

Novos Estudos sôbre a Lepra Murina (*)

pelo

DR. H. C. DE SOUZA-ARAÚJO

A) INFECÇÃO DA MACACA MULATTA COM O BACILO DE STEFANSKY E PASSAGEM EM MURÍDEOS COM O ISOLAMENTO DE DUAS CULTURAS DE BACILOS A.A.R

Em dezembro de 1951 comuniquei à III Conferência Panamericana de Leprologia, em Buenos Aires (V. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, T. 50, 1952), os meus primeiros ensaios sôbre a infecção de um macaco Rhesus com o bacilo da lepra murina, amostra do Instituto Pasteur de Paris, concluindo pela sua alta sensibilidade. Os nódulos obtidos foram extirpados para bacteriologia e histopatologia e após 70 dias de repouso, e completa cicatrização das biópsias, foi êsse animal re-inoculado com emulsão frêscã de leproma Stefansky, da mesma cêpa. Produziu-se re-infecção de incubação mais curta e reações locais e gerais muito mais intensas que na primeira infecção. No 14.º dia os nódulos cutâneos começaram a se ulcerar e a sua baciloscopia foi fortemente positiva (+++). Já havia eliminação do bacilo pelas fezes.

Com suspensão de nódulos biopsiados dêsse rhesus inoculei, a 31 de outubro de 1951, dois lotes de ratos e camundongos brancos. Triturado de nódulo da re-infecção, tratado pela soda e semeado em meios próprios, a 14 de fevereiro de 1952, produziu cultura de bacilos fortemente ácido-álcool resistentes.

A 4 de junho de 1952 sacrifiquei 2 dos camundongos inoculados a 31 de outubro de 1951, um dêles com grande tumor inguinal, cujo triturado mostrou abundantes bacilos a.a.r. com os caracteres do de Stefansky (V. fig. 4, Est. 1, nos Anais do Congresso), assim como a sua histopatologia (1). Essa

(1) P.C. 17.890, I.O.C., Pele, tumor e órgãos de Camundongo branco inoculado a 31-10-51, c/emulsão tumor Rhesus 5 (Stef.); sacrificado em 4-6-52: *Pele*: No derma e na hipoderma, existe infiltração celular inflamatória, com predominância de grandes células epitelióides que encerram, em abundância, bacilos a.a.r., longos, granuloso e vacuolados. Tais células também são encontradas, em grande número, em um pequeno gânglio linfático superficial. *Baço*: Presença, na polpa vermelha, de raras células contendo bacilos a.a.r. *Fígado*: Granulomas inflamatórios encerrando bacilos a.a.r. semelhantes aos descritos na lesão cutânea. *Rim*: Hiperemia. *Pulmão*: Hiperemia. Pequenas hemorragias. Rio, 24 de julho de 1952. — Dra. Rita A. de A. Cardoso.

(*) Trabalho apresentado pelo autor ao VI Congresso Internacional de Leprologia, Madrid 3/X/1953 e publicado nos seus Anais, com ilustrações, pp. 857/64.

suspensão foi inoculada no mesmo dia, em ratos e camundongos e semeada em «Loewenstein» produziu cultura de bacilos a.a.r. patogênica para rato segundo se vê da histopatologia (2) abaixo descrita.

INOCULUM DO 2.º RHESUS

A 5 de novembro de 1952 sacrifiquei um dos ratos inoculados a 4 de junho de 1952 (passagem do 1.º Rhesus), apresentando grande tumor inguinal, evoluído em 5 meses, cujas baciloscopia e histopatologia (3) eram características de leproma Stefansky, confirmada pelas electromicrografias. Com parte desse tumor preparei 2 c.c. de suspensão que, após filtração em gaze, inoculei, por via subcutânea, na fronte, faces, lado esquerdo do peito (pele peluda) e no testículo direito, de um Rhesus de 3 anos de idade, que esteve em repouso no Biotério Geral do Instituto Oswaldo Cruz durante 14 meses e 20 dias, após extirpação dos nódulos produzidos por inoculação de cultura de lepra humana.

MARCHA DA INFECÇÃO

Ausência de reação local 24 horas depois. No 6.º dia (10/11/52) já se mostravam três nódulos, na fronte e faces, que a 14 de novembro se apresentavam avermelhados e do tamanho de grãos de milho. No 15.º dia (20 de novembro) foi o símio mostrado ao Dr. Yves Biraud, da Organização Mundial de Saúde, que se achava em visita ao nosso Laboratório; depois foi fotografado e escuriado um dos seus nódulos para baciloscopia, que foi fortemente positiva para bacilos e globias.

A 26 de novembro (22.º dia da inoculação): Os nódulos faciais começaram a murchar; no peito havia queda de pêlos e à palpação se sentia um tumor intracutâneo duro e do tamanho de uma amêndoa; o testículo direito estava enorme e duro, com o saco escrotal cianótico. A punção do tumor torácico deu serosidade sanguinolenta, e do testículo pus espesso, cujas baciloscopias foram positivas para bacilos e globias e semeados esses materiais, *in natura*, em «Loewenstein» mostraram germinação de colônias

(2) P. C. 18.098, I. O. C. Tumor e órgãos de Rato inoculado com cultura de camundongo branco infectado com tumor do Rhesus 5 (Stefansky), sacrificado a 22/8/52. *Pele*: No derma, infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, algumas células plasmáticas e grandes células mononucleares, as quais encerram bacilos ácido-álcool-resistentes. Em ponto circunscrito, necrose da epiderme e presença de fibrina e leucócitos polimorfonucleares. *Fígado, baço e rim*: hiperemia. *Pulmão*: hiperemia. Pequenas hemorragias, focos de edema e de atelectasia. *Nota*: Ausência de bacilos a.a.r. nos córtex dos órgãos internos examinados. Rio, 7 de outubro de 1952. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso*.

(3) P. C. 18.257, I. O. C. Fragmentos de pele e de tumor de Rato branco, inoculado a 4/6/52 com emulsão de tumor de camundongo branco infectado com tumor do Rhesus 5 (Stefansky) e sacrificado a 5/11/52: "Presença de granuloma inflamatório, constituído por grandes células mononucleares, encerrando número considerável de bacilos a.a.r., esse infiltrado formava volumoso nódulo que interessa a porção profunda do derma; vêem-se pequenos focos de infiltração celular, da mesma natureza. Epiderme sem alterações aparentes. Rio, 16 de dezembro de 1952» — *Dra. Rita A. de A. Cardoso*.

amarelas no 35.º dia de incubação a 37°C (31/12/52). No mesmo dia 26 de novembro extirpei os nódulos das faces, enviando à Secção de Anatomia Patológica para estudo (4) um deles e o outro foi utilizado em bacteriologia.

A 10 de dezembro o nódulo frontal, não biopsiado, estava ulcerado, com bordas salientes e côr avermelhada, de aspecto leishmaniótico; o tumor do peito em regressão, com nítida alopecia (idêntica à da foto 3, Estampa 1) e o testículo cada vez maior. A baciloscopia das fezes foi positiva. A 30 de dezembro as lesões estavam em franca cicatrização, na face; o tumor do peito do tamanho duma azeitona e o testículo inoculado 20 vezes maior que o oposto. A punção dêste órgão deu 2 c. c. de pus fluído e fétido, que foi semeado, *in natura*, em «Loewenstein» e «Dubos» e inoculado em dois camundongos, nos quais não produziu tumores. No mesmo dia semeei serosidade colhida do tumor do peito, também *in natura*, e após 33 dias de incubação a 37°C (29 de dezembro) um tubo de Loewenstein de cada série apresentava uma colônia amarela, circular, brilhante e de aspecto úmido.

Aos 5 de janeiro de 1953 sacrifiquei o símio, injectando-lhe clorofórmio nos pulmões. Feita a sua necropse não foram encontradas lesões macroscópicas nas vísceras. Extirpados o tumor do peito, que se achava sob uma placa de alopecia, e o testículo inoculado, que estava transformado numa bolsa de pus fétido. A baciloscopia dêste pus e do tumor torácico revelou raros bacilos a.a.r. O tumor, os dois testículos e fragmentos das vísceras foram enviados à Secção de Anatomia Patológica, cuja histopatologia (5)

(4) P. C. 18.298, I. O. C. 27/11/52. Fragmento de pele da face do Rhesus n.º 7, inoculado a 5/11/52 com emulsão tumor Stefansky de rato, passagem do Rhesus n.º 5. *Pele*: Em ponto situado na porção profunda do derma, vê-se um foco constituído por material necrosado e por leucócitos, em tórno do qual se encontram células mononucleares volumosas encerrando bacilos ácido-álcool-resistentes, longos e granulados. Nota-se, também, moderada proliferação de fibrócitos, nessa região. Na porção mais superficial do derma, existe processo inflamatório agudo. Epiderme sem alterações importantes. Rio, 23 de dezembro de 1952. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*»

(5) PP.CC. 18.344/46, I. O. C., 5/1/53: Testículos do Rhesus n.º 7 inoculado a 5/11/52 com emulsão de leproma Stefansky de Rato, passagem de outro Rhesus, sacrificado a 5/1/53: «Em um córte encontra-se estrutura de testículo, sem alterações. Em outra preparação (testículo do lado oposto), vê-se uma porção central necrosada, em tórno da qual é possível perceber alguns tubos seminíferos, parcialmente conservados, existindo uma intensa infiltração por leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, células plasmáticas, e grandes células mononucleares, dotadas de citoplasma abundante; muitas células destas apresentavam vacúolos no citoplasma. Tal processo inflamatório interessa a vaginal. Não são encontrados bacilos ácido-álcool-resistentes, neste material.» Rio, 6 de fevereiro de 1953. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

«Tumor do peito (lado esquerdo):

«Envolvendo focos de necrose dos tecidos, vê-se processo inflamatório, no qual tomam parte, além de linfócitos e de alguns leucócitos polimorfonucleares, grandes células mononucleares de citoplasma abundante, às vêzes vacuolado e células gigantes do tipo Langhans. Não é possível identificar bacilos ácido-álcool-resistentes.» Rio, 6 de fevereiro de 1953. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

«Coração: sem alterações. *Rim*: sem alterações. *Pulmão*: sem alterações. *Baço*: Pequenas hemorragias. *Fígado*: Focos de infiltração por células monocleares, no parênquima, formando pequenos granulomas (aliás múltiplos). Infiltração de alguns espaços porta por células mononucleares. Rio, 6 de fevereiro de 1953. — *Dra. Rita A. de A. Cardoso.*

provou que a infecção não se generalizou, encontrando-se apenas no fígado múltiplos pequenos granulomas, no tumor torácico, já em franca regressão, predominavam as células mononucleares e gigantes do tipo Langhans.

BACTERIOLOGIA

O tumor do camundongo branco inoculado a 31/10/51 (passagem do Rhesus n.º 5) e sacrificado a 4/6/52 deu suspensão rica em bacilos: corada pelo Z-N mostrou muitas globias do tipo «boule épineuse» de Jeanselme; corada pelo «Fontes» revelou tôdas as formas clássicas do bacilo: desde um grande grânulo central, de duplo diâmetro do bacilo, até cocótricas com seis grânulos azuis, ligados por tênue protoplasma róseo; massas amorfas de simplasma róseo com muitos grânulos dispostos em várias posições. O bacilo de Stefansky corado pelo «Fontes» mostra-se mais delicado e menor que quando corado pelo Z-N. No conjunto acima ainda havia bacilos dispostos dois a dois, simulando divisão longitudinal. Esses bacilos são fluorescentes à auramina, porém menos intensamente do que o bacilo de Koch (Dr. Laerte de Andrade).

As sementeiras dessa emulsão nos meios de Loewenstein, de Dorset e no caldo glicerinado, após 18 dias de incubação a 37° revelaram (23 de junho) apenas uma colônia amarela, circular, brilhante e de aspecto úmido num tubo de Dorset, véu e depósito brancos num tubo de caldo glicerinado, que se conservou límpido. Esta última cultura é muito semelhante à minha amostra Stefansky IV. Esfregaços dêsse véu, corados pelo Z-N e pelo «Fontes» mostraram elementos a.a.r. com as formas clássicas do bacilo de Stefansky. O véu foi repicado em vários meios de cultura.

A sementeira do tumor-soda do Rato (passagem do Rhesus 5, Stefansky) de 13 de outubro, a 25 de outubro de 1952 apresentava tênue véu branco no meio de Dubos. O «Loewenstein» semeado a 5 de junho com emulsão do tumor do camundongo branco (também passagem do Rhesus 5) apresentava-se a 25 de novembro coberto de um inducto amarelo claro, com denso depósito mucóide, côr de gema de ovo. Essa cultura deu fluoroscopia fortemente positiva e teste de Dubos negativo (Dr. Laerte de Andrade). Sementeira de 5 de junho no meio de Dorset a 25 de novembro formava delgada camada côr de ouro. A segunda geração de 15 de agosto em «Loewenstein» formava delgada camada idêntica à cultura original e no agar glicerinado, cultura de 80 dias, formava um inducto amarelo-pardacento, brilhante e de aspecto úmido.

As sementeiras de materiais testiculares e tumorais do Rhesus 7 (inoculado a 5/11/52), após 33 dias de incubação a 37°C apresentavam no «Loewenstein», um tubo de cada série, uma colônia amarela idêntica às anteriormente descritas. A 31 de dezembro a cultura do pus testicular apresentava no «Loewenstein» delgada camada amarela, de aspecto úmido, e a cultura da serosidade do tumor apresentava uma grande colônia amarela no «Loewenstein» que estando sêco lhe adicionei algumas gotas de meio de Dubos. A sementeira dessa serosidade em «Dubos», de 26/11/52 apresentava a 6/1/53 meio límpido, com tênue véu subindo de 1 a 2 cm. pela parede do tubo e formando depósito. Corado pelo Z-N mostrou bacilos longos e cocóides; pelo «Fontes» tôdas as formas clássicas. A sua fluo-

roscopia foi fortemente positiva e a sua microscopia pelo contraste de fases (Dr. Muth) mostrou bacilos ligeiramente móveis e com as formas observadas em emulsão frêscas de leproma Stefansky. A segunda geração de 6 de janeiro examinada a 7 de fevereiro no Loewenstein (tubo grosso, de diâmetro duplo do comum) mostrou germinação em camada amarelo-pardacenta, ligeiramente elevada, brilhante e de aspecto úmido. Essa mesma segunda geração em «Dubos» apresentava véu branco-amarelo, subindo 2 mm. pela parede do tubo e com depósito. A sua fluoroscopia foi positiva e o teste de Dubos negativo a 8/2/53.

Essas novas culturas foram inoculadas em murídeos, que se acham em observação.

B) NOVAS CULTURAS DE BACILOS A.A.R., TIPOS S E R ISOLADOS DE RATOS E CAMUNDONGOS INFECTADOS COM BACILOS DE STEFANSKY MISTURADOS À HIDRAZIDA.

Numa comunicação enviada ao VI Congresso Internacional de Microbiologia, a realizar-se em Roma, de 6 a 12 de setembro próximo futuro, descrevi, em resumo, as culturas de bacilos a.a.r. que isolei de murídeos infectados com bacilos de Stefansky misturados à Hidrazida. Trabalhando, desde 1947 até 1953, com material de lepra murina, amostra do Instituto Pasteur de Paris, gentilmente fornecido pelo Dr. R. Chaussinand, venho obtendo, reiteradas vezes, o isolamento e cultivo artificial de dois tipos de culturas, uma cromogênica tipo S da classificação das Mycobactérias, fortemente a.a.r. e Gram positiva, moderadamente positiva à fluoroscopia, mas, não obstante ser negativa à reação cito-química para virulência de Dubos, é patogênica para as várias raças de murídeos. A outra, não cromogênica, tipo R, branca ou creme, formando nos meios sólidos colônias salientes e verrucosas, muito aderentes ao meio, fortemente positiva ao Z-N, Gram, fluoroscopia e teste de Dubos. De fato esta cultura, idêntica às minhas amostras Stefansky III e IV isoladas em 1949 de camundongos pretos americanos inoculados com material original da amostra Chaussinand, é mais patogênica para murídeos do que a cromogênica. Nos meios líquidos — caldo glicerinado, Dubos e água glicerizada — ambas essas culturas produzem véus (amarelos ou brancos) e depósitos, sem turvar os meios. Pela insistência com que venho obtendo êsses dois tipos de bacilos, convenci-me de que a lepra murina, amostra do Instituto Pasteur, é produzida por uma infecção mista. Solicitei dos Professores Chandler (Los Angeles, Califórnia) e Fielding (Sydney, Austrália) material de lepra murina daquelas regiões, para um estudo comparativo.

Dentre as várias experiências que fiz com o bacilo Stefansky e a Hidrazida, merece especial destaque a seguinte: aos 4 de julho de 1952, selecionei um dos ratos brancos inoculados com tumor Stefansky a 14 de janeiro de 1952, em excelente estado geral, com a pele e o sistema piloso normais e apresentando, na virilha direita, um regular tumor de 5 ½ meses de evolução, no qual tumor injetei, em 50 dias (4 de julho a 23 de agosto de 1952) 130 miligramas de Hidrazida Schering (100 mg. por c.c.). Aos

4 de setembro (60.º dia), êste rato, parecendo muito doente, foi sacrificado. À autópsia apresentava um tumor do tamanho duma azeitona, encapsulado e aderente à pele abdominal e à musculatura da coxa, cujas baciloscopia e histopatologia (6) mostraram os caracteres do leproma Stefansky comum. Esfregaços dos gânglios e vísceras dêsse animal também foram positivos para bacilos a.a.r.

Suspensão dêsse tumor que, teòricamente, devia estar com os bacilos mortos pela Hidrazida, foi semeada nos meios próprios e inoculada num rato branco e num camundongo prêto. Noventa e dois dias após (9 de dezembro) foram êsses animais sacrificados e necropsiados mostraram pequeno tumor inguinal e gânglios infartados, cujos esfregaços foram fortemente positivos para bacilos a.a.r., assim como os seus figados, pulmões e baços, nessa ordem.

A 11 de dezembro tratei pela soda o tumor do rato e os gânglios do camundongo e semeei-os em duas séries de tubos de «Loewenstein» e caldo glicerinado.

A 20 de dezembro começou a germinação nalguns tubos de «Loewenstein» e no fim da terceira semana das sementeiras (29 de dezembro) essa germinação era perfeitamente visível: cultura mista, colônias amarelas, circulares, brilhantes e de aspecto úmido, cercadas de colônias brancas punctiformes. Três tubos de Loewenstein semeados com triturado do tumor do Rato apresentavam, respectivamente, uma, duas e três dessas colônias amarelas e parte ou todo o resto da superfície do meio coberto de colônias brancas, punctiformes e sêcas. O terceiro dêsses tubos (de 11/12) é representado na fig. n.º 1 da Estampa 3, em côres, e a figura 2 representa um esfregaço de uma das colônias amarelas, corado pelo «Fontes» e a fig. 3 representa um esfregaço de uma das minúsculas colônias brancas (que o desenhista Sr. A. Pugas, do I.O.C., não pôde representar com a sua verdadeira côr branco-pérola) corado pelo Z-N. Por repicagem cuidadosamente feita pude separar, a partir da segunda geração, essas duas culturas.

As sementeiras de triturado dos gânglios bacilíferos do Camundongo preto apresentavam a 29/12 idêntico aspecto, em dois tubos de Loewenstein: uma colônia amarela, em cada um, cercada de minúsculas colônias brancas. Com o tempo se espraiou a cultura amarela idêntica à anteriormente isolada de tumor de camundongo branco infectado por passagem do bacilo de Stefansky do Rhesus 5. Morfológica e biològicamente essas culturas são iguais. Isolada no Loewenstein a cultura branca produziu colônias branco-pérola, conglomeradas, rugosas e sêcas do tipo R, parecida com certas amostras de bacilo de Koch da minha coleção. As figuras 7 e 8 da Estampa 3 representam, respectivamente, esfregaços corados pelo «Fontes»

(6) P. C. 18.136, I. O. C., 5/9/52. Fragmentos de pele e órgãos do rato inoculado com o bacilo Stefansky e injetado com 130 mgs. de Hidrazida. Sacrificado a 4/9/52. Resultado do exame histopatológico: «Pele: Discreta infiltração perivascular por células mononucleares (linfócitos), no derma. No hipoderma encontram-se nódulos, constituídos por células gigantes e grandes células mononucleares, encerrando bacilos a.a.r., em abundância. Em alguns pontos, no meio dêsse infiltrado inflamatório, vêem-se restos de tecido linfóide (gânglio linfático invadido?); em outros pontos, nota-se tecido muscular, comprometido pelo processo inflamatório. Pulmão: Pequenos fôcos de hiperemia. Baço: Rim e Figado: Hiperemia». Rio, 24 de outubro de 1952. — Dra. Rita A. de A. Cardoso.

e pelo Z-N de culturas amarelas, mucóides como as acima descritas, obtidas a primeira de tumor de rato por passagem do Rhesus 5 e a segunda diretamente de tumor do Rhesus 7, ambos inoculados com o bacilo de Stefansky.

RESUMO DOS CARACTERÍSTICOS DAS CULTURAS

Amostra amarela: corada pelo Z-N, apresenta bacilos de tamanho mediano; corada pelo «Fontes», apresenta bacilos típicos na sua maioria com o citoplasma róseo e grânulos azuis escuros; a sua fluoroscopia é moderadamente positiva e negativa à reação de Dubos. A amostra branca, eugônica, é também fortemente ácido-álcool-resistente, Gram positiva e corada pelo «Fontes» mostra tôdas as fórmulas clássicas das Mycobactérias. A sua fluoroscopia é tão forte quanto a do mais virulento bacilo de Koch, assim também a sua resposta à reação de Dubos. Ambos êsses tipos de mycobactérias foram inoculados em vários lotes de murídeos, dos quais alguns já foram estudados, bacteriológica e histopatologicamente, e muitos outros continuam em observação.

Escrito em Athenas, 20 de agosto de 1953.

TRANSLATION

New studies upon rat leprosy (*)

A) INFECTION OF RHESUS MONKEY WITH STEFANSKY BACILLUS, TRANSFERRED TO MURINES AND FOLLOWED BY ISOLATION OF TWO STRAIN OF ACID-FAST BACILLI

On December 1951 I communicated to the III Pan-American Leprosy Conference, in Buenos Aires (See *Memorias Inst. Osw. Cruz*, 50, 1952, pp. 691/8), my preliminary attempts to infect Rhesus monkey with rat leprosy bacilli, strain from Institut Pasteur of Paris, proving its high sensitiveness. The nodules produced in it were extirpated and used in bacteriology and histopathology. After 70 days rest and complete cicatrization of the biopsies, the animal was re-inoculated with fresh suspension of rat leproma of the same strain. Re-infection was produced in shorter period of incubation, with stronger local and general reactions (See figs. 1 and 2, Plate 1). At the 14th day the skin nodules ulcerated, which smears were strongly positive for acid-fast bacilli (+++). The baciloscopia of the Rhesus faeces was then positive too.

On 31st October 1951 I inoculated two lots of white rats and mice with suspension of nodules of said Rhesus. Triturate of a Rhesus re-infection nodule, treated with 10% NaOH solution, and smeared in suitable media on February 1952, produced culture of acid-fast bacilli.

On June 4th 1952 two of those mice inoculated on 31st October 1951, were killed, one showing a big groin tumor, strongly positive for acid-fast

(*) Paper presented by the Author at the VI International Congress of Leprology, held in Madrid, October 3 to 10, 1953 See pp. 857/64 of its Report.

bacilli similar to Stefansky's ones (See Fig. 4 Pl. 1), as well as its histopathology (1).

Said suspension was inoculated, in the same day, in rats and mice and smeared onto Loewenstein medium, developing culture of acid-fast bacilli, pathogenic for rat accordingly to the below histopathological report (2).

INOCULUM OF THE 2ND RHESUS

One of the rats inoculated on June 4th 1952 (1st passage from the Rhesus) was killed on November 5, 1952, presenting one big inguinal tumor, of 5 months evolution, which bacilloscopy and histopathology (3) were characteristic of Stefansky's leproma, confirmed by electronmicrography. With part of such tumor I prepared 2 cm³ of suspension in saline, which I inoculated, subcutaneously, in the forehead and cheeks (glabrous) and left side of the breast (heared skin) and right testicle of one 3 years old Rhesus, which was resting in the general bioterium since 14 months and 20 days, completely cured from an infection produced by a human leprous culture.

COURSE OF THE INFECTION

No local reaction within 24 hours. On November 10th (6th day of inoculation) were seen three nodules in the face (inoculation sites) which, 4 days later, were red and of corn grain size. November 20th (15th day of incubation) the mankey was shown to Dr. Yves Biraud, member of the World Health Organization, who was visiting my laboratory, after it had been photographed and made smears from the face nodules for bacilloscopy which was strongly positive for bacilli and glob'. November 26th (22th day of incubation). The facial nodules became soft; on the breast appeared one plaque of alopecia and by palpation was noticed one hard

(1) P. C. 18.890, I.O.C. — Skin, tumor and viscera of one white mouse, inoculated on 31-X-1951 with suspension of Rhesus n. 5 nodule (Stef.) killed on 4th June 1952. *Skin* — Derma and hypoderma showing infiltration of inflammatory cells, with predominance of epithelioid cells with abundant acid-fast bacilli, large, granulated and vacuolated. These cells were seen also in great number, in sections of one small superficial lymphnode. *Spleen* — In the red pulp a few cells with acid-fast bacilli. *Liver* — Inflammatory granulomas containing acid-fast bacilli similar to those found in the skin. *Kidney* — Hyperhemia. *Lung* — Hyperhemia. Small hemorrhagic foci. Rio, July 24, 1952. — Dr. Rita A. de A. Cardoso.

(2) P. C. 18.098, I.O.C. Tumor and organs of Rat inoculated with culture from white Rhesus 5 tumor (Stef.), killed on August 22nd, 1952. *Skin* — Infiltration of derma by lymphocytes, some plasmazellen and mononuclear cells, with acid-fast bacilli. In circumscrip point, necrosis of the epidermis, presence of fibrina and polymorphonuclear cells. *Liver, Spleen and Kidney*: — hyperhemia, *Lung*: — Hyperhemia. Small foci of hemorrhage, oedema and atelectasis. Absence of a-f bacilli in such organs. Rio, October 7th 1952. — Dr. Rita A. de A. Cardoso.

(3) P. C. 18.257, I.O.C. Pieces of skin and tumor of white rat inoculated on 4-VI-52 with suspension of tumor of white mouse infected with tumor from the Rhesus n. 5 (Stef.), killed on 5-IX-52: «Presence of inflammatory granuloma, formed by large mononuclear cells, with enormous number of acid-fast bacilli. Such infiltrate forms large nodule which penetrates the deep portion of the derma. There are also small foci of cellular infiltration, of the same nature. No apparent alteration in the epidermis. Rio, 16-XII-52. — Dr. Rita R. de A. Cardoso.

intracutaneous tumor of an olive size; the right inoculated testicle was hard and much enlarged, with cyanotic scrotum. The puncture of thoracic tumor gave bloody serosity and that of testicle gave purulent thick material, whose bacilloscopy was positive for bacilli and globi. Such materials, sown *in natura*, on Loewenstein medium, incubated at 37°C. during 35 days (until December 31st 1952) produced yellow colonies. Two facial nodules, biopsied on November 26th, one was sent for histopathology (4) and the other used for bacteriology.

On 10th December the Rhesus showed one non biopsied frontal nodule, ulcerated, red, with elevated margins simulating a leishmaniotic lesion; the breast tumor smaller, under a typical alopecia (similar to photo 3, Plate 1) and the infected testicle much larger. The bacilloscopy of its faeces was positive. On 30th December all the facial lesions were in frank cicatrization; the breast tumor reduced to a nodule of olive size and the inoculated testicle 20 times larger than the normal one. The puncture of this organ gave 2 c. c. of a purulent and fetid fluid, which was inoculated in two mice with negative result, and was sown, *in natura*, in Loewenstein and Dubos media, as was made also with the fluid aspirated from the breast tumor. After 33 days incubation at 37°C. one tube of Loewenstein of each series showed one yellow, circular colony, of humid aspect.

On 5th January 1953 the monkey was killed with chlorophorm. The necropsy did not show any macroscopic visceral lesion. The tumor of the breast and the sick testicle were extirpated. The last one was transformed into one large collection of fetid milky fluid, bacilloscopy of which showed very few acid-fast bacilli, as occurred with the tumor. This tumor, both testicles and pieces of each organ were sent to the Division of Pathology for examination, which report (5) proved that the infection was not generalized; only in section of the liver were found multiple small granulomata and in section of the tumor predominated mononuclear cells and giant cells of Langhans type.

(4) P. C. 18.298, I.O.C., 27-XI-52. Skin of the face of Rhesus n. 7, inoculated on November 5th with suspension of rat leproma, passage from Rhesus n. 5. *Skin* — In deep derma is seen one focus of necrosed material and leucocytes, around which are found large mononuclear cells with large and granulated acid-fast bacilli. In the same region is seen also moderate proliferation of fibroblasts. In the superficial part of the derma exists an acute inflammatory process. No alteration in the epidermis. Rio, 23-XII-52. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso.*

(5) P.P.C.C., 18.344/46, I.O.C., Jan. 5, 1953: *Rhesus* n. 7 inoculated on 5th XI-52 with rat leproma suspension, passage from other Rhesus killed January, 5th 1953. — *Testicles*: Section of one shows normal structure. Section of the other one (inoculated) shows necrotic center, around which are seen a few partially preserved seminiferous tubes; intense infiltration of polymorphonuclear cells, lymphocytes, plasmacells and large mononuclear cells with abundant cytoplasm; many vacuolated mononuclear cells. Such inflammatory process is also seen in the vaginal. No acid-fast bacilli in such sections. *Breast tumor* (left-side) — Around the necrotic tissue foci is seen an inflammatory process of lymphocytes, polymorphous nuclear cells, large mononuclear cells with abundant cytoplasm, sometimes vacuolated and Langhans giant cells. No acid-fast bacilli were found in such sections. *Heart, kidneys and Lungs*: — without alterations. *Spleen* — Small foci of hemorrhage. *Liver* — Multiple small granulomas of mononuclear cells in the parenchyma. Infiltration by mononuclear cells in some portal — spaces.

Rio, February, 6th, 1953. — *Dr. Rita A. de A. Cardoso.*

BACTERIOLOGY

White mouse inoculated on 31 st October 1951 with Stefansky's leproma (passage from Rhesus n. 5), killed on 4th June 1952 showed inguinal tumor the smear of which stained by Ziehl-Neelsen method, was abundant in bacilli and globi («boule épineuse» Jeanselme's type). Smear of the tumor stained by Fontes method showed all the classical forms of the bacillus: with a large central nodule, with two terminal nodules or coccothrices with six nodules connected by a rose-pale cytoplasm; disform masses of rose symplasm with many dark-blue nodules widespread irregularly. The Stefansky's bacillus stained by «Fontes» is smaller and thinner than when stained by Ziehl-Neelsen. Many bacilli appear arranged by two, simulating longitudinal division. Such bacilli are less fluorescent (using auramina) than the Koch's bacilli. The suspension of this mouse tumor sown on Loewenstein, Dorset and glycerin broth, on 23rd June (after 18 days incubation at 37°C.) grew only one yellow circular and shining colony on Dorset and white pellicle and sediment in glycerin broth, the liquid remaining limpid. This last culture is similar to my old strain Stefansky IV. Smears of the veil stained by Ziehl-Neelsen and «Fontes» showed acid-fast elements with the classical morphology of rat leprosy bacillus. The sub-culture of the pellicle in various media grew normally. The sowing of rat tumor suspension, treated by soda (passage from Rhesus n. 5) incubated at 37°C. from October 13th to 25th, 1952, showed thin pellicle on Dubos medium. Sowing in June 5th of suspension of tumor of white mouse (passage from the same Rhesus n. 5), on 25th November grew Loewenstein covering its surface a mucoid yellow layer, forming a dense deposit. This culture was strongly fluorescent but negative for Dubos cytochemical test for virulence. On Dorset medium sowing of the same day (June 5th) showed a thin layer of yellow culture. Subculture, 2nd generation from August 15th, on November 25th showed on Loewenstein a thin yellow layer similar to the original culture. A 80 days old subculture on glycerin agar formed a compact layer, dark-yellow, of humid and bright aspect. Sowing of testis and tumor materials of Rhesus n. 7 (inoculated November 5th, 1952) after 33 days incubation at 37°C., one tube of Loewenstein of each series, showed one yellowish colony similar to the above described.

On 31st December 1952 the testicular fluid sowing showed, on Loewenstein, a thin layer of yellow culture, of humid aspect, and the other of the tumors on the same medium, showed a large yellow colony, and inoculated in Dubos showed on 6th January 1953 a thin veil and deposit. The liquid remained limpid. Smears of such cultures showed large bacilli and cocobacilli, when stained by Ziehl; by Fontes showed all the classical forms of the bacillus. Such cultured bacilli were strongly fluorescent and by contrast phases microscopy showed slight motility, like in the fresh rat leproma suspension (Dr. Muth). The 2nd generation of January 6th, on February 7th (large tube of Loewenstein) showed germination, of a dark yellow elevated layer, shining and of humid aspect. The same 2nd generation in Dubos showed a white yellowish pellicle climbing 2 mm the tube wall and forming deposit. Its fluoroscopy was positive and its Dubos test negative (Feb. 8, 1953). Photos d) and f) plate 2 give an idea of said cultures which were inoculated in murines.

B) NEW STRAINS OF ACID-FAST BACILLI, S AND R TYPES ISOLATED FROM RATS AND MICE INFECTED WITH STEFANSKY'S BACILLI, MIXED WITH HYDRAZID

In a paper sent to the VI International Congress for Microbiology (Rome, 6-12 september 1953), I gave a summarized description of acid-fast bacilli isolated from murines inoculated with a mixture of rat leproma suspension and hydrazid. Working from 1947 till 1953 with rat leprosy strain from Institut Pasteur of Paris, kindly furnished by Dr. Chaussinand, I was able to obtain, repeatedly, cultures of two types, one chromogenic, S type, strongly acid-fast and Gram positive, moderately positive by fluoroscopy and Dubos test negative, but pathogenic for various races of murines. The other one, non-chromogenic, R type, white or slightly cream, producing in solid media dry and elevated colonies, strongly adherent to the media, strongly positive for acid-fastness, Gram, fluoroscopy and Dubos test. Such culture, identical with my strains Stefansky III and IV isolated in 1949 from American black mice infected with the same Pasteur Institute rat leprosy strain, is more pathogenic for murines than the chromogenic ones. Both S and R strains produced pellicles on glycerin broth, glycerin water and Dubos medium, without turbidity.

Due to the insistence in obtaining said two types of cultures I am convinced that the rat leprosy from Pasteur Institute is caused by a mixed infection. I asked Professor Chandler (Los Angeles, California) and Professor Fielding (Sydney, Australia) for some lepromata of rat leprosy from these regions for a comparative study. Amongst the various researches I have done with Stefansky's bacillus and hydrazid, the following is worthy of more consideration: On 4th July 1952 I took one white rat with a right groin leproma of 5.5 months duration, into which I inoculated, within 50 days (4 July to Aug. 23, 1952), 130 milligrams of Schering Hydrazid (100 mg. per c.c.). Sixty days afterwards (September 4th) this rat being too sick it was killed, showing at autopsy an olive size groin tumor, encapsulated and adherent to the abdominal skin thigh muscles, which bacilloscopy and histopatrolgy (6) showed the characteristics of a normal Stefansky's leproma.

Smears from viscera and lymphnodes of such rat were also positive for acid-fast bacilli. Suspension of such tumor, in which the bacilli should be killed by Hydrazid, was smeared into different media and inoculated in one white rat and one black mouse. After 92 days incubation (Dec. 9th) these animals being killed and necropsied showed small inguinal tumors and enlarged lymph-nodes, the smears of which were strongly positive for acid-fast bacilli, as well as the smears of their livers, lungs and spleens. On 11th December I treated, by Petroff method, the tumor of the rat and the

(6) P. C. 18.136, I.O.C., 5-9-52. Pieces of skin and organs from one rat infected with Stefansky bacilli and injected with 130 mg. of Hydrazid. Killed on 4th September 1952 — Report of histopathology — *Skin* — Moderate perivascular infiltration by lymphocytes into derma. In the hypoderma are seen nodules of giant cells and large mononuclear cells, filled with acid-fast bacilli. In certain points, inside said inflammatory infiltrate are seen remains of lymphoid tissue (invaded lymph node?); in other points is observed muscular tissue, invaded by the inflammatory process. *Lung* — Small foci of hyperhemia. *Spleen, Kidney and Liver*: hyperhemia.

lymph-nodes of the mouse and sowed both materials in two series of tubes of Loewenstein and glycerin broth. Nine days later (Dec. 20th) started germination in a few tubes of Loewenstein and on 29th December such growing was perfectly visible: mixed culture, some yellow circular and shining colonies, circumscribed by punctiform white colonies. Three tubes of Loewenstein medium sown with suspension of Rat's tumor showed, respectively, one, two and three yellow colonies and part of or all surface of the medium covered with the said white and punctiform dry colonies. The third of these tubes on 11th December is represented by figure 1, Plate 3, in colours, and figure 2 represents a smear of one of these yellow stained by Fontes method, and figure 3 represents another smear of one white small colony stained by Ziehl-Neelsen. By careful transplants I could separate these two strains since their 2nd generation.

Sowings of the bacilliferous lymph-nodes of black mouse showed, on 29th December, germination of identical aspect as the above in two tubes of Loewenstein: in each tube one yellow colony circumscribed by many other small white colonies. Figure 4, plate 3, shows the spread yellow colony Figure 6, plate 3, shows yellow colony identical as n.º 4, previously obtained from tumor of one white mouse infected by Stefansky's transferred from Rhesus n. 5. Morphologically and biologically these strains are equal. The white culture of tube 4 (Plate 3), as seen in figure 5 of the same plate, produced white-pearl, conglomerated colonies of R type, similar to certain strains of Koch's bacillus of my collection. Figures 7 and 8, Plate 3, represent, respectively, smears of yellow and mucoid cultures, stained by Fontes and by Ziehl-Neelsen, the first obtained from rat tumor, passage from Rhesus n. 5 and the 2nd directly from tumor of Rhesus n. 7, both inoculated with Stefansky's bacilli.

SUMMARY OF CHARACTERISTICS OF THE CULTURES

Yellow strain, stained by Ziehl, showed median size bacilli, stained by Fontes, showed typical bacilli in its major parts with rose cytoplasm, with dark-blue nodules; its fluorescence was moderately positive and Dubos test negative. The white strain, R type, is strongly acid-fast and Gram positive. Stained by Fontes showed all classical forms of mycobacteria. Its fluoroscopy was as strong as the most virulent Koch's bacillus. Also its Dubos test was strongly positive. Both new strains of mycobacteria were inoculated in various batches of murines, of which some have been already studied, bacteriologically and histopathologically, and others are under observation.

Wrote in Athens, Greece, August, 20th, 1953.