

Cultura não-cromogênica de um bacilo ácido-álcool-resistente isolado do muco nasal de uma leprosa. Sua virulência para animais de laboratório *

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

(com 6 ilustrações)

INTRODUÇÃO

Poucas tentativas têm sido feitas para isolar o bacilo de HANSEN do muco nasal de leprosos. Na vasta bibliografia sumariada por WOLBACH e HONEJ (1914) encontram-se apenas referências às culturas de microrganismos ácido-resistentes facultativos, obtidas desse material por CZAPLEWSKI (1898), F. W. TWORT (1910) e E. MARCHOUX (1911), tôdas de duração efêmera.

Dentre as tentativas mais recentes merece especial menção a de ERNEST LINDWOOD WALKER (Jour. Prev. Med., 1929: V. 3, 167-195), que semeou em 2.363 tubos de vários meios de cultura 607 amostras de material colhido em 194 leprosos da "U.S. Leprosy Investigation Station" de Honolulu. Com material de raspagens das narinas de 163 desses leprosos fêz êle 165 semeaduras, obtendo apenas 4 culturas de bacilos difteróides não ácido-resistentes, e de 1 actinomicóide ácido-resistente facultativo.

De 1928 a 1950, trabalhando no Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz, semeei o muco nasal duma vintena de leprosos em vários meios de cultura, sempre com resultado negativo. Neste ano de 1951 tive, porém, a sorte de obter uma cultura não cromogênica de um bacilo ácido-álcool resistente do muco nasal de uma leprosa lepromatosa, virgem de qualquer tratamento antileprótico, que passo a descrever.

OBSERVAÇÃO CLÍNICA

No dia 13 de dezembro de 1950 procurou-me no Instituto Oswaldo Cruz, para exame dermatológico, uma moça branca, de estatura e ro-

* Trabalho apresentado à III Conferência Pan-Americana de Leprologia. Buenos Aires, 9 a 15-XII-1951. Lido a 14-12-51.

bustez medianas, de 20 anos de idade (DALVA R.), nascida em Bonsucesso (D.F.), a 2 km do nosso Instituto, filha de pai português e mãe brasileira. Ela vive na casa onde nasceu, em companhia dos pais, de um irmão de 21 anos, solteiro, e de três irmãs de 11, 13 e 15 anos, com as quais dorme no mesmo quarto. D., que apresentava notável palidez facial, declarou-me estar doente há mais de 3 anos, sofrendo do fígado e dos intestinos, em tratamento com vários médicos, sem resultado, e que indo casar-se a 30 do corrente mês, desejava submeter-se a um exame de laboratório. Ela veio à consulta em companhia de uma tia e do seu noivo (DELFINO DE S., português de 21 anos), que também reside em Bonsucesso desde que chegou de Portugal, há 16 anos. A paciente apresentava infiltração lepromatosa generalizada na face; nariz inchado e luzidío com ulceração do septo (sangrando fàcilmente no lado esquerdo); orelhas eritematosas e luzidias, com moderada infiltração dos lóbulos auriculares; a pele do tronco limpa; edema e cianose das mãos; dedos afilados (terá ela ancestral leproso?); multiplas manchas roseoliformes nas coxas; placas infiltradas e eritematosas nos joelhos, que a paciente atribui ao traumatismo por trabalhar ajoelhada para encerrar o soalho de sua casa; nódulos intradérmicos nas pernas; pés com edema crônico e cianose intensa. Classifiquei-a como lepromatosa L3. Os médicos que a examinaram antes de mim ignoram "lepra" ou esconderam tal diagnóstico à paciente, por motivo social, o que é um grave êrro.

BACILOSCOPIA

Os esfregaços que fiz do muco nasal, do sangue dos lóbulos auriculares e da pele do joelho esquerdo da paciente, corados pelo método de ZIEHL-NEELSEN, deram os seguintes resultados:

Muco nasal: lado direito ++⊕⊕; lado esquerdo ++⊕⊕. *Lóbulos*: ++. *Placa lepromatosa do joelho* ++⊕⊕.

À vista dessa abundante eliminação de bacilos, em massas e globias, pelo muco nasal — lâmina que mostrei à paciente, sua tia e seu noivo —, desaconselhei-a de casar-se antes de se submeter a um rigoroso tratamento sulfônico, receitando-lhe Diasone Abbott, etc. Nos *frottis* do muco predominam os bacilos finos, como o de STEFANSKY, em feixes, massas e grandes globias. No esfregaço da pele predominam os bacilos curtos, alguns granulados, massas e globias de cócobaçilos. Reexaminados 11 meses depois de corados, êsses organismos ainda se apresentam intensamente corados, e dentre os elementos isolados há bacilos medianos com grânulos de diâmetro pouco maior que o do citoplasma, centrais ou excêntricos, uni — ou bipolares (haltères) e também alguns bacilos mais longos, com vários grânulos formando cocótricas, às vêzes dando a impressão de cissiparidade longitudinal tanto dos grânulos como do citoplasma. Há também elementos com um ramo lateral partindo do nódulo central ou polar, dando o aspecto de forquilha. Dêstes elementos ramificados alguns são, evidentemente, resultados de divisão, e outros da distensão do material. O esfregaço

de pele, recorado pelo método de FONTES 11 meses após ter sido corado pelo ZIEHL, é o que apresenta maior pleomorfismo bacilar.

BACTERIOLOGIA

Tratando-se de um caso L3, virgem de tratamento antileprótico e fortemente positivo à baciloscopia, resolvi aproveitá-lo para bacteriologia. De cada lado do septo nasal colhi, com curêta, bastante muco, diluindo-o em sôro fisiológico (1 cc.), separadamente, em tubos de hemólise, e fiz uma biopsia na placa do joelho esquerdo, cujo fragmento de pele foi triturado e emulsionado num c.c. do mesmo líquido acima. Essas três amostras de material foram deixadas na geladeira até o dia seguinte. 14-12-1950: A cada emulsão foi adicionado soluto de hidróxido de sódio a 10% (2 a 3 vezes o seu volume). Depois de bem agitados, os três tubos foram deixados na estufa a 37°C durante 30 minutos e depois centrifugados três vezes com água destilada esterilizada para lavagem dos sedimentos, que semeei em 21 tubos de meio de LOEWENSTEIN.

20-1-1951: Após 37 dias de incubação a 37°C, um dos 14 tubos semeados com muco nasal apresentava 5 pequeninas colônias esbranquiçadas, do tamanho da cabeça de um pequeno alfinete. Os demais tubos (20 ao todo) estavam estéreis e continuaram assim por mais 30 dias, quando foram desprezados.

30-1-1951: Com o banho diário da cultura com a água de condensação do próprio meio, apresenta-se hoje sob a forma duma camada delgada, creme, com 3 colônias redondas, do tamanho duma lentilha, no centro do meio. Com uma dessas colônias fiz dois esfregaços, um corei pelo ZIEHL e o outro pelo GRAM, verificando tratar-se de uma cultura pura de germes ácido-álcool-resistentes e GRAM positivos, apresentando-se sob a forma de cocobacilos, às vezes em massas simulando globias. Mostrada a cultura aos Drs. LAERTE DE ANDRADE e CANDIDO SILVA, repiquei-a em 4 tubos de LOEWENSTEIN e 1 de ágar glicerinado.

15-2-1951: A cultura em ágar glicerinado (2.^a geração) entreguei ao Dr. LAERTE DE ANDRADE para incluir na Coleção de Micobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, sob a sua guarda, com a designação de amostra "DALVA" (SOUZA-ARAÚJO, 1951), e para verificar a sua fluorescência e o seu comportamento à reação citoquímica de DUBOS para virulência. Ambas estas provas resultaram fortemente positivas (++,+), tanto quanto uma cultura virulenta do *Mycobacterium tuberculosis* (Amostra VALLÉE), usada como testemunha. Aos 17 de fevereiro fiz novas repicagens, em vários meios, da cultura original, para fornecer às coleções internacionais de culturas tipos e para inoculação em animais.

DESCRIÇÃO DA CULTURA "DALVA"

Macroscópica: Reexame em 20 de novembro de 1951. A cultura original de LOEWENSTEIN, com 10 meses de idade, dos quais 8 em temperatura ambiente, apesar de várias vezes ter sido raspada para semea-

duras, apresenta germinação branco-pardacenta, de aspecto pulverulento, sêco e muito aderente ao meio, cobrindo tôda a sua superfície, espraiando-se pela parede do tubo como véu aderente, de 1 a 2 mm em tôda a periferia do meio. Os tubos de LOEWENSTEIN com sementeiras de 17 de fevereiro (2.^a geração), apresentam o mesmo aspecto da cultura original, com mais abundante germinação no fundo do tubo, penetrando no meio. No agar glicerinado a 5% germinaram lentamente, sob a forma eugônica, colônias verrucosas e sêcas, fàcilmente destacáveis com a alça de platina. Ainda da 2.^a geração temos 2 tubos de LOEWENSTEIN sementeiras a 6-9 (da original) que apresentam uma camada delgada, granulosa como areia espalhada sôbre uma superfície de goma arábica, tendo sobrepostas algumas colônias verrucosas, eugônicas, de côr róseo-pálida (mutação?). Da 3.^a geração temos: em LOEWENSTEIN de 10-4, germinação numa camada delgada esbranquiçada, cobrindo 1/2 da superfície do meio, sempre com aspecto arenoso, também sobreposta de algumas colônias verrucosas, tipo eugônico; de 13-8, aspecto idêntico ao acima descrito, tendo no fundo do tubo algumas colônias granulosas, dum lado dêste penetrando profundamente no meio; outro tubo de 10-10 apresenta germinação normal em 40 dias: sôbre delgada camada esbranquiçada, do mesmo aspecto arenoso já referido, com várias colônias verrucosas, grandes e sêcas, semelhantes às de certas culturas eugônicas (R) do bacilo de KOCH.

Em meio de DORSET sem glicerina, considerado ótimo para a cultura do bacilo da tuberculose do rato selvagem da Inglaterra (VOLE: *Microtus agrestis*), sementeira em 7-8 germinou parcamente sob a forma de montículos esbranquiçados, que tanto podem ser novas colônias como material da sementeira. Não houve alteração do meio. Na batata glicerinada a germinação, se houve, é ainda mais pobre do que no DORSET.

No agar glicerinado a 5%, culturas de 7 e 1/2 meses (sementeira de 10-4) há exuberante germinação em camada finamente granulosa, sobreposta de muitas colônias verrucosas. Sementeira de 10-10 (40 dias) apresenta idêntico aspecto: cultura eugônica semelhante à do bacilo de KOCH. Neste meio a cultura é inodor, sêca, fàcilmente destacável, o que não acontece quando sementeira em LOEWENSTEIN. Na gelatina o meio não é liquefeito e se forma no seu centro um floco semelhante a algodão.

No caldo glicerinado a 5%, sementeiras de 7-8 (3 e 1/2 meses) apresentam denso depósito granuloso. O meio se mantém límpido e não há formação de véu, o que pôde correr por conta do defeito do meio. As repicagens dêsse depósito, de 2 semanas, em vários meios, ainda não germinaram.

Microscópica: Esfregaço da cultura original, em LOEWENSTEIN, com 70 dias de idade, corado pelo Z-N, mostra exclusivamente elementos ácido-álcool-resistentes, pleomórficos: cocobacilos; raros bacilos homogêneos, de citoplasma denso, de tamanho médio; cocos ou diplococos encapsulados (cápsula que corresponde à gléa ou halo verificado pela electromicrografia no bacilo de HANSEN por MARIO G. Malfatti); muitos bacilos médios com um nódulo no centro (nódulo que Malfatti cha-

ma de condensação do citoplasma) ou com dois nódulos nas extremidades formando haltères (raros); poucos bacilos com um só nódulo numa extremidade (clava), com diâmetro igual ou maior que o do bacilo; elementos estreptocócoides; elementos ventrudos com um a três nódulos; massas ou colônias compactas de cocobacilos; alguns cocótricas com 5 nódulos separados por espaços claros (vacúolos) como são vistos em material de lesão experimental no homem e no macaco *rhesus* produzidas pela cultura "Chaves I ou II". Os exames das 2.^a e 3.^a gerações (17-2, 7 e 13-8-51) da cultura em LOEWENSTEIN confirmaram a morfologia acima descrita. Foram vistos ainda grânulos livres isolados ou em massas fracamente a.a.r. simulando lise do citoplasma, dando destaque aos grânulos metacromáticos, e grânulos livres de duplo diâmetro do bacilo, intensamente corados e às vezes com um vacúolo no centro.

Esfregaço do depósito da cultura em caldo glicerinado a 5% (3.^a geração de 7-8-51) corado pelo Z-N mostra massas enormes de cocobacilos; poucos bacilos homogêneos de citoplasma denso, pois às vezes tais elementos deixam ver condensações dentro do próprio citoplasma (provavelmente grânulos em formação); alguns bacilos escuros (violeta-azulados) sobre uma nuvem de simplasma rosado; mechas de bacilos a.a.r. (como se vê em cultura virulenta de bacilo da tuberculose) de tamanho médio ou maiores que o normal, granulados, alguns vacuolados com um nódulo em cada extremidade; alguns grânulos maiores, esparsos, com uma cauda de protoplasma rosado ou rubro (segundo a sua idade?), dando o aspecto de cometa.

Nos esfregaços da cultura corados pelo método de GRAM são vistos todos os elementos acima descritos, fortemente corados (Gram-positivos), com maior destaque os grânulos intrabacilares e se mostram superabundantes os grânulos livres disseminados por todos os campos, dando, às vezes a falsa impressão de cocos Gram-positivos de contaminação.

Os esfregaços corados pelo método de FONTES são os mais bonitos. Este método de coloração é o melhor para o estudo morfológico das micobactérias. Os esfregaços do depósito do caldo glicerinado (de 3 meses e 7 dias de idade) corados pelo FONTES mostram bacilos róseos-pálido na maioria de tamanho médio, todos granulados, com um grânulo protuberante no centro ou 2 ou mais de vários tamanhos, dispostos em rosário, roxo-azulados, irregulares; grânulos livres; bacilo com grânulo excêntrico, central, uni ou bipolar; cocótricas; algumas bolas de cor azul-escuro, simulando globias de grânulos irregularmente agrupados. Vamos fazer a electromicrografia desses elementos. Esfregaços da cultura eugônica em ágar glicerinado, corados pelo FONTES (cultura de 7 meses), dão preparações de grande beleza, somente sobrepujada por esfregaços de leproma flórido corados pelo mesmo método. Salientam-se as formas bacilares rosadas com nódulos centrais ou polares violeta-azulados, os bacilos em haltères e as massas de cocóides.

EXPERIMENTAÇÃO

1) *Camundongos pretos*: No dia 13 de agosto inoculei 5 camundongos pretos americanos (*Mus musculus*, black race C-57, Rockland Farms, U.S.A.) com emulsão fresca da cultura "DALVA" em LOEWENSTEIN (2.^a geração, 17-2-51) por via subcutânea, na virilha direita, na dose de 0,5 cc. em cada. 48 horas após, 2 deles apresentavam empastamento na região da inoculação e no 8.^o dia (21-8) três dos 5 apresentavam nódulos ingüinais, do tamanho de um grão de milho, sob placa de alopecia. A 30-8 (3 semanas de incubação) esses 3 camundongos foram sacrificados a gás. À necropsia verifiquei que os pequenos nódulos de 2 deles interessavam à pele da virilha e do 3.^o interessava à pele e à musculatura da coxa. Todos os nódulos supuravam ao destacar a pele e o pus foi colhido para bacteriologia. De 2 dos 3 animais mandei fragmentos de pele com tumor à Divisão de Patologia. Os esfregaços do pus e dos tumores corados pelo Z-N revelaram exclusivamente elementos a.a.r. intra e extracelulares, em grande abundância, predominando os bacilos fagocitados. Os piócitos estão peçados de bacilos. Em vários campos há massas de germes simulando globias. Há também bacilos g.g.v. (gigantes, granulosos e vaculados) como existem em material experimental da cultura "Chaves". Muitos cocótricos com 5 e 6 grânulos. Elementos com condensações nos pólos e estreitamente central indicando divisão por cissiparidade. O pus foi tratado pela soda e semeado em LOEWENSTEIN, não tendo germinado. Esfregaços dos gânglios desses 3 animais revelaram alguns bacilos a.a.r., assim como o baço. Curioso é que esses murídeos não foram muito afetados na sua saúde geral: estavam lépidos e com o pêlo lúcido.

Histopatologia — P.C.17.360 da Seção de Anatomia Patológica: 12-9-1951: "Fragmentos de pele de camundongos pretos. Inoc. 13-8-51 c/cultura "Dalva" e sacrificados a 30-8. Fragmento I; No hipoderma vê-se abcesso em cujo centro existe, misturado a material acidófilo, necrosado, rico em bacilos ácido-álcool-resistentes, um outro material fortemente basófilo. Os leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, que se encontram na zona mais externa do abcesso, encerram grande número de pequenos bacilos ácido-álcool-resistentes. Em torno desse abcesso, percebe-se proliferação de fibrócitos, havendo início da formação de cápsula. Em zonas próximas, no derma, nota-se infiltração por células mononucleares. Em região circunscrita, o abcesso referido acima compromete o derma e comprime a epiderme, a qual se mostra atrofiada. Nas demais porções, a epiderme tem aspecto normal.

Fragmento II: Aspecto semelhante ao verificado no fragmento I, notando-se, apenas, a presença de bacilos ácido-álcool-resistentes no citoplasma de células mononucleares, vacuoladas, presentes no derma.

I.O.C., 12-9-1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO."

A 4-9 os 2 camundongos restantes apresentavam pequeninos nódulos nas virilhas, lado direito em ambos, os quais uma semana depois

tinham o tamanho dum grão de arroz e na 3.^a semana (26-9) começaram a regredir, deixando no ponto da inoculação cicatriz circundada por pequena placa de alopecia.

Aos 20-11-51, 3 meses e 1 semana após a inoculação, foram sacrificados êsses dois murídeos, que apresentavam estado hígido, pois tinham o pêlo negro e lúcido e estavam bastante lépidos. Nos esfregaços de gânglios linfáticos e do baço de ambos encontramos alguns bacilos de tamanho médio (não cocobacilos) e num dos gânglios duas globias bacilares. Esfregaços da pele da virilha, raspada internamente, revelaram raros bacilos a.a.r.

Os demais órgãos estavam negativos.

2) *Cobaias*: No dia 17 de agosto inoculei 1 cc. de emulsão fraca da mesma cultura de 2.^a geração, por via subcutânea, como de costume nestas experiências, na virilha direita de duas cobaias grandes e sadias. Uma semana depois (24-8) uma delas apresentava, no local da inoculação, um nódulo duro, do tamanho duma avelã. Na 2.^a semana ambas apresentavam nódulos, dos quais um começou a regredir na 3.^a semana (4-9). A 6-9 foi sacrificada a cobaia com nódulo maior (3 semanas de incubação). À autópsia se verificou ser êsse nódulo do tamanho de uma grande azeitona, com abcesso central, cujo pus revelou abundantes bacilos a.a.r. e massas globóides intra e extracelulares. Esfregaço dum gânglio linfático axilar também revelou abundantes bacilos. Com êsse pus semeei, *in natura*, dois tubos de LOEWENSTEIN e outros seis com triturado do tumor tratado pela soda, com resultado negativo.

Parte do tumor e os órgãos da cobaia foram enviados à Divisão de Patologia para exame, cuja relatório damos abaixo.

Histopatologia: "Secção de Anatomia Patológica. P.C. n. 17.383, de 10-9-51. Vários órgãos de cobaia inoculada em 17-8 com emulsão da cultura "Dalva" e sacrificada a 6-9-51. Resultado do exame anátomo-patológico:

Fragmento de tumor: Os cortes mostram abcesso, com abundantes bacilos ácido-álcool-resistentes no citoplasma de leucócitos polimorfonucleares. Na cápsula dêsse abcesso vêem-se células mononucleares encerrando os referidos bacilos e, além disso, infiltração descontínua do tecido conjuntivo da vizinhança por células mononucleares.

Gânglio linfático: Nota-se dilatação dos seios linfáticos, nos quais se encontram células vacuoladas, encerrando bacilos ácido-álcool-resistentes. *Pulmão*: verifica-se atelectasia, focos de hemorragia e, na proximidade dêstes, presença, no interior dos alvéolos, de grandes células mononucleares, de citoplasma vacuolado, encerrando numerosos bacilos ácido-álcool-resistentes. *Rim*: na submucosa do bacinete vêem-se focos de infiltração por grandes células mononucleares, contendo bacilos ácido-álcool-resistentes, e por linfócitos. Em alguns glomérulos, encontram-se células mononucleares encerrando bacilos ácido-álcool-resistentes. *Fígado*: presença de raras células contendo bacilos ácido-álcool-resistentes, nos sinusóides. Não há lesões apreciáveis no parên-

quima hepático. *Baço*: presença de células contendo bacilos ácido-álcool-resistentes, nos vasos sanguíneos e nos seios linfáticos.

I.O.C., Rio, 19 de setembro de 1951.

a) Dra. RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO."

Não há aqui neste relatório nada que se assemelhe à tuberculose experimental. 82 dias após a inoculação (8-11-51) sacrifiquei a 2.^a cobaia, cujo nódulo regredira a partir da 3.^a semana. À autópsia verifiquei estar o animal excessivamente gordo. Rigoroso exame microscópico das vísceras desta cobaia revelaram apenas raros bacilos a.a.r. em *frottis* do rim.

3) *Cebus fatuellus*: No dia 17 de agosto inoculei o *Cebus* n.º 29.960, gentilmente cedido pelo Dr. HENRIQUE PENNA, na fronte e regiões malares com 1.5 cc. de emulsão da mesma cultura "Dalva" de 2.^a geração. O animal é preto e muito peludo. No dia seguinte apresentava-se em estado normal: nenhuma reação local visível. No fim duma semana havia um pequeno nódulo achatado em cada ponto de inoculação, os quais se mantiveram do tamanho dum grão de feijão até a 2.^a semana, quando começaram a regredir. No dia 6-9 re-inoculei-o na região temporal esquerda com 1/2 cc. da mesma emulsão acima. Dentro duma semana se formou nesse ponto nódulo idêntico aos demais. No fim da 3.^a semana da 1.^a inoculação começaram a cair os pelos da cara do animal, chegando a apresentar alopecia total em meados de outubro, em círculo abrangendo desde o mento até à região frontal. O nódulo da face direita apresentava a 15-10 o aspecto duma úlcera leishmaniótica. O exame microscópico das fezes foi negativo para germes a.a.r. em 19-9 e 5-10.

No dia 15-10, ao apanhar-se o animal para exame, rompeu-se, na porta da gaiola, o nódulo da região malar direita, que tinha o tamanho dum grão de milho. A baciloscopia do sangue purulento que escorreu da ferida foi +⊕. Alguns bacilos isolados e uma globia bacilar íntegra. Nada de cocóides!

A partir da 8.^a semana (20-10-51) os nódulos tornaram-se pouco visíveis e começaram a nascer pelos, em abundância. Na 10.^a semana (5-11) re-inoculei-o nas regiões malares e virilha esquerda com igual dose de emulsão (0.5 cc. em cada ponto) da cultura "Dalva" de 3.^a geração (6-9-51). 10 dias depois (15-11) biopsei o nódulo resultante da re-inoculação na face direita, que deu abundante pus, cujo exame microscópico foi ++: somente bacilos a.a.r. medianos. A pele e o pus foram tratados pela soda e semeados.

Nesta data (20-11), o animal apresenta a cara peluda como antes, com nítidos nódulos residuais, e continua em observação, devendo ser re-inoculado.

CONCLUSÕES

1 — O A. descreve o isolamento e cultura artificial de um bacilo a.a.r. de muco nasal de leproso, virulenta para animais de laboratório.

2 — A cultura, não-cromogênica, de aspecto eugônico em meios especiais e fortemente positiva à reação de DUBOS, semelhante à do bacilo de KOCH, não produziu lesões tuberculosas em cobaias.

3 — Tanto na cobaia como em camondongo preto produziu infecção geral e lesões importantes que foram estudadas histopatologicamente.

4 — O germe que nas culturas em meio de LOEWENSTEIN se apresentava, predominantemente como cocobacilo, nas lesões experimentais em três raças diferentes de animais de laboratório (cobaia, camondongo e símio) adquiriu a forma bacilar. Ainda não foram obtidas retroculturas de material experimental.

5 — O bacilo da amostra "DALVA" é ácido-álcool-acetona-resistente; GRAM positivo e revelou intensa fluorescência. Corado pelo método de FONTES apresenta aspecto e morfologia semelhantes ao bacilo de HANSEN de leproma.

6 — Nos grandes leprocômios seria de alta conveniência fazer-se um estudo bacteriológico sistemático do muco nasal dos casos lepromatosos.

I.O.C., Manguinhos, 20 de novembro de 1951.

Nota: À doutora RITA ALVES DE ALMEIDA CARDOSO, Assistente da Divisão de Patologia do I.O.C., apresento os meus agradecimentos pela sua valiosa colaboração histopatológica.

SOUZA-ARAUJO

ADITAMENTO

Após um repouso de 70 dias e quando o *Cebus* apresentava as lesões das inoculações e biópsias anteriores completamente cicatrizadas, foi re-inoculado a 15 de Janeiro de 1952, com 2 cc. de emulsão duma cultura "Dalva" de 63 dias em agar glicerinado a 5% (de 12-11-51), por via subcutânea na fronte, regiões malares, peito e virilha esquerda. Aos 19 de Janeiro (4.º dia da reinoculação), apresentava um grande nódulo agudo (avermelhado), na região malar esquerda, onde foi inoculado com maior dose do germe.

Aos 29 de Janeiro apresentava 3 nódulos exuberantes, na fronte e regiões malares. No dia 5 de Fevereiro, depois de fotografado o animal, biopsei o nódulo da sua face esquerda, cujo esfregaço corado pelos métodos de Ziehl-Neelsen revelou abundantes bacilos a.a.r. com a morfologia dos do *inoculum*. O pus do abcesso revelou massas de cócobacilos simulando globias e enormes células mono e plurinucleares cheias de cócobacilos a.a.r. e em menor número bacilos medianos, homogêneos; grânulos livres e massas de germes extracelulares resultantes, provavel-

mente, da ruptura das células parasitadas. No dia 7 de Fevereiro esse material da biópsia foi triturado, tratado pela soda a 10% (Método de PETROFF) e o sedimento resultante de três centrifugações foi semeado em 6 tubos do meio de LOEWENSTEIN, 5 dos quais, 45 dias após (Março, 22), apresentavam extensa germinação, cobrindo 1/2 ou 2/3 da superfície do meio; de aspecto seco, colônias granuladas, esbranquiçadas, algumas *pink*, semelhantes à cultura original da amostra "Dalva". Os esfregaços das culturas de 2 dos 5 tubos, corados pelo Z-N, revelaram tratar-se do mesmo germe inoculado. Foram repicadas.

No dia 20 de Fevereiro o *Cebus* foi sacrificado para estudo, cujos resultados vão transcritos a seguir:

Secção de Anatomia Patológica. N.º do P. C. 17.708, de 3-3-52. Fragmento de pele da virilha, tumor e gânglio inguinal dum *Cebus fatuellus*, inoculado com a cultura "Dalva" e sacrificado a 20-2-52. Resultado do exame anátomo-patológico:

"Na porção profunda do derma, infiltração celular inflamatória, constituída predominantemente por grandes células epitelioides, algumas vacuoladas, contendo bacilos ácido-álcool resistentes, curtos, não muito numerosos. Além dessas células, encontram-se linfócitos, células plasmáticas e leucócitos polimorfonucleares. Tal processo interessa, também, a hipoderme e invade a camada muscular subjacente. Epiderme sem alterações importantes.

"Nos cortes de gânglio linfático, vê-se infiltração por células semelhantes às assinaladas na lesão cutânea, não tendo sido encontrados, porém, bacilos ácido-álcool resistentes.

(a) Dra. Rita Alves de Almeida Cardoso.

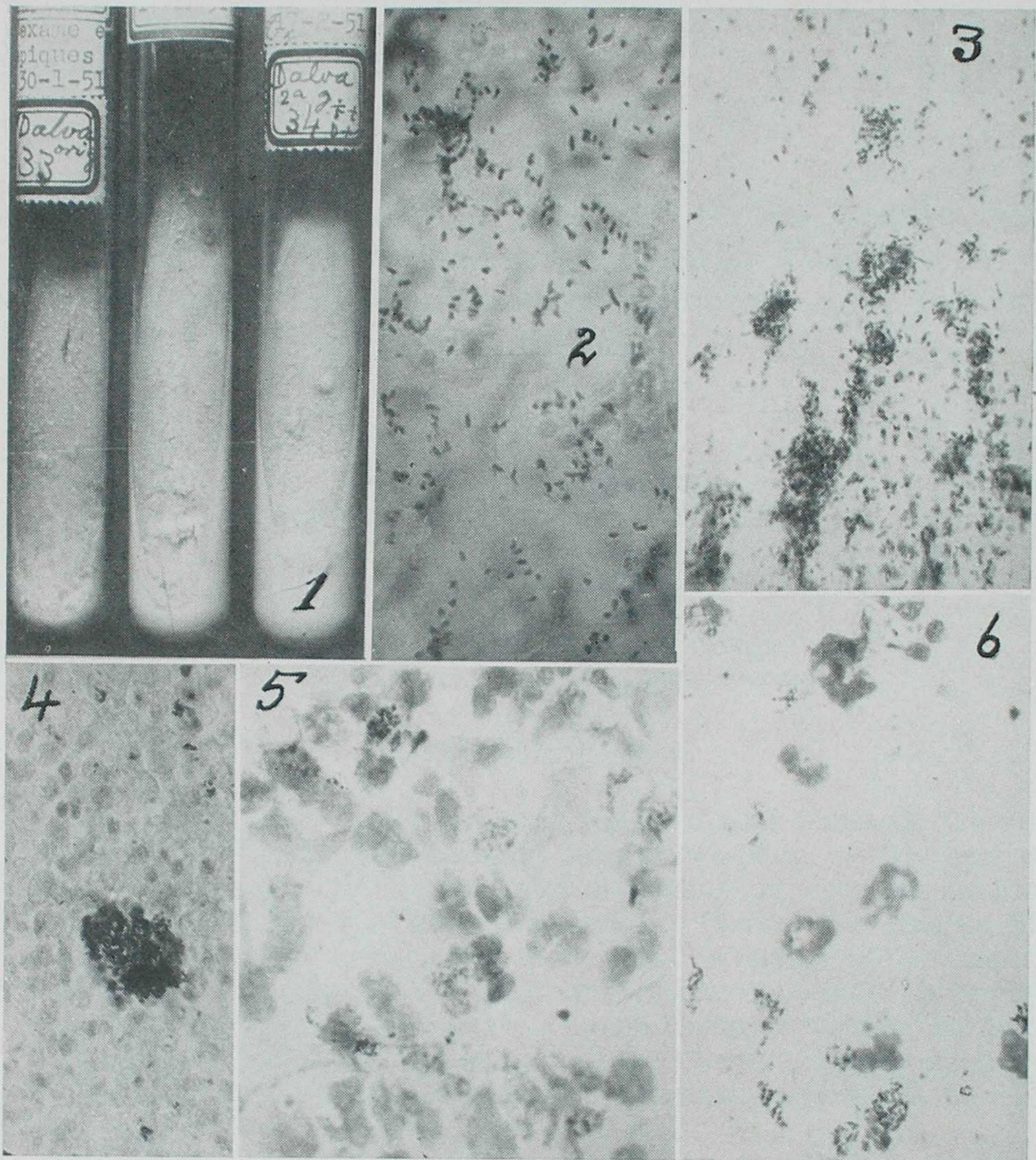
P.C. 17.709, de 3-3-52. Diversos órgãos do mesmo *Cebus* acima: Resultado do exame anátomo-patológico:

"*Rim*: Hiperemia *Pulmão*: Edema. Hiperemia. Atelectasia. *Coração e fígado*: Sem alterações. *Baço*: Na pólpa vermelha, proliferação de células do retículo, formando nódulos e cordões. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes.

(a) Dra. Rita Alves de Almeida Cardoso.

Nos cortes do tumor se vêem pequenos granulomas bem delimitados, e aqui e ali, algumas células vacuoladas peçadas de bacilos a.a.r., simulando células de VIRCHOW com *Globi*.

Os cortes de gânglio linfático e dos órgãos (pulmão, coração, fígado, rim e baço) não revelam lesões importantes nem também bacilos a.a.r., concluindo-se que o bacilo não produziu infecção geral como produz o bacilo de STEFANSKY.



H. C. de Souza-Araujo: Cultura não-cromogênica de um bacilo ácido-álcool resistente isolado do muco nasal de uma leprosa. Sua virulência para animais de laboratório.

- Figs. 1 — Cultura “Dalva” em Loewenstein, tubo original e dois da 2.^a geração.
2 — Esfregaço da cultura original corado pelo Ziehl-Neelsen, x 1.200.
3 — Esfregaço da mesma cultura corado pelo método de Fontes, x 800.
4 — Corte de lesão tumoral de cobaia inoculada com a cultura “Dalva”, corado pelo Ziehl-Neelsen, mostrando uma massa de bacilos a.a.r. x 800.
5 — Esfregaço do tumor da cobaia mostrando bacilos a.a.r. intra e extracelulares, x 800.
6 — Esfregaço do tumor de camundongo preto mostrando inúmeros bacilos a.a.r., x 800.