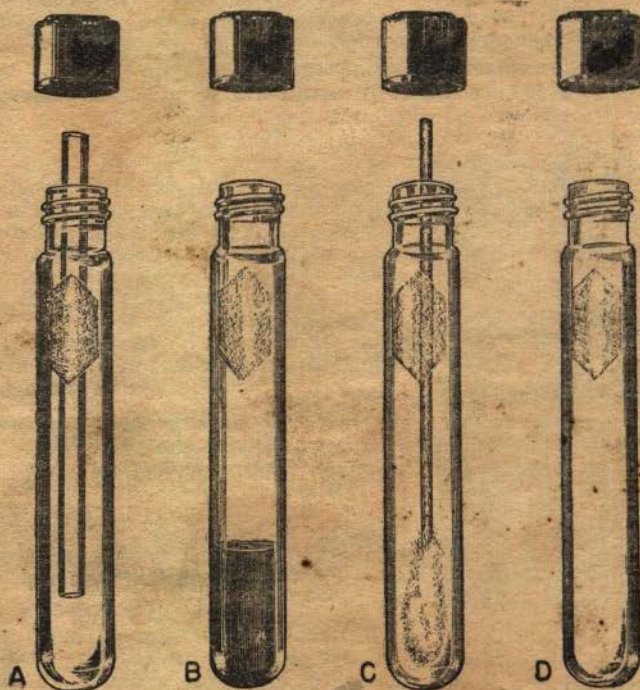


Fig. 2 - As provetas, com seus diversos usos: A - Para coleta de amostras líquidas; B - Proveta contendo gelatina diluída; C - Para coleta de amostras de superfície; D - Para coleta de amostras sólidas

(3) Amostras sólidas:

Para coletar amostras sólidas, tais como vegetação, fragmentos de munição, etc. ou mesmo para outras finalidades ou necessidades que surjam no momento, encontramos na Caixa três outras provetas vazias, também com as mesmas dimensões das anteriores (125 mm de comprimento por 19 mm de diâmetro). Ainda poderemos dispor de uma quarta proveta para a coleta de amostras sólidas, desde que a que contém a gelatina diluída seja esvaziada, depois que tivermos colhido tôdas as amostras de superfície necessárias.

(4) Amostras de aerossóis :

Temos também três provetas (146 mm de comprimento por 25 mm de diâmetro) munidas de rôlhas de borracha com dois orifícios, cada um dos quais serve de passagem para tubos de vidro encurvados, con-junto êsse que nos faz lembrar os "frascos lavadores" de qualquer laboratório; um dos tubos é suficientemente comprido de modo a quase atingir o fundo da proveta, ao passo que o outro apenas ultrapassa a superfície inferior da rôlha de 20 a 25 mm. As provetas contêm normalmente, até 1/3 de sua altura de um diluente de gelatina esterilizada. Pequenos tampões de algodão são usados para vedar as extremidades dos tubos, para que suas partes internas permaneçam esterilizadas.

(5) Bulbo de sucção:

Um bulbo de borracha, dêsses normalmente usados em vaporizadores ou mesmo em consultórios médicos, deve ser obtido para fornecer ao coletor de amostras de aerossóis o necessário vácuo. Êsse bulbo é dotado de duas válvulas, uma aspirante em E e outra premente em F, devendo ter de 65 a 75 m³ de capacidade.

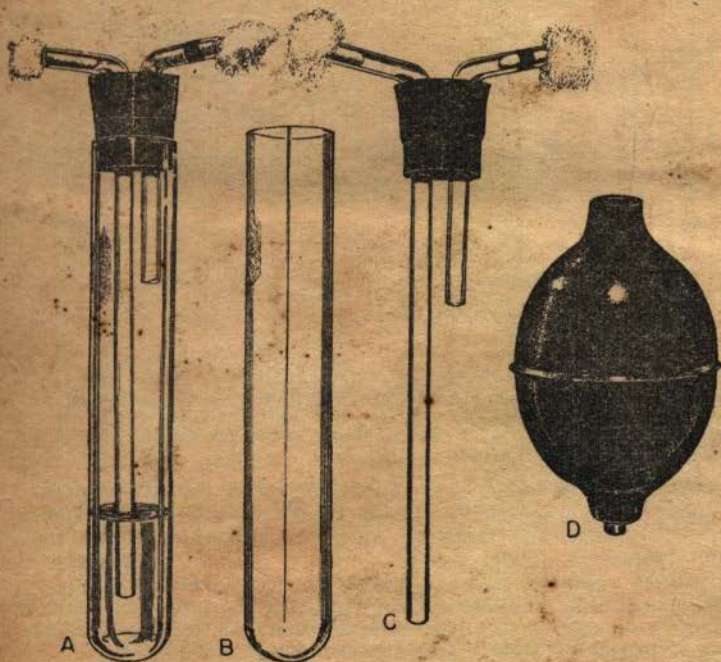


Fig. 3 — Dispositivo de coleta de amostras de aerossóis: A — Frasco lavador completo; B — Proveta utilizada para a montagem do frasco lavador; C — Rôlha de borracha com os dois tubos curvados; D — Bulbo de sucção

(6) Material de anotações:

Cada uma das caixas deverá ser ainda provida de um lápis comum e um outro grosso, azul ou vermelho, de preferência dermatográfico, para numerar as provetas, bem como anotar outras informações que

nos forneçam dados a respeito das amostras colhidas e datas da coleta. Também uma pequena caderneta de apontamentos é usada para anotações que se tornem necessárias.

(7) *Sacolas de amostras:*

É aconselhável ainda a utilização de algumas sacolas plásticas, facilmente encontradas no comércio para colher as amostras maiores, não apenas de sólidos, como também insetos e pequenos animais.

(8) *Luvas:*

Luvas de borracha para proteger do contágio os encarregados da coleta de amostras devem ser incluídas na caixa, sendo facilmente obtidas no comércio. São do tipo usado em medicina para cirurgia ou autópsia.

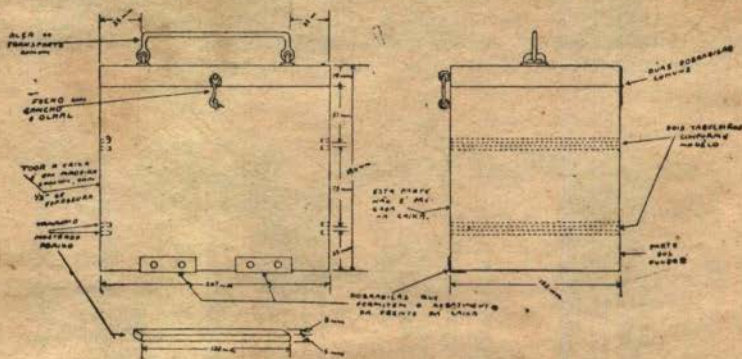


Fig. 4 — Projeto de uma Caixa de Coleta de Amostras

(9) *Instruções:*

Para facilitar o manuseio da caixa, instruções para seu uso apropriado são afixadas na tampa, conforme nos mostra as figuras 1 e 6.

Observação: — Todo o material incluído na caixa deverá ser esterilizado antes de ser usado.

Também muitas adaptações podem ser feitas por quem quiser construir sua própria caixa de coleta de amostras. Se as provetas não puderem ser obtidas nos tamanhos por nós indicados, outros tamanhos servem, desde que se deixe para construir a caixa de madeira depois de obtidas as provetas, pois em função de seus tamanhos é que a caixa será calculada. As rólhas de borracha para as provetas também são facilmente conseguidas nas casas especializadas em artigos médicos, mas, em sua falta, tampões de algodão poderão ser usados.

II — USO DA CAIXA DE COLETA DE AMOSTRAS

Já vimos que na tampa da caixa devem se achar coladas as *Instruções Para Uso*, que será um resumo do que iremos tratar nessa segunda parte, dividida em vários itens conforme o material a ser colhido como amostra.

(a) Amostras líquidas:

Para obtermos amostras de líquidos, principalmente água, suspeitos de contaminação, retiramos uma das pipetas das provetas destinadas à coleta de amostras líquidas, e a submergimos no líquido até pouco mais da metade do seu comprimento, tampando sua abertura livre com o dedo. A seguir, ainda cobrindo sua extremidade que ficou fora do líquido, com o dedo, retiramos a pipeta e a colocamos na proveta que imediatamente fechada. Caso não tenhamos usado uma pipeta, por falta, ou por se terem esgotado as que tínhamos disponíveis, poderemos utilizar um conta-gotas, com o procedimento usual e colocaremos, então, tanto o conta-gotas quanto o líquido colhido, em uma das provetas vazias destinadas a amostras diversas.

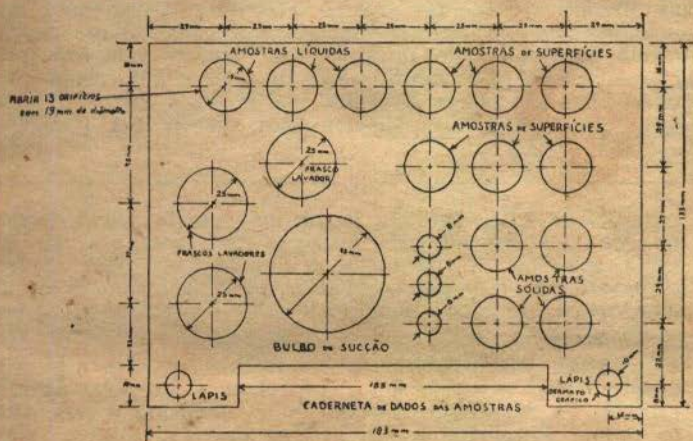


Fig. 5 — Tabuleiro para colocação das amostras GB na Caixa

(b) Amostras de superfícies:

Apanhamos um dos esfregões existentes nas provetas destinadas à coleta de amostras de superfície; umedecemos-lo na gelatina diluída, e colhemos a amostra desejada, esfregando-o na superfície, como se estivéssemos a pintar na mesma uma letra "Z", ao mesmo tempo em que giramos a vareta de vidro entre os dedos. A seguir o esfregão é colocado na proveta competente.

(c) Amostras sólidas:

Amostras de vegetação, pequenos ramos, insetos, fragmentos de munição, e vários outros artigos podem ser colhidos, colocando-se os mesmos nas provetas vazias a isso destinadas. Essas provetas também podem se destinar a amostras extras de líquidos, se para isso houver necessidade.

(d) Amostras de aerossóis:

De uma das provetas destinadas a amostras de aerossóis, retiramos os pequenos tampões de algodão, e colocamos o bulbo de sucção na extremidade do tubo de vidro menor. Apertamos o tubo e vamos deixando que retome sua forma primitiva lentamente, de modo a que o ar contaminado vá sendo coletado na proveta. Repetiremos a operação de compressão e descompressão de bulbo aproximadamente 25 vezes.

(e) *Anotações:*

A caderneta de apontamentos deverá contar a data, hora, local, estado do tempo, número de série da amostra e qualquer outra informação com ela relacionada que possa ter algum valor como informação a ser utilizado pelo oficial de guerra química. O número de série da amostra deverá também ser colocado na proveta em que ela estiver contida, para isso se utilizando o lápis dermatográfico.

III — AGENTES SIMULANTES

Depois de obtida a Caixa de Coleta de Amostras, e sabermos como usá-la, temos de obter microrganismos que, disseminados, apresentem as condições mais semelhantes possíveis àquelas realmente existentes em caso da ocorrência da Guerra Biológica. Com esses microrganismos obteremos um treinamento adequado, não apenas quanto ao procedimento para coleta de amostras, mas também com referência às técnicas preliminares para identificação de agentes BW, como são chamados os agentes de guerra biológica nos manuais do Exército norte-americano, e que poderíamos adaptar para agentes GB (Guerra Biológica).

1. AMOSTRAS LÍQUIDAS — Pegue uma pipeta, submergindo-a na água, e tampando sua abertura livre com o dedo. Retire-a, colocando a pipeta com o líquido na proveta. Tampe a proveta. Se usar um conta-gotas, obtenha o líquido da maneira usual, colocando líquido e conta-gotas, em uma das provetas vazias.
2. AMOSTRAS DE SUPERFÍCIE — Apanhe um dos esfregões, umedecendo-o na gelatina. Para colher a amostra, passe o esfregão na superfície, fazendo um Z, enquanto o gira entre os dedos. Recoloque o esfregão na proveta.
3. AMOSTRAS SÓLIDAS — Utilize as provetas vazias para colher amostras de vegetação, pequenos ramos, insetos, fragmentos de munição, etc.
4. AMOSTRAS DE AEROSÓIS — Retire os tampões de algodão, e coloque o bulbo de sucção na extremidade do tubo de vidro menor. Aperte o bulbo e solte devagar, para o ar contaminado ser coletado na proveta. Repita essa operação vinte e cinco vezes.
5. ANOTAÇÕES — Não se esqueça de anotar data, hora, local, estado do tempo, número da amostra e toda e qualquer informações valiosas. O número da amostra deve ser colocado na proveta com o lápis dermatográfico. Não se esqueça do número da amostra também na caderneta.

Fig. 6 — Instruções para o uso da Caixa

Antes de mais nada é interessante ressaltarmos que o treinamento com esses agentes simulantes é muito mais simples do que aquele utilizando agentes reais, pois os últimos, patogênicos, exigem apropriado meio de cultura para o seu desenvolvimento, além de procedimentos às vezes especiais para sua identificação, requerendo, em alguns casos, inoculação em animais, etc. Os agentes simulantes com os quais podemos realizar exercícios de GB não são patogênicos, além de serem fáceis de cultivar e de identificar. Dois são comumente utilizados, e, pelo fato

de serem simulantes, não constam do TM 3-216 (*Military Biology and Biological Warfare Agents*) que se restringe àqueles agentes patogênicos cujo uso poderá ocorrer em caso de futuro conflito com a utilização de agentes GB. São eles: *Serratia marcescens* e *Bacillus globigii*.

a) *Bacillus globigii*:

O *Bacillus globigii* (BG) é uma bactéria formadora de esporos, bastante resistente às condições pouco favoráveis, apresentando características bem semelhantes àquelas dos possíveis agentes de guerra biológica, como o *Bacillus anthracis*, que sejam formadores de esporos. É muito usado em exercícios de GB, principalmente quando queremos dar ênfase às técnicas de descontaminação, pois qualquer processo de descontaminação que se apresentar efetivo contra êle, poderá ser considerado como efetivo também contra a maioria dos agentes de guerra biológica, passíveis de uso.

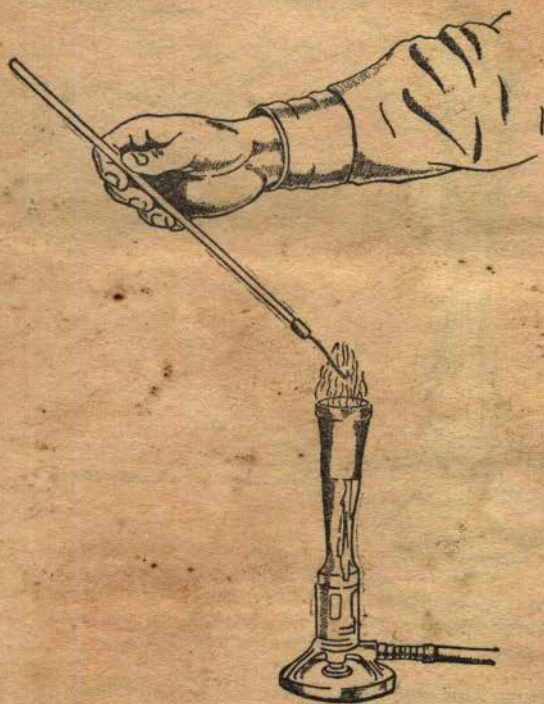


Fig. 7 — A agulha de inoculação, construída com fio de platina é esterilizada por meio de flambagem, antes da coleta dos microrganismos na cultura. Depois de usada, a agulha é novamente esterilizada pelo mesmo processo.

As colônias de *Bacillus globigii* são facilmente identificáveis pela sua coloração cor-de-rosa ou amarela, e por apresentarem sua superfície nodosa. A temperatura ideal para o desenvolvimento dessas colônias é a de 37°C.

b) *Serratia marcescens*:

A *Serratia marcescens* é uma bactéria que se apresenta sob a forma de cocos, tendo de dimensões 0.5 por 0.5 a 1.0 micron, apresentando-se isoladamente ou, ocasionalmente, em forma de cadeias de cinco a seis elementos, dotada de mobilidade, tendo normalmente quatro flagelos. A SM não forma esporos e apresenta muitas das características das bactérias vegetativas passíveis de uso em guerra biológica. Era o microrganismo mais usado nos exercícios, apresentando colônias facilmente identificáveis pela sua característica coloração vermelha como o sangue. Encontrada no ar, na água, como também em pão, carne, leite, batatas e muitos outros produtos alimentícios, apresentando como temperatura ideal para seu desenvolvimento a de 27 a 32°C.

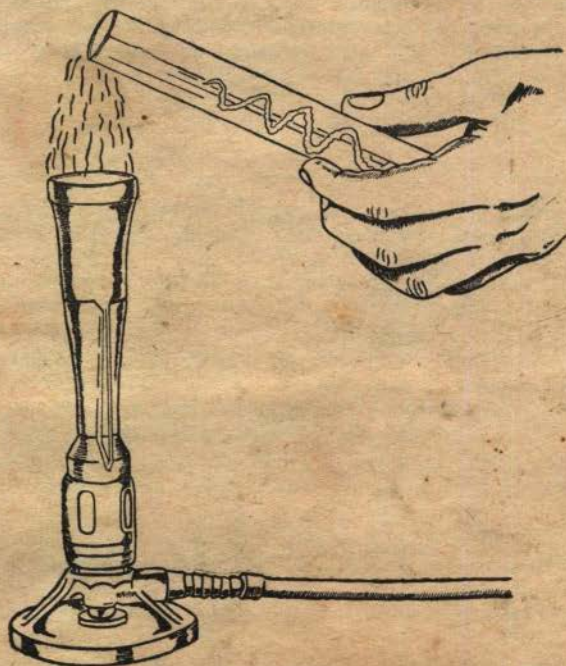


Fig. 8 — As provetas de cultura têm suas bocas esterilizadas pela flambagem, tão logo sejam removidos os tampões de algodão, e também antes de recolocar os tampões

c) *Culturas dos agentes*:

Para o exercício poderemos obter culturas desses agentes em qualquer laboratório de bacteriologia de nossas Escolas de Medicina, ou mesmo, talvez, no Instituto Militar de Biologia. Nos Estados Unidos, o Laboratório Biológico da "Chemical Corps School", em Fort McClellan, (Anniston — Alabama) produzia culturas desses agentes que eram remetidas para os interessados. Também podiam ser obtidas nos Laboratórios Biológicos do Corpo Químico em Fort Detrick, Maryland. As culturas eram enviadas em uma proveta, devidamente fechada, contendo uma certa quantidade de agar (material semelhante à gelatina,

em que a bactéria se desenvolve e cresce), em cuja superfície inclinada o agente se desenvolve. Normalmente as culturas são conservadas em refrigerador, onde as bactérias permanecem vivas, porém, sem se reproduzirem, condição em que podem ficar de seis meses a um ano. Se obtivermos uma proveta com a cultura de um dos dois agentes acima especificados, poderemos obter outras culturas que manteremos em estoque, para não termos necessidade de recorrer continuamente ao órgão provedor, toda vez que tivermos de realizar um exercício de guerra biológica.

Para isso, preparamos algumas outras provetas com um pouco de agar, e com uma agulha retiramos amostras da cultura por nós obtida, com elas inoculando o agar dessas novas provetas. Para isso, o procedimento adotado é o que tentaremos reproduzir em continuação.



Fig. 9 — Um certo número de microrganismos é retirado pela agulha esterilizada do agar contido na proveta de cultura. Observe-se o processo de segurar o tampão de algodão da proveta de cultura, entre os dedos da mão esquerda

A agulha que iremos utilizar para o transplanto da cultura é inicialmente esterilizada em uma chama, aquecendo-a até que se torne rubra (figura 7). A seguir, retiramos as tampas de algodão de ambas provetas, passando suas aberturas também na chama (figura 8). Tocamos com a agulha esterilizada, pela sua parte curva, na cultura de estoque (figura 9) e então a levamos para a outra proveta com agar,

tocando inicialmente sua parte curva no agar próxima ao fundo da proveta, trazendo lentamente a agulha para a parte superior, esfregando-a suavemente no agar. Novamente as bôcas das provetas são levadas à chama, bem como a agulha utilizada para o transplante. As novas culturas devem ser incubadas durante 24 a 48 horas na temperatura aconselhada para o desenvolvimento do agente.

d) *Precauções de segurança:*

Apesar de serem êsses agentes simulantes não patogênicos, tinhamos de adotar medidas de precaução, pois fomos alertados de que, em altas concentrações, eram capazes de infectar o organismo humano, en-

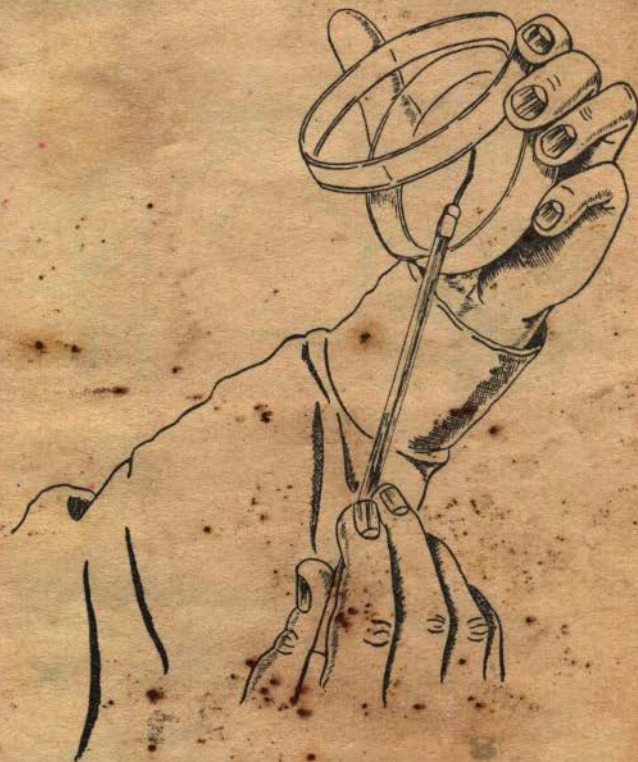


Fig. 10 — O Disco de Petri, devidamente esterilizado é protegido da contaminação, enquanto está sendo inoculado com os microrganismos de teste, por meio da agulha, ou enquanto as amostras são nele colocadas por meio de um esfregão

contrando-o predisposto. Por essa razão a máscara contra gases deve ser usada nas áreas contaminadas com êsses agentes, e o pessoal que tomar parte no exercício deverá, após o mesmo, tomar as indispensáveis medidas de higiene e descontaminação. As mãos devem ser conservadas afastadas do nariz, bôca e rosto, durante o trabalho com êsses agentes, bem como providências devem ser tomadas para que quaisquer cortes ou arranhões na pele sejam devidamente cobertos antes

do exercício. A área de exercícios de guerra biológica no Fort McClellan era no interior do próprio Fort, porém, devidamente cercada e com entrada interdita, pois não devem ser utilizados esses agentes em uma distância inferior a 1/2 milha de hospitais ou enfermarias, pois poderão causar infecções em alguns pacientes sob certas condições.

IV — DESENCÁDEAMENTO DO EXERCÍCIO

Desde que já vimos como construir uma Caixa de Coleta de Amostras, bem como quais os agentes que poderemos utilizar em um Exercício de Guerra Biológica, tentemos reproduzir o procedimento a seguir para o desencadeamento de um exercício desse tipo, desde a obtenção da cultura de agentes até a disseminação, coleta de amostras e sua cultura.



Fig. 11 — Colête que pode servir como estufa de cultura, pois o calor corporal daquele que o estiver usando, permitirá o desenvolvimento dos microorganismos contidos no Disco de Petri.

a) Cultura dos agentes:

Qualquer um dos dois agentes já citados no presente trabalho poderá ser usado, pois ambos se desenvolvem rapidamente em um apropriado caldo nutritivo. Para obtermos esse meio favorável, poderemos utilizar o material normalmente usado, ou, em sua falta, meios de fortuna. Vejamos os dois casos. Se obtivermos o caldo nutritivo desidratado (passível de obtenção nas fontes fornecedoras de material de laboratório bacteriológico), dissolveremos oito gramas desse pó em um

litro d'água, colocado em um frasco de Erlenmeyer com capacidade de dois litros; depois de bem misturado, levamos ao autoclave para esterilizar, durante 15 minutos, a uma pressão de 15 libras. Na falta de material para as medidas acima, as quantidades serão satisfatórias se usarmos uma medida rasa de colher de sopa do caldo nutritivo desidratado, em um litro d'água. Caso não possamos obter o caldo nutritivo, poderemos utilizar uma lata de sopa de caldo de carne, que será diluída como mandam as instruções do fabricante.

Depois de tudo esterilizado no autoclave, o frasco deverá ser tampado com algodão para manter seu conteúdo esterilizado. Quando o caldo estiver morno, deveremos inoculá-lo com o agente, o que será feito com uma agulha de inoculação bacteriológica, também esterilizada no fogo, como já descrevemos ao tratarmos da obtenção de culturas a partir de uma cultura original.

Também aqui a bôca do tubo ou proveta em que se encontra a cultura é passada na chama, e a seguir, com a agulha já flambada, tocamos a colônia existente no agar, de modo que os microrganismos sejam apanhados na agulha. A tampa de algodão do frasco que contém o caldo é removida, sendo sua bôca passada pela chama, e a seguir a agulha é colocada no caldo. Novamente as bôcas do frasco e da proveta com a cultura original, são levadas à chama, bem como a agulha de inoculação, o que deve sempre ser feito para evitar que outros microrganismos, existentes porventura no ar circundante, venham a contaminar a cultura dos agentes que desejamos cultivar para nossos exercícios.

Se nosso agente fôr *Serratia marcescens*, o caldo de cultura deverá ser incubado, durante 24 horas, em uma temperatura de 27 a 30 graus centígrados, e a seguir mantido sob refrigeração até sua utilização que deverá se realizar dentro de 24 horas.

Caso estivermos utilizando *Bacillus globigii*, a incubação será por 48 horas, a uma temperatura de 37°C, e a seguir, mantida sob refrigeração de um a sete dias antes de ser usado, para obtermos a formação de esporos.

b) Disseminação :

A disseminação dos agentes simulantes pode ser realizada por diversas maneiras, sendo que a mais comum, e cuja utilização foi por nós apreciada em "*The Chemical Corps School*", é a de usar um aparelho de descontaminação de três e meio galões. Pudemos ver também outros recursos, inclusive um que pode ser usado em qualquer uma de nossas Unidades que não disponha de aparelhos de descontaminação: uma bomba comum de Flit, ou de disseminação de qualquer outro inseticida. Também outros aparelhos, semelhantes aos espargidores comerciais de inseticida eram utilizados, tais como os fabricados por Mac Carl Fogmaker e Becker.

Muitas vêzes pode surgir um problema ao iniciarmos o espargimento: o caldo de cultura ser mais espesso do que o desejável. Nesse caso é aconselhável sua diluição em um pouco de água destilada devidamente esterilizada.

A disseminação dos agentes deve ser levada a efeito pelo menos trinta minutos antes do desencadeamento do exercício.

Após a disseminação dos agentes, mais um cuidado se fazia necessário: a descontaminação da aparelhagem utilizada para essa operação, o que se fazia normalmente com álcool ou acetona.

c) *Conduta do Exercício de Coleta de Amostras* :

A organização do exercício, quanto aos locais contaminados e quanto ao procedimento da equipe que vai providenciar a coleta de amostras, irá depender, quase sempre, da maior ou menor imaginação do oficial instrutor. Aqui, descreveremos um exercício típico, como era realizado na "Chemical Corps School", e como pudemos bem observar, por ter tomado parte em um deles no final do estágio que, naquela Escola, realizamos.

Para o mesmo, foi utilizada *Serratia marcescens*, cultivada em quatro litros de caldo de cultura, durante 24 horas, a uma temperatura média de 27 a 30 graus Centígrados caldo esse depois diluído em um volume de água destilada de três galões, que foram disseminados por meio de um aparelho de descontaminação de três e meio galões. Havia sido prevista a inclusão na cultura de um pouco de *Bacillus globigii*, o que não foi feito por necessitar o último de um tempo maior de cultura. Mas a SM dava persistência suficiente para a obtenção, no decorrer do exercício, de boas amostras. Foram montadas quatro estações que tinham de ser percorridas por todos os alunos, divididas em quatro turmas de instrução, de modo a facilitar um melhor controle por parte dos monitores. Nessa turma tomavam parte também algumas praças femininas, *enlisted-women* do Batalhão de WACs aquartelado em Fort McClellan, que tinham de subir as elevações da área de instrução de guerra biológica em igualdade de condições com os homens. O dia chuvoso não auxiliava em nada o exercício, a não ser quanto à persistência dos microrganismos que tínhamos de capturar para depois cultivar e identificar.

Foram montadas as quatro seguintes estações:

- (1) uma construção contaminada,
- (2) uma área de estacionamento contaminada,
- (3) uma bomba disseminadora de aerossóis, e
- (4) um reservatório d'água contaminado.

Na primeira estação, não apenas a construção, mas também a área circundante tinha sido contaminada, de modo que tínhamos de colher amostras, não apenas do edifício, como também do solo e da vegetação, como se o local tivesse sido submetido a um ataque sob a forma de espargimento aéreo. Utilizando a Caixa de Coleta de Amostras, cuja construção já descrevemos, colhemos amostras com os esfregões de algodão, como também amostras de solo, fôlhas e pequenos galhos, guardados nas provetas vazias, destinadas a amostras sólidas.

O procedimento seguido na segunda estação, a da área de estacionamento foi o mesmo adotado na primeira estação, também com coleta de amostras de superfícies e amostras sólidas.

Já a terceira estação apresentava inovações. Havia necessidade de imitar uma bomba, lançada de um avião, que estivesse no solo espalhando agentes de GB, por meio de aerossóis. Assim, tínhamos em nossa frente um pulverizador de grandes dimensões, constituído de uma grande garrafa contendo o agente simultâneo, cuja boca estava em contato com um tubo de saída de uma garrafa de ar comprimido. Esse aparelho espalhava aerossóis contaminados na atmosfera circundante, e para a colheita de amostras tínhamos de utilizar as provetas previstas, existentes na Caixa que conduzíamos. Também aí nessa estação tivemos de colher amostras de vegetação.

Na quarta estação, o reservatório, colocado à margem de um curso d'água de reduzidas dimensões, que atravessava a área de exercícios, tivemos de colher, não apenas amostras líquidas, como também outras,

do solo e da vegetação da margem, para determinar a existência ou não de contaminação.

Depois de percorridas as quatro estações, a etapa seguinte seria vivida no laboratório com a cultura das amostras.

d) *Cultura de amostras :*

As amostras, colhidas no exercício de campo, foram depois cultivadas em placas de Petri, no laboratório, sendo usado agar para o desenvolvimento das colônias. A finalidade do agar nutritivo é a mesma do caldo nutritivo, em que se fez a cultura já descrita neste mesmo trabalho, apenas com a diferença de que o agar é sólido, com uma consistência semelhante à gelatina, crescendo a bactéria na sua superfície.

O agar nutritivo era preparado com a adição de duas colheres de sopa de *agar-agar* em aproximadamente um litro do caldo nutritivo. Também havia no laboratório agar nutritivo desidratado, e para esse, tinha de ser usado 23 gramas para um litro de água fria.

Depois dessa mistura pronta, a suspensão obtida era aquecida até que o líquido se apresentasse claro, isso feito a uma temperatura de aproximadamente 50°C. Enquanto o líquido ainda estava quente era colocado nos Discos de Petri, para cobrir apenas os fundos dos mesmos, que logo eram devidamente cobertos com suas tampas, e esterilizados no autoclave, a uma pressão de 15 PSI. Algum tempo depois, já frio, o agar nutritivo se apresentava solidificado.

Para esses Discos de Petri é que transferíamos as amostras colhidas no campo, dependendo do tipo das mesmas, o procedimento adotado para a transferência. Para as amostras obtidas com os esfregões de algodão, os mesmos eram, apenas, esfregados na superfície do agar como se estivéssemos ali desenhando um "Z", conforme mostra a figura 10.

Para as amostras de ar ou água, um esfregão de algodão devidamente esterilizado, era imerso no líquido, ou introduzido na proveta contendo o ar coletado, e a seguir esfregado na superfície do agar, da mesma forma já descrita acima.

As amostras de solo ou vegetação, como também qualquer outra amostra sólida, era apenas apanhada com pinças e colocada na superfície de agar, ali sendo deixadas no Disco de Petri.

Cada um dos Discos de Petri, já contendo a amostra nêle colocada, era marcado com lápis dermatográfico para futura identificação, e a seguir colocado no incubador, nêle permanecendo por um período de 24 horas, a uma temperatura de 27 a 30°C, no caso de ter sido utilizada *Serratia marcescens*, ou uma mistura dessa e de *Bacillus globigii*.

Se o agente estimulante usado tivesse sido apenas o último, a temperatura de incubação seria de 37°C.

Depois da incubação, os Discos de Petri eram examinados pelos alunos para a identificação dos agentes de guerra biológica, colhidos nas amostras obtidas no campo. No caso dos agentes simulantes usados no exercício que estamos descrevendo, a existência dos mesmos era facilmente constatada pela presença de colônias vermelhas de SM ou das colônias amarelas de BG. Muitas vezes outras colônias surgiam nos Discos de Petri, devidas principalmente à contaminação da amostra, no momento de sua obtenção, ou mesmo na ocasião da transferência da amostra para o Disco. Mas, a finalidade do exercício estava cumprida, pois os detalhes de identificação não estavam incluídos nos seus objetivos. Em caso real de Guerra Biológica, a identificação dos possíveis agentes biológicos utilizados pelo inimigo, seria muito mais difícil, envolvendo uma série de testes, além do exame das colônias ao microscópio para a devida identificação. Mas, aí o trabalho já seria

dos técnicos, devidamente habilitados. Com essa simples identificação, pela côr, das *colônias*, dos agentes simulantes, nosso exercício terminava, e tínhamos, apenas, de levar novamente os Discos de Petri ao autoclave, para matar os micro-organismos, e também levá-los e limpá-los para futura utilização em outros exercícios.

V — CONCLUSÃO

A finalidade do presente trabalho não é, como foi esclarecido desde o início, doutrinar quanto aos exercícios possíveis para um treinamento de oficiais e graduados, tornando-os aptos para a guerra biológica, mas apenas transmitir algo do que podemos apreciar em um Exército mais bem dotado que o nosso, e em que essas formas de guerra são levadas a sério. No entanto, não queremos terminar antes de transmitir mais alguma coisa com relação à possibilidade de realizar um desses exercícios em nosso meio. Como vimos, não pode existir dificuldades para a construção de uma Caixa de Amostras. Para facilitar, as figuras 4 e 5 dão o plano detalhado para a construção de uma delas, se bem que as medidas sejam aproximadas, podendo sofrer adaptações conforme o material conseguido pelo interessado, e as modificações que êle queria fazer.

Mas, pode ainda surgir objeção quanto à obtenção do autoclave e do incubador. Realmente, são materiais difíceis de obter, mas o problema poderá ser resolvido como a seguir expomos.

a) Autoclave :

A adaptação prática para solucionar o problema do autoclave foi feita utilizando um material encontrado em casa de qualquer oficial-insultor que a queira fazer. O único problema a enfrentar será a reação da esposa, pois se trata de uma panela de pressão.

A que vimos funcionar como autoclave tinha, no seu interior uma grelha que era usada quando os Discos de Petri iriam ser esterilizados, e retirada quando a esterilização era das provetas. Colocando-se um litro de água na panela sem tampa, ela era levada ao fogo, até que a água fervesse, ocasião em que era tampada, porém, conservando-se a válvula livre para deixar escapar todo o ar ainda existente em seu interior. Quando o vapor começava a sair pela válvula, a mesma era coberta com sua tampa. Na que apreciamos havia um marcador de pressão, e quando êle marcava 15 lbs/sq deixava-se esterilizar a essa pressão, durante um tempo de 15 minutos, ou de 20 a 30 minutos se êsse autoclave adaptado estivesse cheio de material a ser esterilizado.

A seguir, desligando o fogo, esperava-se que a pressão voltasse ao normal, para então abrir a panela. Sempre que se estivesse esterilizando Discos de Petri, a grelha tinha de ser usada para evitar que a água fervente os atingisse. Quando se estivesse esterilizando provetas, tôdas elas deveriam estar com seus tampões de algodão.

b) Incubador :

O substituto para o incubador era uma caixa de um congelador retirado de uma geladeira velha, no interior da qual, foram colocadas três lâmpadas elétricas de 100 watt, montadas em série com um termostato. No interior dessa caixa era colocada a câmara de incubação, protegida da luz das lâmpadas, delas recebendo apenas o calor.

Outro processo de incubação simples e capaz de substituir um incubador normal é aconselhado pelo Tenente-Coronel Médico Dr. Gonzalo Piedrola Gil, professor do Instituto de Higiene Militar, do Exército Espanhol, e consiste de um simples colête, facilmente adaptável ao tórax do indivíduo, tendo em sua parte interior uma sacola de plástico, na

qual os Discos de Petri, com os micro-organismos que devem ser cultivados, são colocados. A sacola de plástico, ficando separada da pele, apenas por uma fina tela, faz com que se obtenha nesse portátil incubador, uma temperatura de 33 a 37°C.

Mas, se não tivermos pressa em obter a cultura, poderemos também dispensar o incubador, pois a *Serratia marcescens* se desenvolverá em uma temperatura normal (25° Centígrados) em 48 a 72 horas, ao passo que se a temperatura fôr de 27 a 32°C levará, apenas, 24 horas. Por outro lado, o *Bacillus globigii*, a uma temperatura de 32°C levará 48 horas para nos dar uma boa cultura.

c) *Outras adaptações :*

Em linhas gerais, eis um exercício de guerra biológica que exige o mínimo para sua realização. Infelizmente nossas áreas de instrução não dispõem do mínimo indispensável para exercícios militares sem trazerem perturbações para os residentes civis das proximidades. Assim sendo, muitas vezes não será possível, principalmente em locais densamente povoados, utilizar os agentes simulantes descritos. Mas, a instrução não pode parar, e mais uma adaptação tem de ser providenciada. Para isso, iremos perder um pouco do realismo, mas ainda assim, teremos um exercício de guerra biológica sem utilizar agentes GB, nem mesmos simulantes.

Todos conhecem os pós fluorescentes utilizados em certas tintas de cartazes de propaganda, colocados à margem de estradas de rodagem. Alguns desses pós só se tornam visíveis quando iluminados com luz ultravioleta, como devem estar lembrados aqueles que assistiram às aulas de Metodologia da Instrução, ministradas em 1953, na Escola de Instrução Especializada, pelo seu comandante, Coronel Paulo Joaquim Lopes.

Esse pó fluorescente irá atuar no exercício como os micro-organismos encontrados em um aerosol GB. A coleta de amostras será idêntica a por nós descrita para o caso de usarmos os agentes simulantes. Neste caso de mais uma adaptação, porém, as amostras devem ser imediatamente observadas sob uma luz ultravioleta, para determinarmos se são positivas ou não. No exercício que observamos com a utilização desse pó, o usado foi o *Strobolite*, que aparecia, sob a luz ultravioleta, com uma luminosidade branca acinzentada.

Finalmente, acreditamos que não será difícil a reconstrução, com os nossos recursos, de um exercício igual ao descrito. Com uma combinação eficiente de esforços, poderemos ter um exercício semelhante, tanto no Batalhão Oswaldo Cruz, quanto na Companhia Escola de Guerra Química, desde que o Instituto de Biologia do Exército coopere, fornecendo os nossos agressores.

Finalmente, o exercício poderá ainda ser adaptado para demonstração, que poderá ser levada a efeito por dois instrutores, em uma área relativamente pequena.

Referências - Nada de novo existe neste trabalho. Seus dados são originados das seguintes fontes :

- Chemical Corps School Mimeo 5246.2 (Revised 28 Aug 1956);
- The Cml C Sch Mimeo 5241.1 (Revised March 1956);
- Nuevas técnicas para la defensa ante las agresiones bacteriológicas - Ten-Cel Med Gonzalo Piedrola Gil, profesor del Instituto de Higiene Militar, y José Amaro Lasheras, profesor de la Academia de Sanidad Militar (Ejército - N. 212 - Septiembre 1957);
- Apontamentos tomados em "The Chemical Corps School - Fort Mac Clellan - U.S.A.", em janeiro de 1957.