

Estudos sobre a Lepra

II. TENTATIVAS DE CULTURA DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE*.
(*COCCOTHRIX LEPRAE*, LUTZ 1886). ISOLAMENTO DE UM ACTINOMYCES DE UM
LEPROMA. O *ACTINOMYCES LEPROMATIS*, n. sp. (Amostra HILDA). (1)

PELO

DR. H. C. de SOUZA-ARAÚJO.

(Com as estampas 40-43).

No correr deste anno fiz varias tentativas de culturas do germen da lepra, em meios artificiaes, sempre com resultado negativo. De regra os meios semeados, com emulsões de lepromas, extirpados com a pelle, apresentam-se contaminados dentro de 24 horas.

A doente H. S., que me foi recomendada pelo Dr. OSWINO PENNA, forneceu material riquissimo em bacillos de HANSEN, muito proprio para sementeiras e inoculações. A 5 de Julho findo extirpei-lhe, a bisturi, um grande leproma flórido do braço esquerdo (V. fig. 1, a), que triturei em gral esterilizado, com agua physiologica, obtendo uma emulsão abundante em bacillos acido-resistentes, que não denotou a presença de nenhum outro germen. Com esse material inoculei varios pequenos animaes e fiz sementeiras

nos meios communs. No dia seguinte notei rica proliferação de germens banaes em todos os meios.

Dous dias após (7 de Julho), extirpei outro grande leproma (Fig. 1, b), do antebraço esquerdo da mesma doente. Usei outro processo, que talvez se possa chamar de enucleação do leproma: incisei a pelle em cruz, destaquei os quatro cantos deixando a descoberto o leproma, de aspecto amarellado e facilmente destacavel. Extirpei-o assim, sem a pelle, triturei-o pelo mesmo processo acima, obtendo uma emulsão homogenea, muito rica em bacillos, com a qual inoculei animaes e repeti as sementeiras nos diversos meios de culturas.

Outros lepromas, extrahidos do mesmo modo, foram divididos em pequenos fragmentos e estes collocados sobre agar-

(1) Vide Supplemento nº. 4 das Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Dezembro 1928.

glycerinado, em camada inclinada, e em batata glycerinada. 24 horas depois nenhum tubo apresentava contaminação. E assim nos dias subsequentes, facto que nos alegrou. Os tubos foram, na sua maioria, conservados á temperatura ambiente.

O exame macroscopico dessas sementeiras nada mostrou de notavel até o 15º dia. Depois disso uma sementeira em caldo glycerinado começou a mostrar ligeiro grumo no fundo do tubo. O meio permaneceu limpido. No 23º dia da sementeira preparados do caldo, colhido com pipeta no fundo do tubo, corados pelo ZIEHL-NEELSEN, revelaram uma cultura mixta de bacillos acido-alcool-resistentes, em feixes e massas (Fig. 2), e filamentos ramificados alternadamente, impregnados pelo corante de fundo.

Nesse periodo os Drs. LUTZ e FONTES examinaram a cultura e viram os esfregaços, achando-os interessantes. No dia 3 de Agosto a cultura estando mais rica em filamentos e conservando sempre massas de bacillos da lepra, foi transplantada para agar simples e glycerinado, e em batata glycerinada, caldos simples e glycerinado. Nos dias 6 e 11 foram feitas novas repicagens, duas dellas pelo Dr. A. MACHADO. As sub-culturas mostraram logo um cogumelo cujo aspecto macroscopico e microscopico era de um actinomyceto typico, como declarou o Dr. O. DA FONSECA, chefe da Secção de Mycologia do Instituto, que teve a bondade de acompanhar os meus estudos e collaborar na descripção do cogumelo.

Dias depois o meu servente de laboratorio quebrou, accidentalmente, o tubo dessa cultura original.

Examinando, então, as sub-culturas em caldo simples e o liquido da cultura em batata, verifiquei que ahi tambem se encontravam, entremeiados com os filamentos do actinomyces, feixes de bacillos acido-alcool-resistentes.

Todas as subculturas germinaram exuberantemente, algumas desde as pri-

meiras 24 horas, e sempre puras: contendo o mesmo actinomyces adeante descrito.

Depostos fragmentos de lepromas em tubos de agar glycerinado notei que o bacillo de HANSEN se multiplicava grandemente no proprio tecido leproso, sem, comtudo, invadir o meio de cultura e por isso as repicagens foram infructiferas.

Raspagem daquelle material depois de 60 e até 120 dias, com alça de platina, dava esfregaços ricos em bacillos acido-alcool-resistentes, como mostram as figuras B e C, 4, da estampa colorida e a photomicrographia nº. 4. Esse alimento especial exgottado a cultura estanca e não mais se regenera (?). Verifiquei esse facto não só com material da doente H. S. como de mais tres outros, não passando duma repetição dos resultados das pesquisas de NEISSER, BÉZANÇON, EMILE-WEIL, NICOLLE, dentre os antigos, e dentre os modernos de HERMANN de SCHROETTER, de VIENNA, com a sua sementeira em caldo com 2/3 de sôro de leproso, de SUSVIELA GUARCH, de MONTEVIDÉO, em meio de CARREL no qual vi lepromas em cultura desde 11 mezes, com exuberante multiplicação dos bacillos da lepra, sem a desejada adaptação ao meio artificial. O que vi no Japão (Osaka), nos laboratorios de HARADA e KUJO, é mais significativo: os fragmentos de lepromas servem de alimento natural dos bacillos que, se multiplicando sempre, pouco a pouco se adaptam á parte solida do meio de HARADA e depois á parte liquida, permittindo repicagens e produzindo infecções em animaes de laboratorio.

A transplantação desses fragmentos de lepromas, de meio exausto para meios frescos, após 105 dias de sementeira, nada adeantou ao plano de isolamento e cultura do bacillo de HANSEN.

Bacillos acido-alcool-resistentes são ahi encontrados durante longo tempo, mas provavelmente provenientes da desagregação do tecido leproso.

MORPHOLOGIA DO *ACTINOMYCES LE-PROMATIS*.

CULTURAS—em meios líquidos.

1) *Caldo simples*—5 dias (a partir de caldo simples do 7—8—928).

Colônias esféricas, brancas, com aspecto de algodão, mais escuras no centro, medindo de 1 a 3 mm. de diâmetro, depositadas no fundo do tubo. O meio está límpido e de coloração normal.

Com 10 dias, á temperatura ambiente, as colônias apresentam o mesmo aspecto, porém formando maior depósito. O meio continúa límpido, mas ligeiramente pigmentado. Às vezes as colônias se desenvolvem no meio do líquido, sem formar depósito nem véo, e também sem adherir ás paredes do tubo.

Com 70 dias as colônias continuam isoladas, mais ou menos esféricas ou deformadas, no fundo do tubo. O meio continúa límpido, mas impregnado de pigmento acastanhado. Póde-se observar também o desenvolvimento de um collar na parede do tubo, na superfície do meio, cuja parte inferior apresenta aspecto irregular, de coloração amarella de cêra; a parte superior se apresentando esporulada, coberta de uma camada branca, pulverulenta, de aspecto cretáceo.

Com 90 dias as colônias deixam de ser globosas, constituindo forte grumo, com o aspecto de algodão. Num tubo de 82 dias houve formação d'uma colônia acuminada, amarella, na superfície do líquido. Um tubo semeado a 10. X, a partir de caldo simples, de 21. VIII, apresenta um anel de colônias globosas, grandes, na parte média do caldo. D'ahi para cima o líquido está fortemente pigmentado. Na parte inferior do caldo ha pequenas colônias boiando, não ha depósito, e pouquissima pigmentação. Na superfície do meio, e adherentes ás paredes do tubo, existem colônias planas, brancas, radiadas. Dessa época em diante as culturas não apresentaram alteração notavel.

2) *Caldo simples recoberto de uma camada de oleo de paraffina*.—A sementeira de 5 dias apresenta colônias globosas, brancas, depositadas no fundo do tubo, semelhantes macroscópica e microscopicamente ás do caldo simples, sem oleo, semeado no mesmo dia. Trata-se, portanto, d'um actinomyces anaerobio facultativo.

O meio permanece límpido e sem pigmento.

No 10º dia pouco augmentou a germinação. O meio está ligeiramente pigmentado. Com 20 dias de idade não houve alteração.

Outra cultura de 10 dias, a partir de agua de batata glicerinada, de 1ª. repicagem, produziu pequenas colônias globosas no fundo do tubo, e o meio conservou-se límpido e sem pigmentação.

3) *Caldo glicerinado a 5 %*. Sementeiras de 5 e 10 dias apresentam colônias de aspecto analogo ás do caldo simples, porém em menor numero e menos exuberantes. No 10º. dia ha um ligeiro pigmento. No 70º. dia o meio continúa límpido, pigmentado de acastanhado, menos intensamente que o caldo simples. Não ha formação de collar na superfície. Cultura de 10 dias, a partir de agua de batata glicerinada de 7.VIII., turvou ligeiramente o meio, e produziu um sedimento amorfo, semelhante a flóco de algodão.

4) *Leite*. Sementeira de 10 dias. Não ha coagulação do meio. A cultura se apresenta sob a forma do véo que se prolonga da superfície para baixo, pelas paredes do tubo, em anel, onde o reverso das colônias póde ser observado com a sua coloração amarella viva, nalguns pontos, e amarella castanha em outros. O véo apresenta coloração alaranjada e se fragmenta facilmente. A metade inferior do leite apresenta côr e aspecto normaes. A coagulação do leite se deu no 15º dia. Este coagulo se acha sepa-

rado da cultura, que é superficial, por uma camada de sôro claro. Com 25 dias de idade o coagulo se apresentou pigmentado de castanho, na parte superior, e está separado da cultura superficial por uma camada de liquido claro como agua, de 1 ctm. de altura. A cultura que cobre o meio é de côr escura e de 4 mm. de altura. Dahi para cima, adherentes ás paredes do tubo, existem colonias ferruginosas, seccas, fragmentadas. No 40º dia esse aspecto se mantinha quasi inalterado.

5) *Agua peptonada a 1 0/0, com 1 0/0 de sôro de leproso.* Semeadura de 5 dias apresenta abundantes colonias globosãs, no fundo do tubo, de dimensões extremamente variaveis, attingindo algumas 3 mm. de diametro. O meio está ligeiramente impregnado de pigmento acastanhado. No 10º dia apresenta muitas colonias superficiaes, adherentes ao tubo, de tamanho variavel e aspecto de lichen, com zonas brancas (esporulação) nas bordas e côr castanha no centro. O meio continúa limpido, mas fortemente pigmentado. No 20º dia apresentou um anel superficial de colonias brancas, pulverulentas, de 2 a 3 mm., e adherentes ao tubo. O reverso dessas colonias é pigmentado de castanho. No 35º dia essas colonias brancas apresentavam-se maiores, mais seccas e o liquido fortemente pigmentado em castanho, sem augmento do deposito.

CULTURAS—em meios solidos.

1) *Agar simples inclinado.* As sementeiras de 5 dias, a partir da cultura original em caldo glycerinado, apresentavam colonias translucidas, acinzentadas, fortemente adherentes ao substractum, com uma zona média ligeiramente acuminada, de cujo centro partiam 4 a 6 depressões ou sulcos radiados, ás vezes dispostos em cruz (Fig. 5, a e 2 da estampa colorida).

Essas mesmas culturas, com mais de 60 dias, apresentavam colonias grandes, acinzentadas ou amarelladas, com uma periphéria achatada e lisa, de cerca de 1 mm. de largura. A sua adherencia ao meio é muito accentuada.

As primeiras repicagens em agar simples, inclinado, deram colonias confluentes, raramente isoladas, formando um revestimento quasi continuo, rugoso, apresentando grande semelhança com a amostra 39 (livro *Strahlenpilze* de LIESKE, fig. 5 da estampa 1), do actinomyces aerobio isolado do sangue dum homem atacado de actinomycose, e cultivado em agar com extracto de carne peptonado.

As subculturas de 5 dias, a partir de agar glycerinado, e conservadas na temperatura do laboratorio, apresentam colonias medindo mais ou menos 3 mm., em diametro, acuminadas, muitas vezes de côr branca no apice, onde se encontra um ponto escuro correspondendo a um pequeno pertuito. No fim de 10 dias as colonias medem cerca de 1/2 ctm. de diametro, de côr amarella de cêra, com uma superficie extremamente rugosa, quasi cerebriforme. No 20º dia apresentam um enduto mais ou menos continuo, rugoso, semelhante a uma camada de verniz, translucida, quasi acinzentada. As colonias que crescem junto á agua de condensação são isoladas, de 2 a 3 mm. de diametro, acuminadas e deprimidas no vertice, donde partem 2 a 3 sulcos radiados.

No fim de 60 dias a cultura apresenta-se sob a forma d'um revestimento mais ou menos continuo, rugoso, de coloração amarella, sobretudo nas bordas, podendo apresentar esporulação. O meio mostra-se impregnado de um pigmento acastanhado. O reverso das colonias é alaranjado. Depois de 60 dias o agar apresenta-se carcomido e a cultura começa a degenerar.

Semeaduras em placas, a partir de agar glycerinado, mostram no 5º dia co-

lonias maiores que no agar em tubo, de cor branca, aspecto pulverulento (V. fig. 1 da estampa colorida) e forma mais ou menos nummular, quando coalescente.

Em torno de cada colônia vê-se um halo de cerca de 1 cm. de diâmetro, de pigmentação acastanhada, que se vai esbatendo para a periferia. O reverso das colônias é de coloração alaranjada.

Culturas a partir de agar simples, da 2a. geração, mantêm sempre o revestimento translucido, acinzentado e até 90 dias não esporulam, enquanto que as partidas de agar glicerinado dão colônias acuminadas, confluentes e amareladas, esporulando cedo. O seu desenvolvimento máximo se dá até 20 dias, depois estaciona, custando muito a regredir.

2) *Agar glicerinado*. Semeaduras de 10 dias, a partir de agar glicerinado a 5% em camada inclinada, apresentam na superfície do meio um espesso revestimento contínuo, bastante rugoso, de coloração amarello-dourada, tendendo para o alaranjado. O meio começa a se pigmentar. Às vezes nesse período tem início a formação de zonas de esporulação. No 25º dia a coloração alaranjada está mais accentuada, assim como a impregnação do pigmento.

Com 2 meses de idade a cultura é constituída por um revestimento espesso, rugoso, cheio de zonas salientes, quasi cerebriforme e de coloração dourada ou alaranjada. O meio está impregnado de pigmento castanho. Nesse período o revestimento branco cretáceo, correspondente às zonas de esporulação, invadiu grande parte da cultura (V. figs. 5, b e c). Já vimos que na gelose simples, em placa de PETRI, essa esporulação é muito precoce, talvez devido às melhores condições de arejamento das culturas. Doutras feitas, em meios pouco nutritivos essa esporulação se manifesta também muito cedo, em colônias pouco exuberantes, indicando defesa contra as condições dysgenéticas.

As semeaduras por picada, em agar em pé, se desenvolvem mais lentamente, mas no fim de 2 semanas o pigmento acastanhado já tem penetrado a mais de 1 cm. do meio. Na superfície as colônias são idênticas às descritas acima. O reverso das colônias desenvolvidas na parede do tubo pôde ser nitidamente observado.

A cultura de 30 dias, a partir de caldo simples de 7.VIII. (2a. geração), apresenta grandes colônias radiadas, acuminadas, confluentes, amareladas e medindo 1/2 cm. de diâmetro. Não há esporulação e o meio está uniformemente pigmentado de castanho claro. As últimas repicagens germinaram menos bem, devido, talvez, à composição do meio. Regra geral o agar glicerinado a 5% tem o pH=6,9. A fig. 6 (a e b) mostra culturas velhas (3 meses) em agar glicerinado.

3) *Agar com manteiga*. Semeaduras de 5 dias, em agar com manteiga inclinado, a partir de agar glicerinado, desenvolveram-se pujantemente, em camada contínua de colônias coalescentes, meio translúcidas, de coloração amarelada, sem zonas de esporulação macroscopicamente visíveis.

As colônias desenvolvidas na parede do tubo mostram um reverso de coloração amarela viva. A pigmentação acastanhada do meio é pouco accentuada.

No 10º dia de germinação a cultura tinha tomado toda a superfície do meio, cuja pigmentação augmentou um pouco sem contudo apparecerem zonas de esporulação. No 20º dia a cultura cobre todo o meio, em camada contínua, rugosa e de coloração amarelada.

Em tubos de 2a. geração, com 22 dias, foram encontradas massas de bacilos ácido-alcool resistentes, em esfregos com campos de filamentos não ácido resistentes (fig. 5, da Estampa 43). Em tubos de 3a. geração, no 4º dia, algumas colônias se mostraram esporuladas. As

culturas antigas estão fortemente adherentes ao meio.

4) *Agar-oleo de olivas*. Semeaduras da mesma procedencia acima, no 5º dia apresentavam aspecto semelhante ao precedente, porém as colonias eram mais isoladas e menos coalescentes, de coloração amarella mais intensa, tendendo para o alaranjado.

A pigmentação deste meio é maior que a do agar com manteiga. No 10º dia a cultura tornou-se mais exuberante, o pigmento pouco mais intenso e não ha esporulação apreciavel, macroscopicamente. As semeaduras em agar com manteiga e em agar com oleo de olivas visaram a transformação do actinomyces em acido-alcool resistente, conforme aconselha LIESKE.

No 20º dia esta cultura differe da precedente por apresentar-se lusidia, dando a impressão de humidade. Não mostra esporulação. Na 2a. geração, em tubos de 22 dias, encontrámos bacillos acido-resistentes. Não se vê esporulação.

5) *Gelatina*. Semeadura de 20 dias produziu pequenas colonias adherentes ao tubo, na superficie do meio, recobertas de esporulação. Não houve fusão do meio.

6) No meio de *Sabouraud*, maltosado, a proliferação do actinomyces foi pobre, quasi nulla.

7) *Batata glycerinada*. Desenvolvimento rapido e exuberante sob a forma de colonias coalescentes, de aspecto cerebriforme, coloração amarello-alaranjada, sobretudo na porção central, salpicada de numerosos pontos branco-acinzentados, de aspecto cretaceo, correspondentes ás zonas de esporulação. O meio é invadido de pigmentação violacea, quasi negra, que ás vezes se propaga até á propria massa das colonias.

A agua de condensação apresenta-se limpida, sem germinação apreciavel.

Com 15 dias a cultura apresenta o mesmo aspecto anterior, apenas o meio está ennegrecido, e as colonias se apresentam mais elevadas e mais coradas. A esporulação reveste grande parte da cultura (Fig. 7,a).

O liquido continúa limpido, mas apresenta um véo branco.

No 25º dia não houve grande alteração. O desenvolvimento da cultura attingira o seu maximo no 15º dia. A esporulação é mais accentuada nas bordas. Num tubo a agua de condensação tornou-se pigmentada devido á proliferação ahi d'algumas colonias esfericas, eguaes ás já descriptas no caldo.

8) *Meio de PETROFF*. Desenvolvimento pouco apreciavel em 10 dias. No 15º dia um dos tubos apresentava uma linda colonia, bastante saliente, de 2 mm. de diametro por 1 1/2 de altura, de coloração amarella viva. O reverso das colonias mostra uma auréola de pigmentação quasi negra, muito circumscripta. Até o 25º dia não houve augmento de colonias, mas as primitivas (do centro do meio) mostraram-se muito pujantes e de aspecto cerebriforme.

9) *Sôro de LOEFFLER*. Repicagem de 10 dias, a partir de agar glycerinado, apresenta colonias de aspectos diferentes, conforme a zona do tubo.

As colonias que se desenvolveram em contacto com a agua de condensação apresentam um aspecto acuminado, com uma porção central deprimida ou umbilicada, de coloração amarellá viva. A periphéria dessas colonias apresenta uma série de sulcos radiados e é de coloração amarello-pardacenta. Em torno dessas colonias desenvolve-se um halo de pigmentação castanho-escura, quasi negra, formando uma corôa de cerca de meio centimetro de altura. O reverso dessas colonias, tanto quanto póde ser apreciado, apresenta coloração muito escura.

As colônias desenvolvidas no centro do meio são dum amarello-alaranjado, mais claro que as acima descriptas, são acuminadas e têm a superficie irregular, quasi cerebriforme. O seu reverso tem a mesma coloração do anverso.

As colônias desenvolvidas na parte mais secca do meio têm a mesma apparencia das outras, porém são quasi planas, produzindo pigmentação castanho-escura. As mais seccas são constituídas de zonas concentricas, muitas vezes cobertas de uma camada cretacea.

No 15º dia as colônias em contacto com a agua de condensação eram mais crescidas, as da zona secca da parte central atrophiadas, e a pigmentação escura do meio, mais accentuada. A agua da condensação está limpida, mas pigmentada.

Até o 25º dia não houve alteração. No 40º dia parte da cultura (a superior) estava degenerada, pela exhaustão do meio.

Culturas de 3 e 4 mezes repicadas germinaram normalmente apresentando os mesmos caracteres acima descriptos 2 mezes após.

EXAME MICROSCOPICO

O *Actinomyces lepromatis*, como a maioria dos actinomycetos, é Gram-positivo e não acido-alcool-resistente. A sua passagem pelos meios com manteiga e com oleo de olivas produziu formas bacillares acido-resistentes. Mezes depois repetida esta repicagem os resultados não foram tão nitidos; os elementos acido-resistentes eram filamentos e não bacillos.

Esfregaços de culturas em todos os meios habituaes, mesmo do agar simples, em camada inclinada, onde as suas colônias são muito adherentes ao substractum, mostram sempre o cogumelo com a sua morphologia caracteristica—thallo rudimentar, incolôr (examinado a fresco entre lamina e laminula), com ramificações verdadeiras, em direcções alternadas (Fig. 8). Esses longos filamentos

nunca se apresentam fragmentados em articulos bacillares, nos meios habituaes. Pertence, portanto, ao 1º typo das *Actinomycetaceas*.

Corado pelo Gram, si a cultura é flórida, todos ou quasi todos os filamentos se apresentam nitidamente corados em violela-escura. As culturas mais edosas apresentam filamentos mal corados pelo Gram.

Corados pelo ZIEHL-NEELSEN, tanto as culturas novas como as velhas, apresentam só filamentos nitidamente corados em azul. Trata-se de umá especie aerobia esporulante.

A esporulação de regra começa no meio da cultura, sob a forma duma camada superficial esbranquiçada, de aspecto cretaceo, deixando destacar-se com a alça de platina, mais facilmente que as colônias. Esfregaços dessa esporulação, corados pelo Gram, mostram massas de elementos coccoides, ligeiramente alongados, com aspecto de minusculas sementes (Fig. 9). Os esporos são Gram-positivos.

Esfregaços de culturas em agar-manteiga (2a., 3a. e 4a. gerações respectivamente de 22, 4 e 10 dias), apresentaram campos com filamentos eguaes aos da figura 8, com filamentos fragmentados em bastonetes não acido-resistentes (Fig. 10), dando a impressão de lyse do mycelio com conservação dos seus elementos regeneradores, e campos com filamentos, bastonetes e massas de bacillos nitidamente acido-alcool resistentes (Fig. 11 e 12 e estampa colorida fig. 5, B.).

Este facto veio provar que o *Actinomyces lepromatis* póde tornar-se bacilliforme, acido-alcool-resistente, por absorpção dos lipoides do meio, propriedade que talvez se torne permanente, por passagens repetidas no mesmo meio, o que não conseguimos até esta data.

Os estudos proseguem, não só quanto á biologia do novo cogumelo, como tambem na sua parte experimental. A sua

inoculação, em pequenos animaes de laboratorio, tem produzido a morte destes em poucos dias e sómente numa cobaya, inoculada por via intraperitoneal, encontrei filamentos finos e raros, nos esfregaços das visceras. As inoculações na mamma de cabra e de cadella não produziram lesões em 6 mezes. Tres coelhos, inoculados por via intravenosa morreram sem apresentar lesões nem o parasito.

CONCLUSÕES

1. Não sei, ainda, que relação tem o *Actinomyces lepromatis* com a lepra. O seu isolamento é a repetição, em parte, dos resultados das pesquisas de DEYCKE e RESCHAD, WILLIAMS, ROST, KEDROWSKY, HERMANN de SCHROETTER, e outros.

2. O professor W. J. KEDROWSKY,

de MOSCOU, após longos annos de estudos, chegou á conclusão, conforme declarou á Terceira Conferencia Internacional da Lepra (1923) e agora em importante artigo publicado no «Journal of Tropical Medicine and Hygiene» (Vol. 31, No. 2, January 1928), de que os bacillos da lepra e da tuberculose pertencem ao grupo dos Actinomycetos.

3. Recentemente KEDROWSKY, BRULOWA, PLATANOV, etc., conseguiram mutações de culturas velhas de bacillos da lepra e da tuberculose em Actinomyces.

4. Culturas do *Actinomyces lepromatis* produziram, em meios com manteiga e com oleo de olivas, formas bacillares acido-alcool-resistentes.

Manguinhos, 31 de Dezembro de 1928.



Fig. 1



Fig. 2



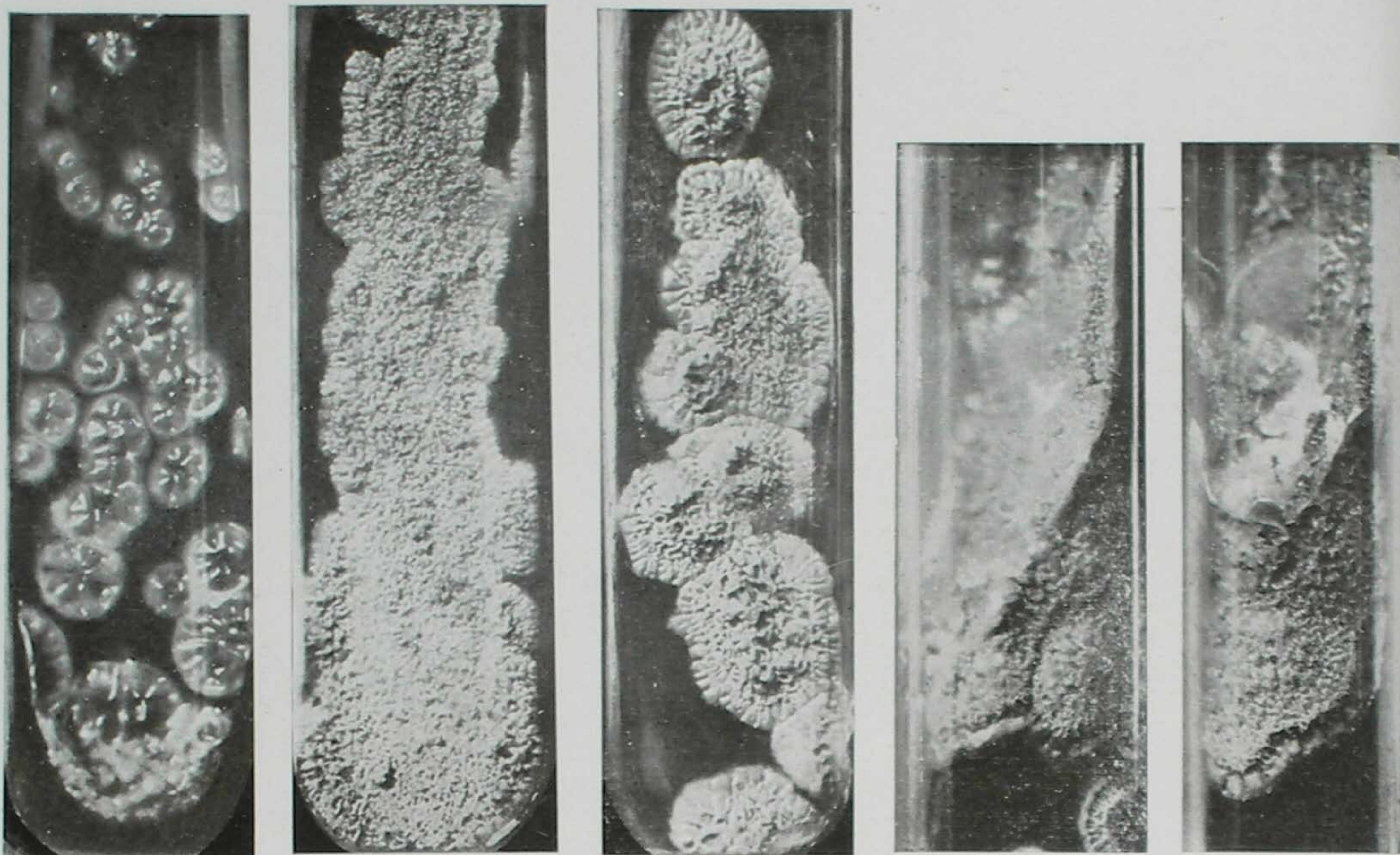
Fig. 3



Fig. 4

Fig. 1. A doente H. S. que forneceu material para as culturas (lepromas *a* e *b*). Fig. 2. Cultura mixta : bacillos acido-resistentes e filamentos. Fig. 3. Uma globia entre os mycelios do *Actinomyces lepromatis*. Fig. 4. Esfregaço da cultura de leproma em agar glicerinado (105 dias) : só bacillos acido-resistentes.

Fig. 1. The patient H. S. who provided material for the cultures (lepromata *a* & *b*). Fig. 2. Mixed culture: acid-fast bacilli and filaments. Fig. 3. A "globe" among the mycelia of the *Actinomyces lepromatis*. Fig. 4. A scraping of a leproma culture in glycerine agar (105 days) : acid-fast bacilly only.

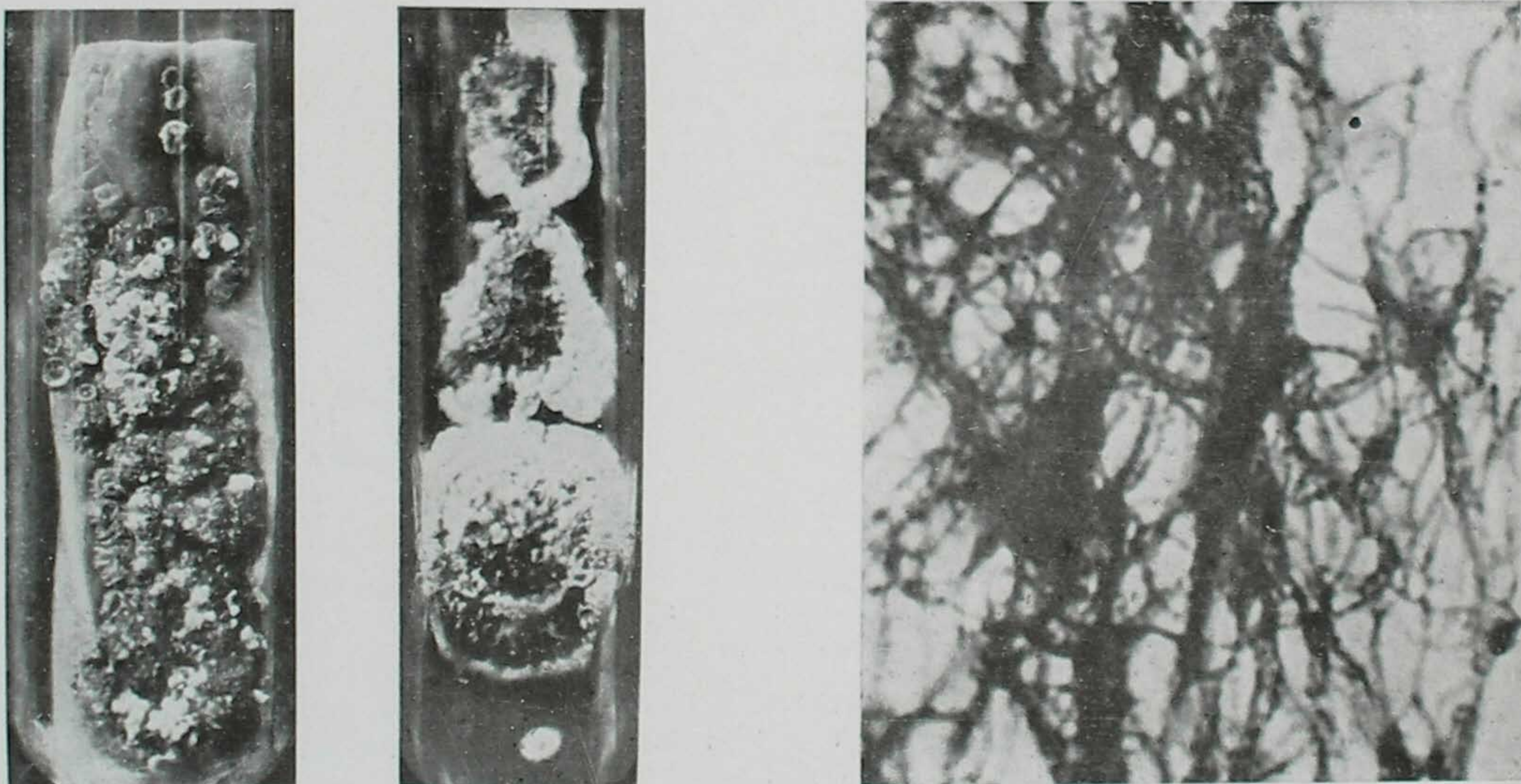


a

b
Fig. 5

c

Fig. 6



a

Fig. 7

b

Fig. 8

Fig. 5. (a) Cultura do *Actinomyces lepromatis*, de 60 dias, em agar simples. Culturas em agar glicerinado, de 17 dias (b) e de 60 dias (c). Fig. 6. Culturas em agar glicerinado, de 75 dias. Fig. 7. Culturas de 10 dias em batata glicerinada (a) e de 60 dias em agar glicerinado (b), coberta duma camada branca, cretacea, de esporulação. Fig. 8. Esfregaço de cultura pura do *Actinomyces lepromatis* (2a geração) em agar glicerinado.

Fig. 5. (a) A 60 days' culture of *Actinomyces lepromatis* in plain agar, 17 (b) and 60 days' (c) cultures in glycerine agar. Fig. 6. Cultures in glycerine agar old 75 days. Fig. 7. Culture of 10 days in glycerine potato (a) and 60 days in glycerine agar (b) covered with a white cretaceous coating of sporulation. Fig. 8. Smear of pure culture in glycerinated agar of the *Actinomyces lepromatis* (2nd generation). Photos J. Pinto

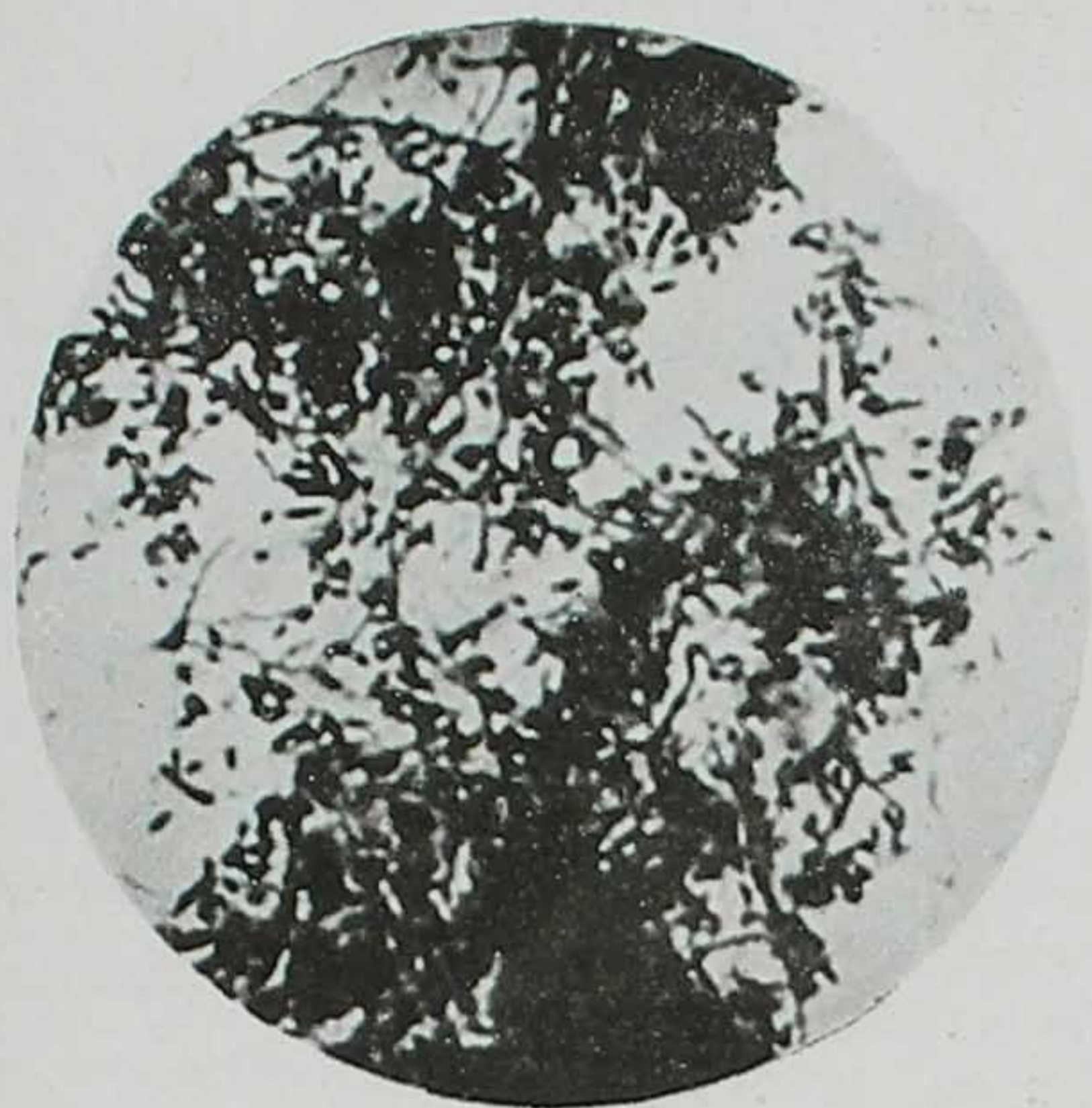


Fig. 9

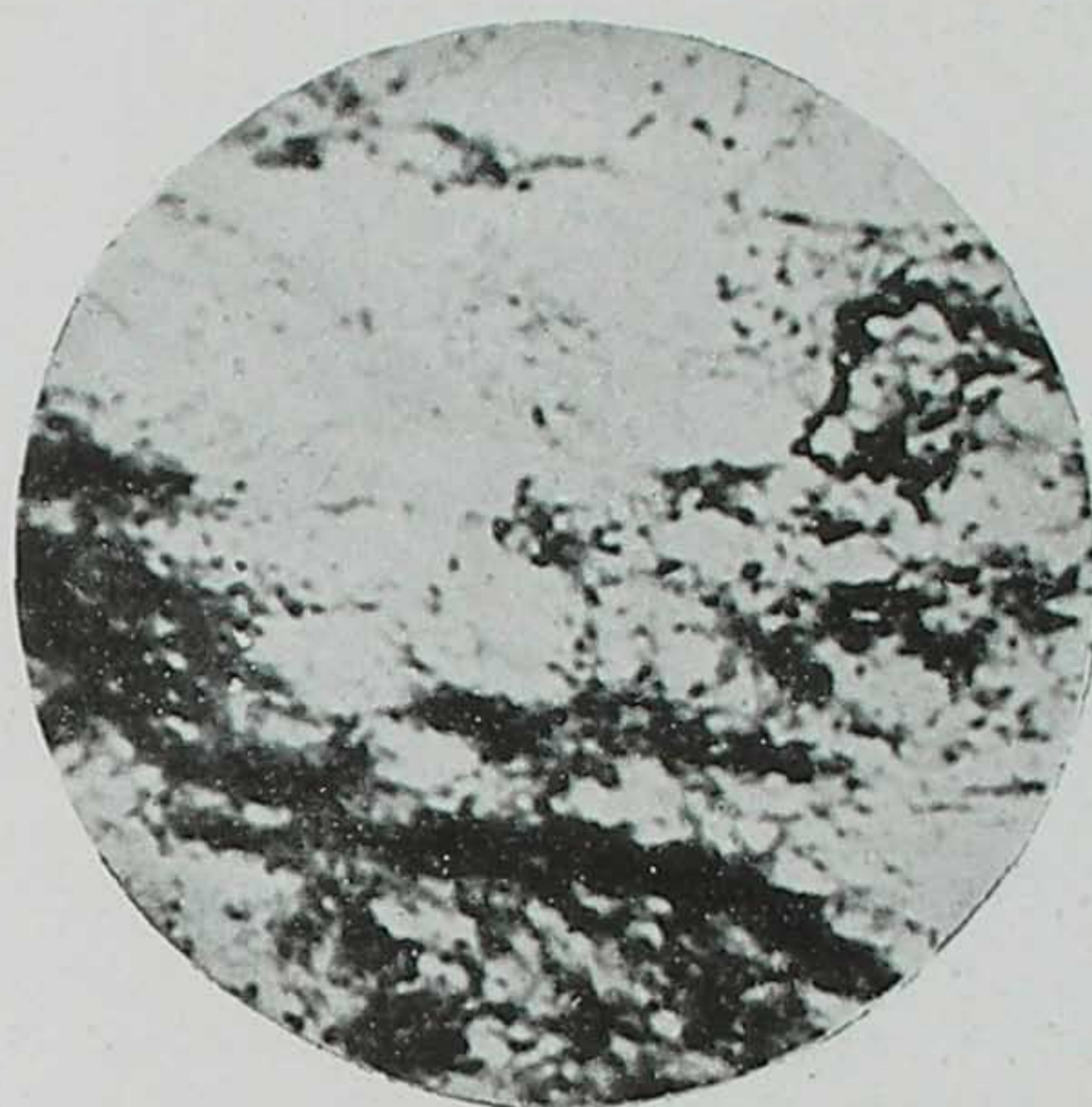


Fig. 10

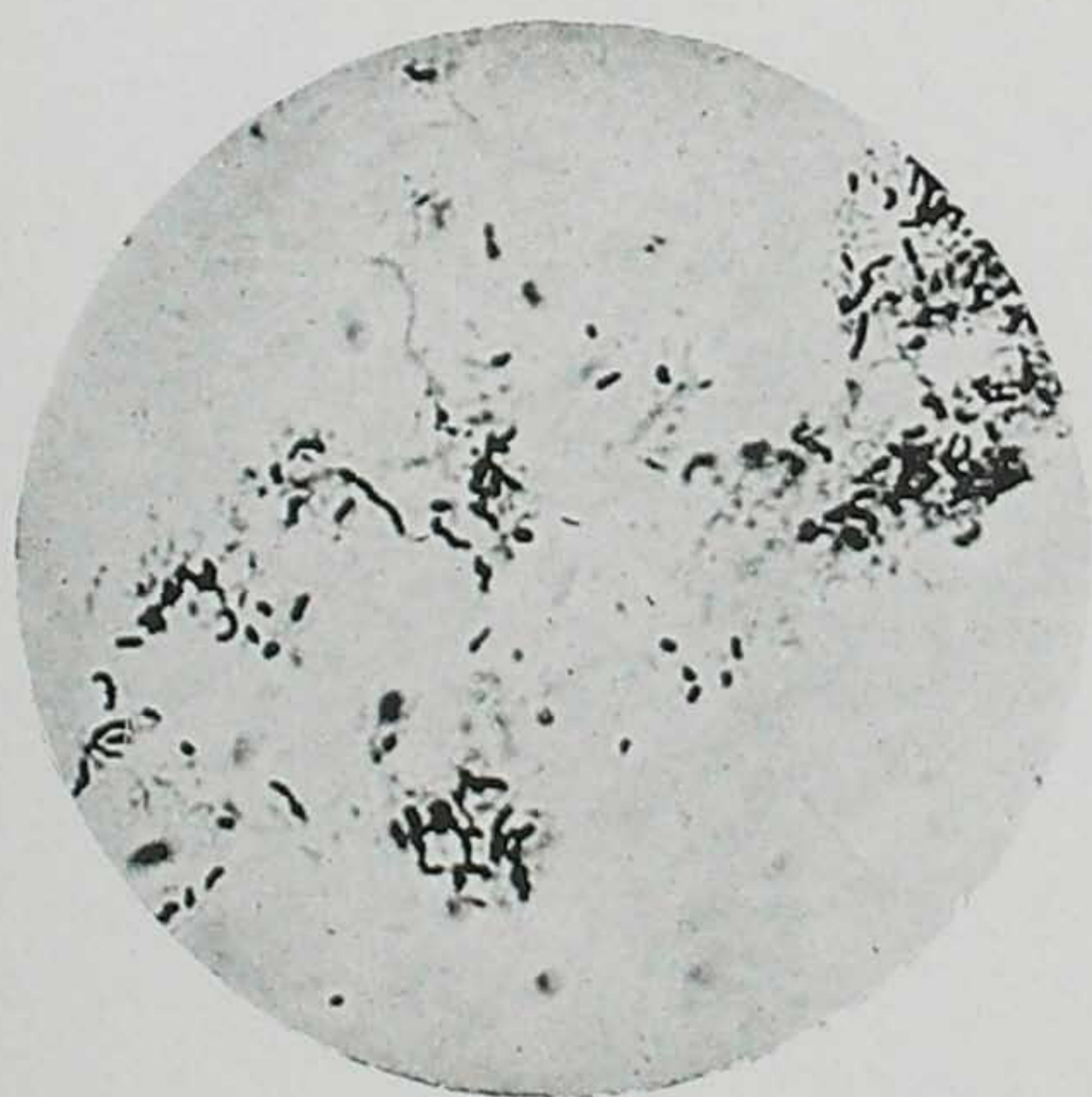


Fig. 11



Fig. 12

Fig. 9. Esporos do *A. lepromatis* de cultura de 17 dias em agar glicerinado. Fig. 10 Cultura em agar manteiga de 22 dias (2a geração): mycelios em degeneração. Figs. 11 e 12: esfregaços da mesma cultura em agar manteiga mostrando filamentos e bacillos acido-alcool-resistentes.

Fig. 9. Spores of *A. lepromatis* of a 17 days culture in glycerine agar. Fig. 10. Culture in agar butter with 22 days, (2nd geration): mycelia in degeneration. Figs. 11 and 12: scrapings of the same culture in agar bntter showing filaments and acid-alcohol-fast bacilli.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA EM CÔRES 43

Fig. 1. *Actinomyces lepromatis*—Cultura de 5 dias em placa de agar simples. Tamanho natural das colônias.

Fig. 2. Cultura em agar simples de 60 dias. Tamanho natural.

Fig. 3. Cultura em agar glicerinado de 60 dias. Tamanho natural.

Fig. 4. (A) Esfregaço de cultura original em caldo glicerinado, de 23 dias, filamentos e bacilos de HANSEN. (B) Esfregaço de cultura de leproma em agar glicerinado, de 60 dias. (C) A mesma cultura de leproma de 105 dias. Coloração ZIEHL-NEELEN.

Fig. 5. Esfregaço da cultura de *Actinomyces lepromatis* em agar-manteiga, 3a. geração. Mycelios degenerados (A) mostrando os elementos regeneradores; (B) filamentos e bastonetes e (C) formas bacilliformes ácido-alcool-resistentes. Três campos diferentes da mesma lâmina. Coloração-ZIEHL-NEELEN.

EXPLANATION OF THE COLOR PLATE 43

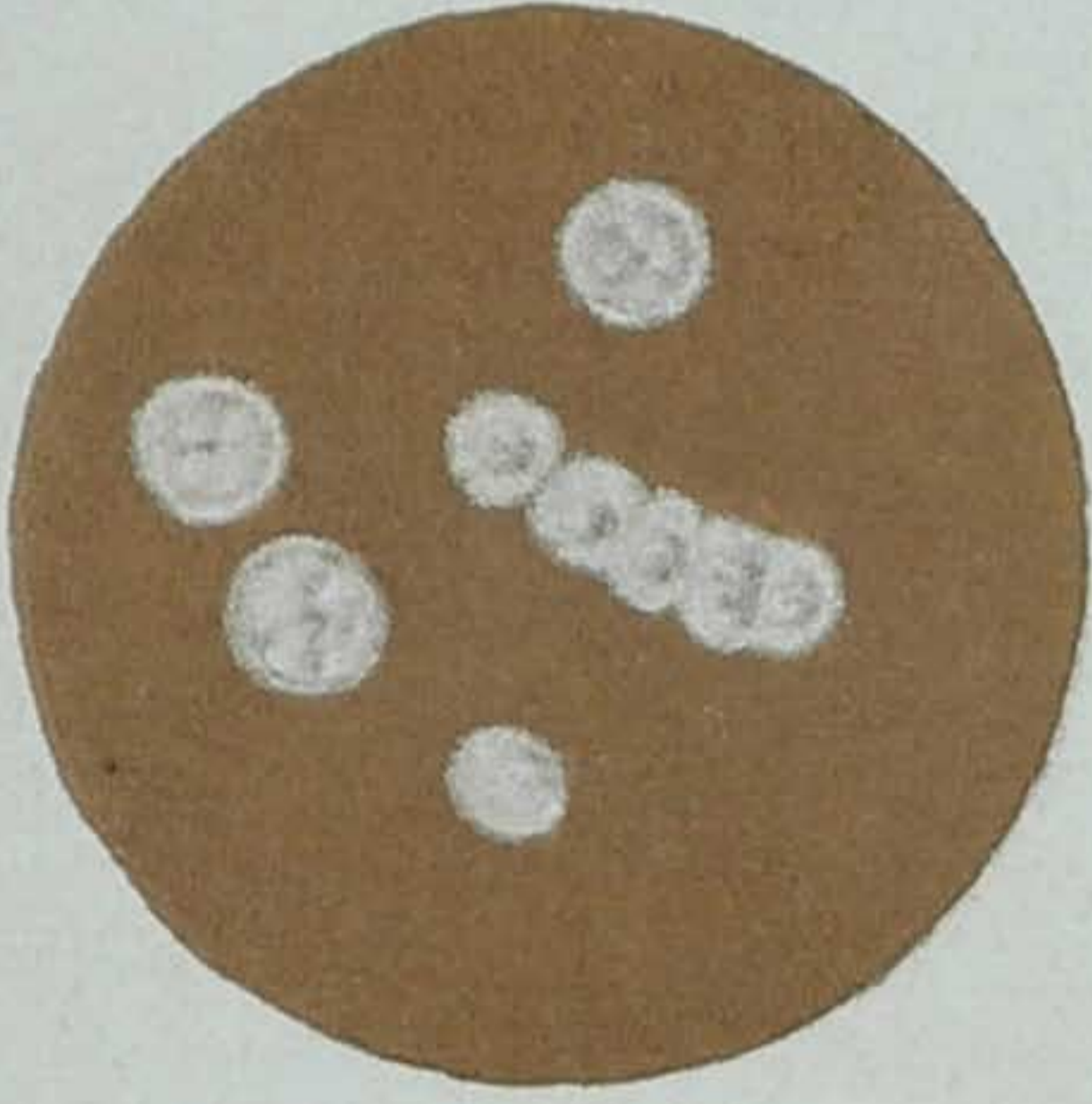
Fig. 1. *Actinomyces lepromatis*—A 5 days' culture in plain agar on Petri dish. Natural size of colonies.

Fig. 2. A 60 days' culture in plain agar. Natural size.

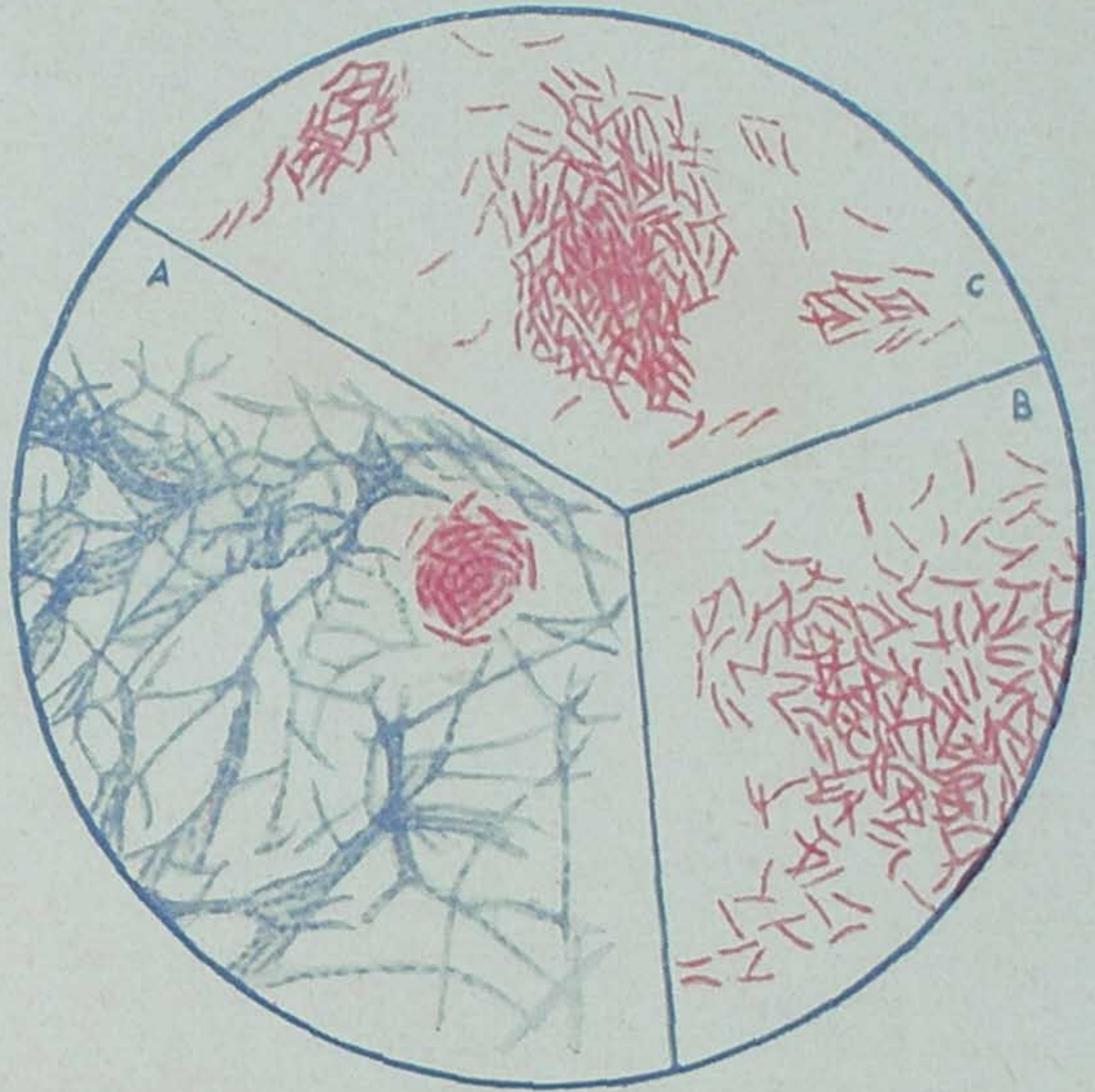
Fig. 3. A 60 days' culture in glycerine agar. Natural size.

Fig. 4. A smear of the original culture in glycerine broth, 23 days old. Filaments and bacilli of HANSEN (A). A smear of a culture of leproma in glycerine agar 60 days' old (B). The same culture of leproma with 105 days (C). Stained by ZIEHL-NEELEN.

Fig. 5. A smear of a culture of *Actinomyces lepromatis* in butter agar, 3rd generation. Degenerated mycelia (A) showing the regenerating elements; (B) filaments and rods and (C) acid-alcohol-fast bacilliform productions. Three different fields of the same platen. Stained by ZIEHL-NEELEN.



1



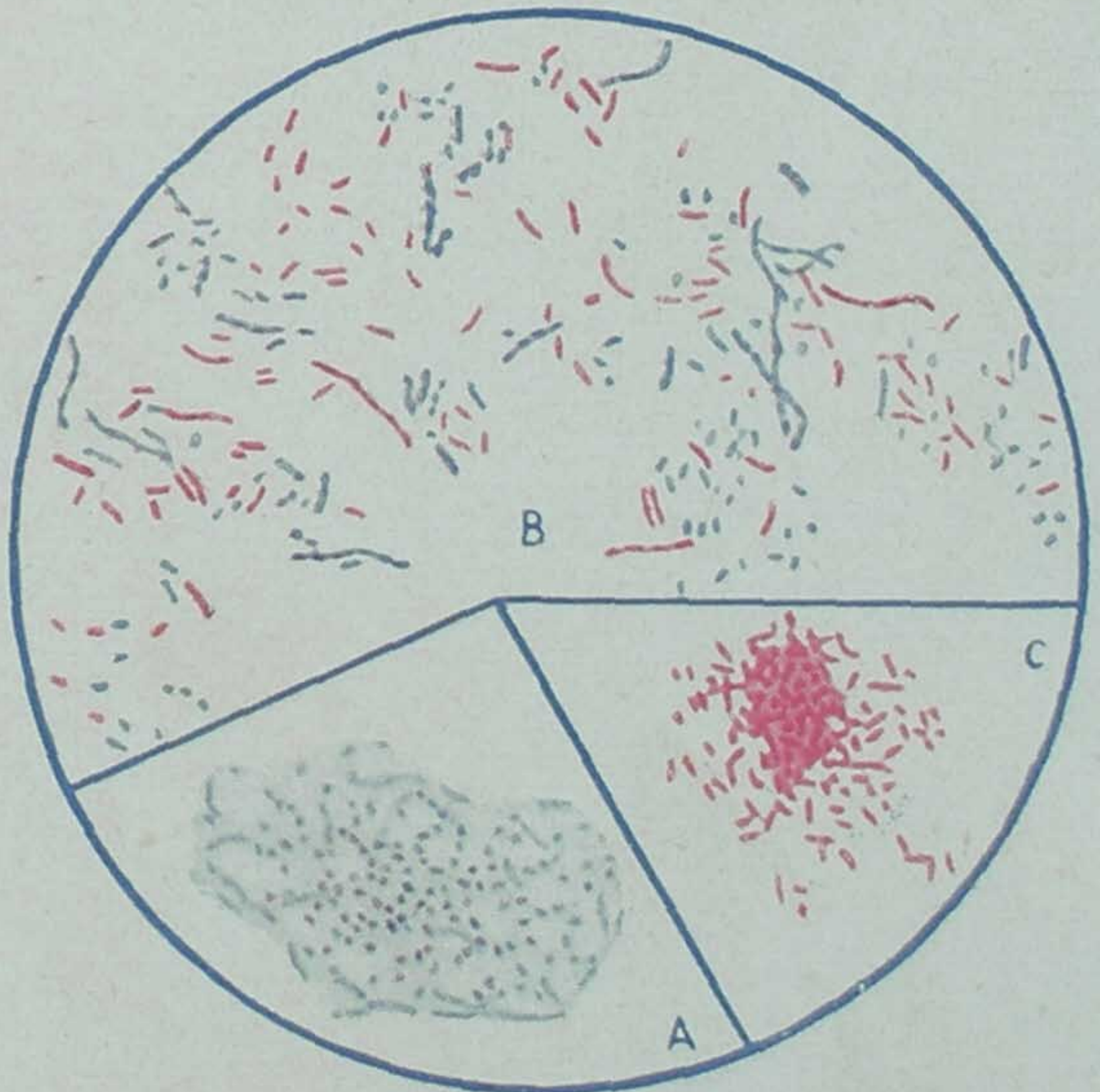
4



2



3



5