

Lepra murina

Nova série de pesquisas feitas com o bacilo de Stefansky, amostra do Instituto Pasteur de Paris

Quatro amostras de culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isoladas de ratos brancos e camondongos pretos inoculados com esse material (*)

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com 13 figuras no texto)

INTRODUÇÃO

Publicamos, em 1938, sob o título "A lepra dos ratos"¹ o resultado duma série de pesquisas feitas no Instituto Oswaldo Cruz, de Agosto de 1936 a Janeiro de 1938, com três amostras do bacilo de STEFANSKY, uma trazida de Berlim pelo Prof. FICKER e duas outras remetidas por via aérea, em Agosto de 1936, de Londres e de Paris, respectivamente pelos Professores LAIDLAW e MARCHOUX.

Quanto à patogenia e à patologia da *Lepra murina*, que hoje CHAUSSINAND chama de *Paratuberculose*², confirmámos as conclusões dos trabalhos clássicos, acrescentando-lhes algo de novo, como seja a verificação de notável sensibilidade do camondongo (*Mus musculus*) à infecção, que MARCHOUX e SOREL (1913) consideravam como pouco sensível; da infecção deste animal pela via ocular e transmissão da infecção ao seus filhos por simples convivência, na mesma gaiola, durante dois meses; e a verificação frequente do bacilo de STEFANSKY nas seguintes vísceras dos murídeos, na seguinte ordem decrescente: fígado, baço, rim, pulmão, e também nos testículos e nas fezes, o que veio contrariar a observação feita na California por GEORGE W. MCCOY (1913).

*Trabalho do Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Na comunicação que fizemos, em Março de 1938, ao Congresso Internacional de Leprologia do Cairo³ contestámos a afirmação de MARCHOUX e SOREL (1912), que foi repetida por vários autores e ficou como dogma, de que o bacilo de STEFANSKY não formava globias. Provámos, com desenhos e fotomicrografias de córtex de lepromas de

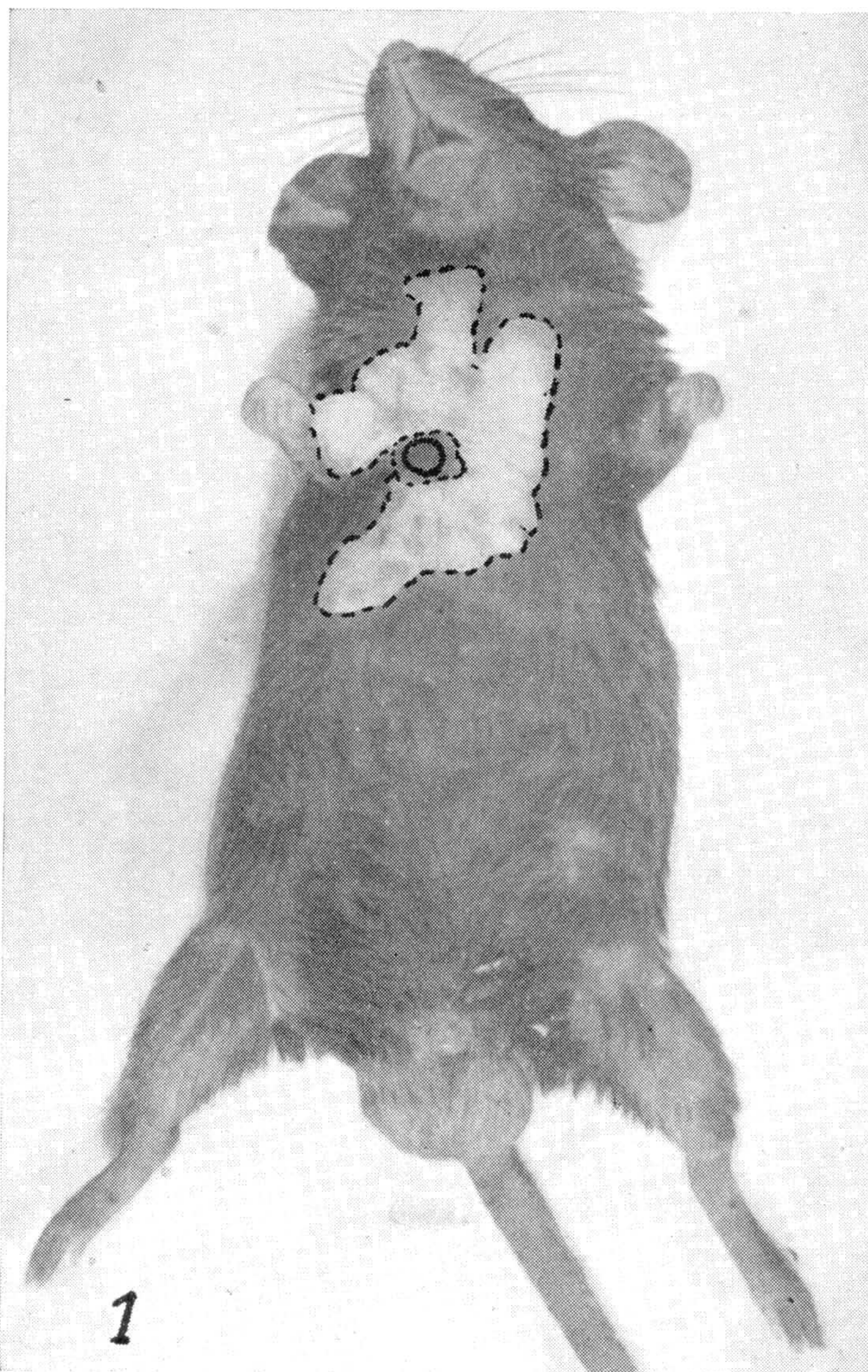


Fig. 1 — Fotografia do 5.º camundongo preto americano, do lote inoculado aos 15 de Março de 1949 com emulsão de leproma Stefansky, amostra de Paris, e sacrificado a 3 de Maio (48.º dia da inoculação), apresentando pequena ulceração na axila direita (ponto de inoculação), cuja serosidade foi positiva (+++) para bacilos a.a.r., circundada por uma placa de alopecia, debaixo da qual foi encontrado um tumor musculo-cutâneo. P.C. 15.758, I.O.C.

rato e esfregaços de órgãos (fígado, baço, rim, pulmão, testículo e de fezes) de murídeos experimentalmente infectados com material das três amostras acima, que o bacilo de STEFANSKY produz as clássicas *globias* descritas por MARCHOUX na lepra humana e os *globi* de NEISSER. Esse trabalho foi lido na presença do pranteado Mestre MARCHOUX, que não o contestou.

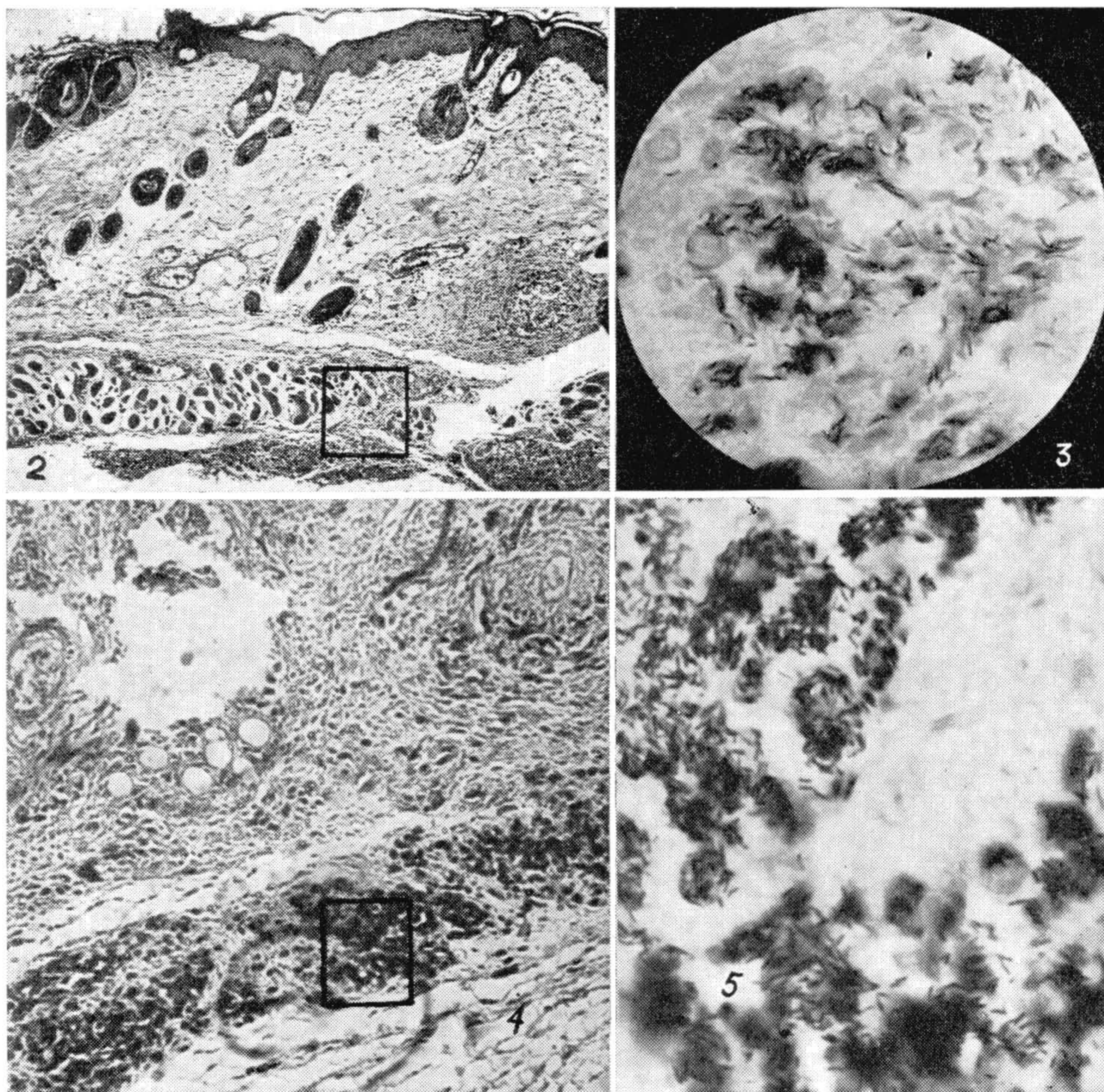


Fig. 2 — Fotomicrografia de corte da pele do centro da alopecia do camundongo acima, mostrando extensas zonas do granuloma. Coloração Hematoxilina-Eosina. x 65.

Fig. 3 — Fotomicrografia de outro corte do mesmo bloco da Fig. 2, zona assinalada por um quadrado, mostrando extraordinária abundância de bacilos no leproma Stefansky. Ziehl-Neelsen. x 1.100.

Fig. 4 — Fotomicrografia de outro corte do mesmo bloco acima, mostrando, em grande aumento, o extenso granuloma, quase todo em negro (massas de bacilos). Ziehl-Neelsen. x 1.100.

Fig. 5 — Fotomicrografia do quadrilátero da fig. 4, mostrando abundantes células de Virchow peçadas de bacilos a.a.r. Ziehl-Neelsen. x 1.100.

Em 1942 publicamos⁴ um estudo comparado da morfologia dos bacilos de HANSEN e de STEFANSKY, com rica documentação gráfica e fotográfica, confirmando o conceito de MARCHOUX de que esses *bacilos são irmãos*. E, finalmente, em 1943 verificamos⁵ ser fácil infectar carrapatos (*Amblyomma cajennense*) em ratos leprosos.

Quanto à bacteriologia fracassamos, como muitos outros pesquisadores, nas nossas tentativas de isolamento e cultura artificial do bacilo de STEFANSKY, sempre tão abundante no material manuseado. Hoje estamos convencido de que esse fracasso foi devido à técnica defeituosa: semeaduras das emulsões frescas dos lepromas, *in natura*, resultando daí uma multiplicação precóce dos germens de associação ou infecção secundária, impedindo a germinação dos bacilos a.a.r., que é sempre tardia (14 a 30 dias). Obtivemos, entretanto, algumas vezes, parca germinação, sob a fôrma de tenuíssimos véus no caldo glicerinado, de bacilos a.a.r., que perdemos nas repicagens, nos deixando, entretanto, vaga esperança de futuro sucesso.

Em 1943 suspendemos tais estudos porque um servente do Biotério Geral do I.O.C. misturára, numa ocasião de fuga dos animais das gaiolas, murideos inoculados com o bacilo de STEFANSKY com outros inoculados com o bacilo de HANSEN, de lesões humanas ou de carrapatos. Para evitar grave causa de êrro, mandámos sacrificar e incinerar todos os animais inoculados. E para garantir a conservação, entre nós, duma amostra virulenta do bacilo de STEFANSKY remetemos fragmentos de lepromas dos ratos ultimamente necropsiados às seguintes instituições: 1 — Instituto de Higiêne da Universidade de São Paulo; 2 — Instituto de Leprologia Conde de Lara do Departamento de Profilaxia da Lepra de S. Paulo; 3 — Instituto Bacteriológico do Departamento Nacional de Higiêne de Buenos Aires; e 4 — Instituto de Leprologia Lleras Acosta, de Bogotá, Colombia.

Tendo sido bem sucedido no isolamento de várias amostras de bacilos a.a.r. de hematófagos infectados em leprosos, e também diretamente de material humano, pelo método de PETROFF, resolvemos retomar as pesquisas sobre a lepra murina com a amostra do bacilo de STEFANSKY do Instituto Pasteur de Paris, que gentilmente nos forneceu o Dr. R. CHAUSSINAND aos 12 de Setembro de 1947, por ocasião da nossa última visita àquele famoso Instituto.

NOVA SÉRIE DE PESQUISAS

Setembro 20, 1947. — Com emulsão dos dois lepromas STEFANSKY que trouxemos de Paris inoculámos um lote de 10 ratos brancos, adultos e sadios, criados no biotério do I.O.C. A dose do *inoculum* foi de 0,5cc. por via subcutânea, na virilha direita, como nos ensinou MARCHOUX em 1936. Conservamos estes animais no biotério anexo ao Laboratório de Leprologia, para constante vigilância. Decorridos 5 meses sem formação de nódulos, escrevemos ao Dr. CHAUSSINAND expressando-lhe a nossa suspeita de que o seu material estivesse avirulento, porém, decorridos 8 meses (Maio de 1948), três dos dez ratos apresentavam tumores de vários tamanhos. Sacrificados esses três ratos, fizemos

emulsões dos lepromas e passagens noutros ratos, e assim sucessivamente, como de costume. Desse modo tivemos, em 1948, lepromas STEFANSKY frescos com os quais fizemos umas dez séries de sementeiras, pelo método de PETROFF, em cerca de 100 tubos de LOEWENSTEIN, obtendo, entre Junho e Julho uma cultura cromogênica (cor de abóbora) de bacilo a.a.r. pura (Strain STEFANSKY I, SOUZA-ARAÚJO) e entre Outubro e Novembro outra amostra, menos cromogênica, amarelo-ouro, brilhante, (Strain STEFANSKY II, SOUZA-ARAÚJO). Com essas duas culturas infectámos ratos e camondongos, produzindo lesões idênticas às obtidas com o material original de Paris, e com várias retroculturas.

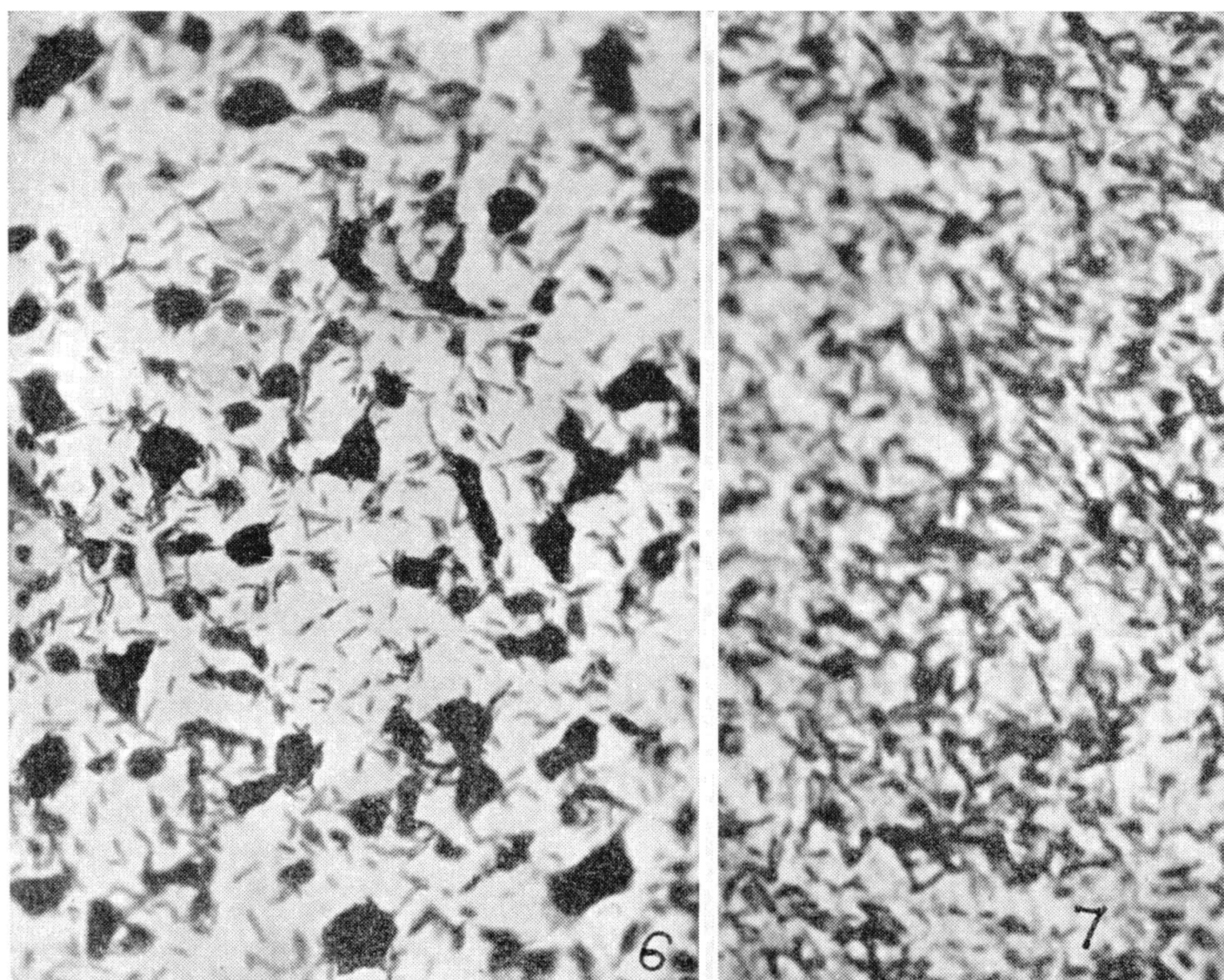


Fig. 6 — Fotomicrografia de esfregaço de gânglio inguinal de outro camundongo preto do mesmo lote inoculado a 15/3, e morto a 12/7/49 (118.º dia da inoculação), mostrando riqueza fabulosa de bacilos e globias. Emulsão desse gânglio, tratada pelo método de Petroff, e semeada em meio de Loewenstein, produziu a cultura Stefansky IV. Ziehl-Neelsen. x 1.100.

Fig. 7 — Fotomicrografia de esfregaço da cultura de bacilo ácido-álcool resistente obtida com a sementeira de emulsão do gânglio acima. Ziehl-Neelsen. x 1.100.

Esses bacilos são ácido-álcool resistentes permanentes e GRAM positivos. Recentemente o Dr. LAERTE DE ANDRADE, que trabalha no Laboratório de Leprologia, verificou que essas culturas, isto é, esses bacilos são tão fluorescentes quanto os de KOCH e de HANSEN, de

origem humana. Quanto ao teste DUBOS para virulência, a prova foi negativa para as duas culturas, discordando, portanto, com a nossa experiência em murídeos, nos quais, em prazo menor que o necessário para formação de leproma com o bacilo STEFANSKY de Paris, houve formação de placas de alopecia, de nódulos, com a presença de bacilos na pele, tumor ou abscesso e nos órgãos. Ilustramos este trabalho com algumas fotografias de ratos com alopecias produzidas por inoculação dessas culturas, e veremos a seguir que os ratos são muito menos sensíveis à infecção que os camundongos pretos.



Fig. 8 — Fotografia de camundongo preto, americano, inoculado em 14/6 com emulsão da 1.^a retrocultura da Amostra Stefansky II e sacrificado a 14/7/49 (30.^o dia da inoculação) apresentando placa de alopecia no peito, com granuloma musculo-cutâneo, cujo esfregaço foi positivo (+++).

Fig. 9 — Fotografia de outro camundongo preto do mesmo lote inoculado a 14/6 com a 1.^a retrocultura da Amostra Stefansky II e sacrificado a 14/7/49 (30.^o dia da inoculação). Desde o 5.^o dia apresentava empastamento na virilha. No 30.^o dia apresentava placa de alopecia na virilha e abdomen, com pequena ulceração no centro (ponto de inoculação) e tumor musculo-cutâneo, cujo esfregaço foi ++++. Tais sintomas da infecção, no curto prazo de 30 dias, mostram a alta sensibilidade desta raça de murídeo ao bacilo de Stefansky e que a cultura obtida é tão patogênica quanto a emulsão do tumor original.

EXPERIÊNCIA COM CAMONDONGOS PRETOS

Março 15, 1949. — Com a colaboração do Dr. BUENO DE MESQUITA, Chefe do Serviço de Profilaxia da Lepra da Guiana Holandesa, que se achava no Rio de Janeiro em viagem de estudos, inoculámos dez camondongos pretos machos, adultos (*Mus musculus*, black race C-57 Rockland Farms, U.S.A.), com 0,4 c.c. de emulsão fresca de leproma STEFANSKY, amostra de Paris, em cada um, por via subcutânea, uns na virilha, outros na axila, sempre do lado direito. Esses pequenos animais, descendentes dos que o Instituto Reckefeller de New York forneceu ao Dr. J. G. LACORTE, pesam, quando adultos, de 20 a 30 gr; são muito ageis, mas mansos, e têm pêlo negro e luzidio.

Abril 6, 1949. — No 22.^o dia da inoculação, 4 dos 9 camondongos, sobreviventes, (pois um morreu, de traumatismo, 1/2 h depois de inoculado), apresentavam placas de alopecia em várias partes do corpo, uma pequena ulceração no ponto de inoculação, extrema magreza, torpor doentio e pêlos rissos, sem brilho. Os quatro com placas de alopecia foram sacrificados à gás de iluminação; dois deles tinham enfartamento ganglionar e tumores musculo-cutâneos, na virilha direita; um tinha tumor abdominal e o 4.^o tinha apenas enfartamento dos gânglios axilares e das virilhas. Os esfregaços desses gânglios e tumores não se diferenciavam dos do leproma STEFANSKY, cuja emulsão serviu de *inoculum*, tal a sua riqueza em bacilos a.a.r. Os esfregaços do fígado, baço, pulmões, rins e testículos foram fracamente positivos. As emulsões dos tumores e dos gânglios, após tratamento pela soda, foram semeados em dois lótes de dez tubos de meio de LOEWENSTEIN, num dos quais começou a se desenvolver uma cultura branco-pérola após 30 dias de incubação a 37.^o C. No 60.^o dia (Junho 6) verificando a pureza dessa cultura (Strain STEFANSKY III, S. A.) repicámo-la em LOEWENSTEIN e meios glicerinados.

Maio, 3. — 48.^o dia da inoculação: Foi sacrificado o 5.^o camondongo, com uma grande placa de alopecia em redor do ponto de inoculação, que está ulcerado, interessando metade do peito, axila, etc. (Vide figura 1).

Necropsiado verificamos extenso tumor debaixo dessa placa de alopecia, interessando não só a pele como também a musculatura do peito. Os cortes desse tumor revelaram um granuloma típico, como se vê do

“P.C. 15.758 da Secção de Anatomia Patológica do I.O.C. Camondongo preto(americano) sacrificado em 3-5-49. Resultado do exame anátomo-patológico: No derma existe um granuloma inflamatório, formado predominantemente por macrófagos, tendo de perimeio linfócitos e células plasmáticas, sem tendência para necrose. A coloração pelo método de ZIEHL revela a presença de grande número de bacilos ácido-álcool resistentes, ocupando o citoplasma dos macrófagos. *Baço*: São encontrados nódulos formados por substância amorfa, corada em róseo, parecendo corresponder à infiltração amiloide,

esperando esse fato confirmação pelos métodos adequados. Não são vistos bacilos a.a.r. *Fígado*: Hiperemia. Infiltração de células mononucleares dos espaços-porta. *Rim*: Hiperemia. Manguinhos, 14 de Maio de 1949.

(a) Dr. C. B. MAGARINOS TORRES, Chefe da Divisão de Patologia”.

Desse corte de leproma damos quatro excelentes fotomicrografias. (Figs. 2-5).



Fig. 10 — Fotografia de rato branco inoculado em 21/4/49 com emulsão da cultura de Stefansky I (cromogênica) e sacrificado a 22/7/49 (92.º dia da inoculação), mostrando placa de alopecia parcial no dorso. A necrópsia mostrou abscesso na virilha e gânglios hipertrofiados, cujos esfregaços foram positivos para bacilos a.a.r. A ausência de granuloma mostra que este animal é mais resistente à infecção que o camundongo preto.

Fig. 11 — Fotografia de outro rato branco (criado no biotério do I.O.C. como os outros murídeos utilizados nestas experiências) do mesmo lote acima, inoculado a 21/4/49 com a cultura Stefansky II (amaréla) e sacrificado a 5/8/49 (106.º dia da inoculação), mostrando placa de alopecia no dorso, raiz da cauda e escroto. A necrópsia mostrou abscesso na virilha e gânglio bipertrofiado, ambos positivos para bacilos a.a.r. A ausência de tumor confirma a maior resistência deste murídeo em relação aos camundongos pretos, para a infecção Stefansky.

Lepromas iguais ao original de STEFANSKY, formados entre 22 e 48 dias da inoculação, indicam alta sensibilidade dessa raça de camundongo para o bacilo da lepra murina. Nos ratos e camundongos brancos esse granuloma só se verifica entre 6 e 12 meses da inoculação.

Metade do leproma do Camondongo 5 foi triturado e emulsionado, parte dessa emulsão foi inoculada noutros 5 camondongos da mesma raça, dos quais um, no 24.^o dia (Junho 6) apresentando extenso empastamento na virilha (ponto da inoculação) foi sacrificado, revelando abundantes bacilos os seus esfregaços. O resto daquela emulsão foi tratado pela soda (método PETROFF) e semeado o sedimento em 11 tubos

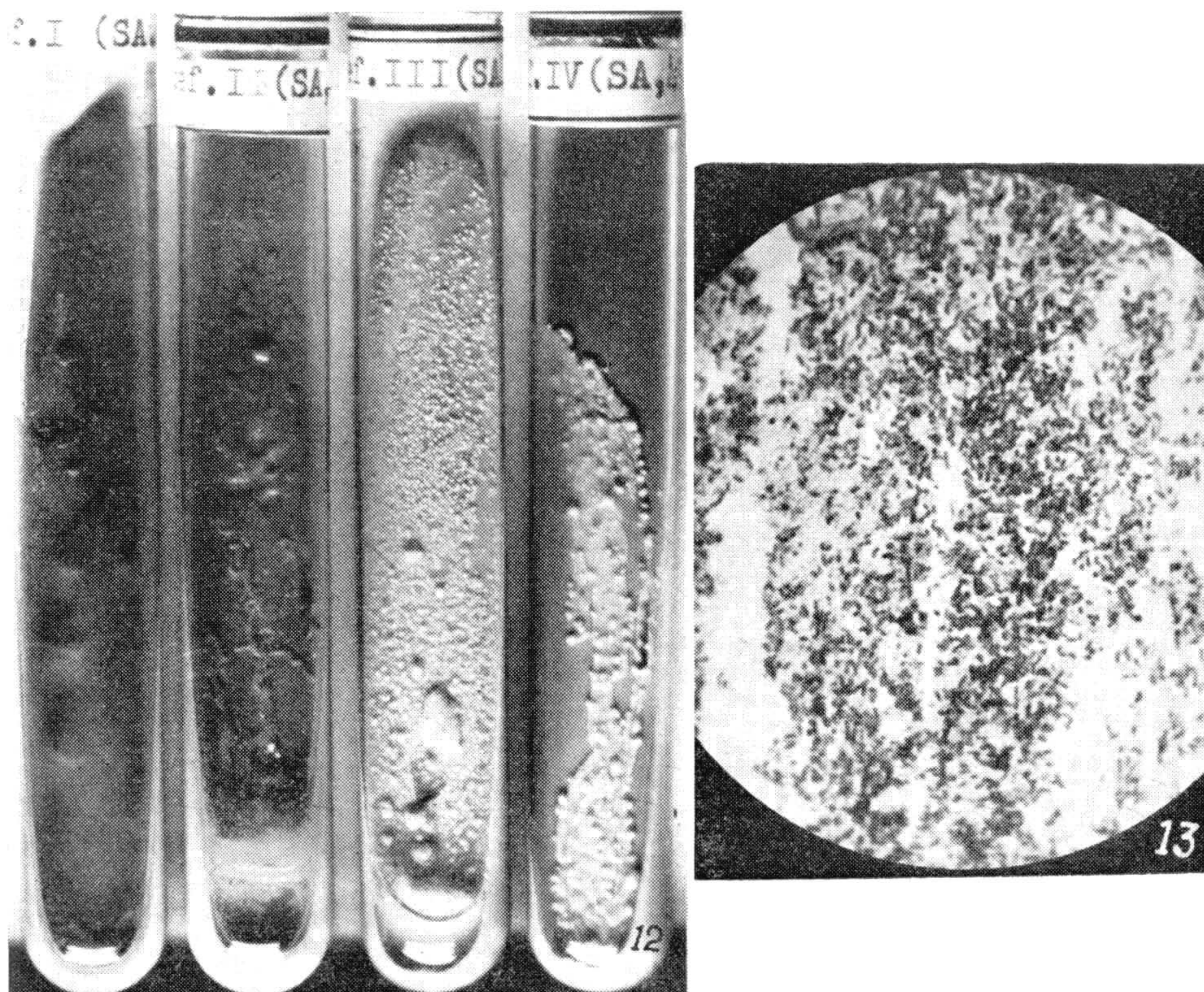


Fig. 12 — Fotografia das culturas (as duas primeiras por serem cromogênicas não ficaram demonstrativas) isoladas pelo autor de ratos e camondongos pretos inoculados com emulsão de leproma Stefansky, amostra de Paris. Amostra I, cor de abóbora e amostra II, amarela, isoladas de ratos brancos, em 1948; amostras III e IV, branco-pérola, isoladas de camondongos pretos em 1949. Todas as quatro amostras são patogênicas para murídeos, sendo que as amostras I e II são fluorescentes e com o teste Dubos (virulência) negativo; as amostras III e IV são nitidamente positivas para as duas provas.

Fig. 13 — Fotomicrografia do esfregaço da cultura Stefansky IV, passada pelo caldo glicerinado, quando adquiriu a forma cocoide, sem perder a propriedade ácido-álcool resistente, a fluorescência e a positividade para o teste Dubos, verificadas pelo Dr. Laerte Andrade.

de LOEWENSTEIN, num dos quais, após 30 dias de incubação a 37.^o C (Junho 3) desenvolveu-se uma cultura crême, granulosa, cujo exame microscópico revelou abundantes bacilos a.a.r. entre uma bactéria corada em azul pelo ZIEHL-NEELSEN. Com um tratamento dessa cultura pela soda não conseguimos purificá-la e a desprezamos, talvez tendo com

isto cometido um erro, a considerar-se o que a Secção de Anatomia Patológica tem verificado nos cortes de material semelhante: granulomas viscerais por bacilos a.a.r. e outros por bacilos cianófilos.

Maio, 13. — 58.^o dia da inoculação: Morreu o 6.^o camondongo, com tumor na virilha o qual foi emulsionado e o sedimento semeado, após quatro centrifugações, em meio de LOEWENSTEIN, já bastante sêco. Não houve nenhuma germinação.

Os esfregaços do tumor e das visceras desse animal revelaram abundantes bacilos a.a.r. Com o resto da emulsão do leproma re inoculamos (Maio 13) os 3 camondongos restantes do lote de 15 de Março.

Junho, 8. — Morreu o 7.^o camondongo e não foi necropsiado, por estar eu ausente.

Julho, 12. — 118.^o dia da primeira inoculação: Morreram os dois últimos camondongos, ambos com os exames dos órgãos positivos para bacilos a.a.r., e um com tumor inguinal e gânglios hipertrofiados. O esfregaço de um gânglio, o maior deles, revelou uma abundância tal de bacilos a.a.r. que parecia uma emulsão filtrada de leproma de rato. Desse esfregaço damos aqui uma fotomicrografia impressionante pela riqueza de globias típicas, quando os clássicos não admitam que o bacilo de STEFANSKY as produzisse. (Fig. 6).

Julho, 13. — Outro gânglio, deixado na geleira no dia anterior, cujo esfregaço deu resultado igual ao da vespera (+ + ⊕ ⊕), foi triturado, tratado pela soda e o seu sedimento semeado no meio de LOEWENSTEIN e outros.

Agosto, 19 — Num dos tubos de LOEWENSTEIN está germinando (36.^o dia de incubação a 37° C) uma cultura esbranquiçada, em camada delgada.

Setembro, 3. — Esta cultura, após 50 dias de semeadura e 15 dias do início da germinação, cobre metade da superfície do meio, sob o aspecto duma camada delgada, finamente granulosa, de cor branco-pérola, tendendo para o crême. O seu esfregaço, corado pelo ZIEHL-NEELSEN revelou estar pura: bacilos granulosos a.a.r., dando a impressão de cocoides. Damos desse esfregaço uma fotomicrografia no final deste trabalho (Fig. 13). Trata-se da nossa 4.^a cultura (Strain STEFANSKY IV, S.A. Recentemente o Dr. LAERTE MANHÃES DE ANDRADE verificou que as amostras STEFANSKY III e IV (não cromogênicas) são fluorescentes, tão fortemente quanto o bacilo de STEFANSKY original de Paris. Verificou mais que essas culturas são positivas para o teste DUBOS para virulência.

O estudo bacteriológico completo destas quatro amostras e das suas retroculturas, será objeto duma comunicação ao 5.^o Congresso Internacional de Microbiologia, a realizar-se no Rio de Janeiro de 17 a 24 de Agosto de 1950.

CONCLUSÕES

1 — O A. provou que o camundongo preto (raça norte-americana) é eminentemente sensível à infecção pelo bacilo de STEFANSKY, que produz nele extensas placas de alopecia e lepromas, alguns do tipo musculo-cutâneo, desde o 22.º dia da inoculação.

2 — O A. conseguiu isolar e cultivar artificialmente quatro amostras de bacilos ácido-álcool resistentes, duas de ratos brancos (cromogênicas) e duas de camundongos pretos (não cromogênicas) inoculados com emulsão de leproma STEFANSKY, amostra do Instituto Pasteur de Paris.

3 — Provou o A. que essas culturas são patogênicas para ratos e camundongos, de cujas lesões experimentais conseguiu obter reculturas.

4 — Obteve o A. com essas culturas os dois tipos clínicos descritos em 1903 por STEFANSKY, na lepra murina espontânea: o tipo ganglionar, em ratos (menos sensíveis), e o tipo musculo-cutâneo nos camundongos pretos (muito mais sensíveis).

Manguinhos, 20 de Maio de 1950.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
A lepra dos ratos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Tomo 33, Fasc. 2, Agosto de 1938, pp. 297/318, com 3 estampas.
- 2 — CHAUSSINAND, R.
L'infection murine due au bacillus de Stefansky n'est pas une "lèpre". Bulletin de l'Académie de Médecine, Paris, Vol. 132 (1948), pp. 486/7.
- 3 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
The morphology of Stefansky's bacillus (Mycobacterium leprae murium) according to experimental researches carried out with material from England, France and Germany. International Leprosy Journal, Vol. 6, 1938, pp. 468/9.
- 4 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
Os bacilos de Hansen e de Stefansky. Contribuição para a sua morfologia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Tomo 37, Fasc. 1, 1942, pp. 11/18, com 7 estampas.
- 5 — SOUZA-ARAÚJO, H. C. DE
Infecção experimental de carrapatos (Amblyomma cajennense) em ratos com lepra Stefansky, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Tomo 38, Fasc. 2, 1943, pp. 183/86.