

## Lepra Experimental em Macacos

Ação patogênica de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de leprosos (amostras «Chaves» e «Emilia») para a *Macaca mulatta* e o *Cebus fatuellus* (\*)

(Com 10 estampas, sendo 1 em côres)

pelo

DR. H. C. DE SOUZA-ARAÚJO  
(Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro)

### MATERIAL E MÉTODOS

Resumimos neste trabalho os resultados de estudos sobre lepra experimental que fizemos, de Novembro de 1949 a Dezembro de 1954, em sete exemplares de *Macaca mulatta* e dois *Cebus fatuellus*. Sabendo, por experiências anteriores reiteradas, que os animais peludos são refractários à infecção leprosa, demos preferência ao rhesus por ter a cara glabra.

*Inóculos* — Como material infectante empregámos as seguintes culturas de bacilos a.a.r. que isolámos de leprosos :

1. Amostra "Hecke" ("H"), cultura não-cromogênica obtida da biópsia (13-7-49) de lesão lepromatosa de A.A. Hecke, homem de 26 anos, caso L2-N1, após 50 dias de incubação a 37°C (1).

2. Amostra «Chaves I» («CI»), cultura cromogênica obtida da 7ª biópsia (5-9-49) de lesão lepromatosa de J. L. Chaves, homem de 30 anos, caso L2-N2, após 30 dias de incubação a 37°C.

3. Amostra «Chaves II» («CII»), cultura cromogênica obtida da 14ª biópsia de lesão residual do joelho esquerdo do doente acima, após ter tomado 3.220 cm<sup>3</sup> de *Promin* por via intravenosa; morfológica e biologicamente idêntica à amostra "CI".

4. Amostra "Maria D." ("M.D."), retrocultura da amostra "CI" obtida da biópsia (23-1-50) de abcesso formado em cicatriz de reação de Mitsuda +++, do antebraço esquerdo de Maria D., de 18 anos, caso Lt, em consequência da inoculação, na sua coxa direita, de 0.2 cc. de emulsão

---

(\*) Parte da conferência feita no "Cours Supérieur International sur Maladies Tropicales et le Paludisme" organizado pelo "Conseil des Organisations des Sciences Médicales". Universidade de Istambul, Turquia, 25-8-1953.

da cultura viva de Chaves, seu marido. Cultura cromogênica morfológica e biologicamente idêntica à amostra "CI".

5. Amostra «Emilia» («E»), cultura cromogênica obtida da biópsia (28-2-50) de lesão lepromatosa de Emilia J. P., de 53 anos, caso L2-N2, após a incubação de 20 dias a 37°C. (2). Trata-se de bacilos fortemente ácido-álcool resistentes, Gram positivos e que, corados pelo método de Fontes, mostram as formas clássicas das micobactérias patogênicas; positivos à fluoroscopia e parcialmente positivos à reação cito-química de Dubos, para virulência, segundo a maior ou menor intensidade do seu pigmento amarelo. Todos esses bacilos já foram examinados ao microscópio eletrônico e ao de contraste de fases, cujos resultados serão objecto de outro trabalho.

*Via de inoculação e doses* — Adotámos sempre a via subcutânea para as inoculações dos nossos símios. Para infectar ratos com o bacilo de Steffansky, o Mestre Marchoux empregava a dose de 0,4 cc. de emulsão fresca de leproma. Nos símios, que pesam de 30 a 50 vezes mais que os ratos, empregámos doses variando entre 1 e 2 cm<sup>3</sup> de emulsão de cultura viva, portanto, no máximo 5 vezes maiores do que aquela. Em teôr bacteriano as suspensões de culturas correspondem às de leproma.

#### SUMÁRIO DOS PROTOCOLOS

RHESUS N.º 1 — Femea de 4 meses. Foi inoculado a 11-11-49 com 0.5 cc. de emulsão da cultura «Hecke», 2ª geração de 26-9-49, na fronte e igual dose no peito. A 21-11 apresentava um nódulo no sobrolho esquerdo, e nada palpavel no peito, região muito peluda. A 25-11 foi inoculado na fronte e em cada face com 0,5 cc. de emulsão da mesma cultura "H", 3.ª retrocultura, procedente de pus de tumor inguinal de camundongo preto. A 29-11 apresentava um nódulo na face direita, e a 15-12 dois pequenos nódulos na fronte, sendo um residual da 1ª inoculação e outro da 2ª, além de um grande nódulo em cada face, cuja histopatologia, 60 dias após a inoculação (9-1-50), revelou granulomas, semelhantes ao leproma humano. (3)

RHESUS N.º 2 — Macho de 4 meses, pesando 2,5 kg., foi inoculado a 22-3-50, na fronte e regiões malares, com 1,5 cc. da cultura "Chaves I" em caldo glicerinado a 5%, velha de 80 dias. Este símio foi inoculado sete vezes, de 22-3-50 a 14-8-51, o que parecerá exagerado, mas Charles Nicolle e Blaizot (4) inocularam 16 vezes em 60 dias um *Bonnet chinois*, menor que o Rhesus, com material de lepra humana. De 10-4-50 a 28-8-51 o rhesus 2 sofreu nove biópsias para bacteriologia, histopatologia e passagens.

Na 1ª biópsia, feita a 10-4-50, 19º dia da inoculação, o material obtido revelou-se rico em bacilos a.a.r. nos esfregaços e cortes, e a sua histologia era semelhante à do leproma humano, segundo o informe do Prof. Magarinos Torres (P.C. 16.398). A 2ª inoculação feita a 29-4-50 com suspensão de tumor do rhesus n.º 3, infectado com a cultura "Emilia". Após 15 dias os dois nódulos formados nas regiões malares se assemelhavam a lepromas flóridos, cuja baciloscopia foi positiva. 70 dias depois (20-6-50) o símio já apresentava aspecto normal e foi então inoculado com a retrocultura



“Emilia” do mesmo rhesus n.º 3. A reação local, assim como a geral, foram muito mais violentas que a produzida pela inoculação do tumor. Aos 5 de Julho extirpei os 4 nódulos da cara desse macaco, oferecendo dois ao Dr. Arthur Porto Marques, do Serviço de Lepra do Distrito Federal, para seus estudos e utilizei os outros dois para bacteriologia e histopatologia. Os esfregaços desses tumores, corados pelos métodos de Ziehl-Neelsen, Gram e Fontes deram resultados positivos.

A suspensão desses tumores deram resultados positivos também à fluorescopia e à reação de Dubos para virulência. No dia 17 de julho a baciloscopia das fezes do macaco foi positiva para bacilos a.a.r. Nesse dia extirpei-lhe o último nódulo residual da fronte, também positivo para bacilos a.a.r. Aos 10 de agosto, 50.º dia da última inoculação, verifiquei que o animal estava muito magro, com os gânglios inguinais palpáveis e o muco nasal positivo (++) para bacilos a.a.r. semelhantes aos do inóculo. Nesse dia re-inoculei-o (4ª inoculação) com a sua própria cultura (cepa «Emilia») obtida da biópsia de 5 de Julho, apresentando uma reação mais intensa que as anteriores, produzindo nódulos que dez dias depois começaram a se ulcerar. 60 dias após (10-10) estavam cicatrizados. Aos 20 de outubro (70.º dia da última inoculação) re-inoculei-o com a retrocultura de rato branco da mesma cepa “Emilia”. As reações, local e geral, foram mais intensas que as anteriores. A passagem da cultura do bacilo humano no rato parece ter aumentado muito a sua virulência. O exame histopatológico da 5ª biópsia, feita a 8-11-50, segundo relatório do Dr. Jorge P. Guimarães (P.C. 16.792) revelou um esboço de granuloma tuberculoide, facto de considerável importância patológica.

No 30.º dia da 5ª inoculação (20-11) o exame do pus colhido nas lesões tendo sido positivo (++), foi tratado e semeado nos meios próprios.

No 60.º dia (20-12) persistiam grandes tumores faciais e foram descobertas placas de alopecia na cabeça e pelo corpo do animal. A baciloscopia dos nódulos continuou positiva até ao 1.º de fevereiro de 1951 e a 19 e 26 do mesmo mês ainda foi colhido material nesses nódulos para bacteriologia. Após 6 meses de repouso fiz-lhe a 6ª inoculação (25-4-51), usando como *inoculum* a 2ª geração da própria retrocultura do rhesus, cepa «E». Ainda desta vez o animal apresentou forte reação. Nos dias 3 e 9 de Maio colhi material, pus e pele, das lesões para bacteriologia. A baciloscopia desse material foi positiva. Após um repouso de 11 semanas, no biotério geral, fiz-lhe a 7ª inoculação a 14-8-51, com apenas 1 cc. da cultura “E” obtida por passagem no rhesus n.º 3. A reação local e a geral foram ainda bastante intensas e formaram-se três nódulos, na raiz do nariz e regiões malares. A baciloscopia do muco nasal e das fezes desse animal, feita a 28 de Agosto, foi positiva para bacilos a.a.r., como havia sido antes. Extirpei-lhe, então, os três nódulos, cuja baciloscopia foi fortemente positiva. Enviado o material desta 9ª e última biópsia para histopatologia, o relatório da Dra. Rita Cardoso (P.C. 17.351) revelou um granuloma de células epitelioides, com raras células gigantes. Esta tendência à regressão de estrutura semelhante a leproma humano (P.C. 16.398) para granuloma de tipo tuberculoide (PP. CC. 16.792 e 17.351) é muito significativo.

RHESUS N.º 3 — Inoculado a 13-4-50 com 2 c.c. de suspensão da cultura «Emilia», na fronte e regiões malares. No 12.º dia apresentava uma *facies lepromatosa* tão característica que, no 15.º dia (28-4-50) mandámos decapitá-lo para conservar a peça no Museu de Patologia do IOC. Desde o 11.º dia da inoculação já o muco nasal e as fezes desse símio estavam positivos para bacilos a.a.r. O exame histopatológico dos tumores da cara do símio (P.C. 16.480) mostrou “um processo agudo hemorrágico-purulento associado a bacilos a.a.r.» e segundo o Dr. Jorge P. Guimarães não semelhante a leproma. Entretanto o mesmo anatomo-patologista examinando novos cortes obtidos de fragmentos da peça do museu conservada em Kayserling há 30 dias, diz: “Verificamos extenso processo inflamatório no derma, em cujas margens existem numerosos macrófagos vacuolados com morfologia que lembra a da célula leprosa.» 7-6-50.

Novos fragmentos dessa peça, conservada em Kayserling há 51 meses (P.C. 19.156), mostraram estrutura histológica bem conservada e um abscesso sub-cutâneo com bacilos a.a.r. Novos cortes do bloco P. C. 16.480, de 30-5-50, corados a 30-12-54 pela HE e pelo ZN e examinados pelo Dr. Eithel Duarte, mostraram a estrutura de granuloma tuberculoide com inúmeros bacilos a.a.r. O mesmo bloco que a 30-5-50 apresentava numerosos macrófagos vacuolados lembrando as células leprosas, a 30-12-54 apresentava granuloma tuberculoide com numerosos bacilos a.a.r.

Dois anatomo-patologistas experimentados encontraram nas lesões do Rhesus n.º 3 aquilo que frequentemente se encontra na lepra humana: óra granuloma lepromatoso, óra tuberculoide. Hoje chamam a isso de lepra bipolar.

RHESUS N.º 4 — Inoculado na cara a 13-4-50 com emulsão pobre em bacilos, proveniente de nódulos do rhesus n.º 2 infectado com a cultura “CI” a 22-3-50. Esta “passagem” aparentemente foi negativa até 12-5-50, quando o animal foi inoculado com a retrocultura “CI” obtida da mesma emulsão de 13-4, na dose de 2 cc. nos sobrólhos e regiões malares. Parece que o símio ficou hipersensibilizado com a 1.ª inoculação, pois, 24 hs. após apresentava forte tumefacção nos 4 pontos injectados e no 12.º dia (23-5) apresentava 4 grandes nódulos, simulando lepromas flóridos, nos sobrólhos e faces. O pus colhido, então, do nódulo da face direita, revelou abundantes bacilos e globias, confirmados por fluoroscopia fortemente positiva. Nesse mesmo dia o muco nasal e as fezes do símio revelaram bacilos a.a.r.

No dia 25-5 foram extirpados os 2 grandes nódulos malares para bacteriologia e histopatologia, cujos esfregaços corados pelo ZN revelaram inúmeros bacilos e globias. O seu exame histopatológico (P.C. 16.476, de 7-6-50) revelou um processo inflamatório peculiar, por ser constituído predominantemente por macrófagos, sem células gigantes nem necrose de caseificação, mas positivo para b.a.a.r. “quadro histológico que não corresponde estritamente ao do granuloma da lepra humana” (Dr. J. P. Guimarães).

Ao 1.º de junho as sementeiras do pus colhido a 23-5 estavam germinando em 6 tubos de Loewenstein. Foram extirpados os 2 nódulos frontais (2.ª biópsia) cujo pus foi fracamente positivo. No 15.º dia da 2.ª biópsia



surgiram 2 pequenos nódulos secundários, do tamanho de lentilhas, na frente e asa direita do nariz. As feridas das biópsias estão custando a cicatrizar porque o animal arranca e devora as suas crôstas. A baciloscopia do muco nasal feita a 10-8-50, três meses após a inoculação, foi fortemente positiva, como se vê no desenho 5 da Estampa 1. Nesse dia lhe fizemos inoculação de 1,5 cc. da suspensão da sua própria retrocultura, proveniente da biópsia de 25-5-50. No dia seguinte o animal denunciava grande sofrimento e recusou alimento; no 2.º dia apresentou um intenso eritema difuso em toda a cara, o qual persistiu durante 15 dias. À 26 de outubro apresentava um nódulo secundário no sobrolho esquerdo, semelhante a leproma, e estando cicatrizadas as feridas das biópsias, foi inoculado com 2 cc. da emulsão da cultura "CI", retrocultura do rhesus n.º 5, passagem do rhesus n.º 4, somente nas regiões malares. Após 48 hs. apresentava EG muito abalado e eritema difuso em toda a cara. Muito significativo foi o resultado do exame histopatológico da biópsia de 1.º-11-50 (P.C. 16.783) dum nódulo secundário e de outro de nova infecção. O relatório feito pelo Dr. J. P. Guimarães e controlado pelo Dr. Magarinos Torres (8-12-50) diz em Nota final: «*O quadro histológico apresenta pontos de contacto com a reação leprótica, tipo lepromatoso, descrita em material humano.*» As 5ª e 6ª reinoculações e biópsias não ofereceram mais nada tão importante quanto o que se lê acima.

RHESUS N.º 5 — Inoculado a 25-5-50 nos sobrolhos e regiões malares com 2cc. de suspensão dum tumor do rhesus n.º 4, infectado com a cultura "CI", cuja baciloscopia foi positiva 3 +, somente no 20.º dia (14-6) mostrou o inicio de nodulações cutâneas. No dia 20-6 foi extirpado o tumor do sobrolho direito, cujos esfregaços revelaram bacilos a.a.r. fortemente fluorescentes e cuja sementeira produziu boa retrocultura. Re-inoculado, nesse dia, com a retrocultura do rhesus n.º 4 originária do rhesus n.º 2, nas mesmas regiões acima, o animal reagiu moderadamente e sementeiras de pus de um dos seus nódulos, feitas a 28-6, a 8-7 começaram a germinar. Com esta sua retrocultura foi re-inoculado no dia 11-8, apresentando, no dia seguinte reação mais intensa que as anteriores, quando também o seu muco nasal foi positivo à baciloscopia e fluoroscopia.

A 26-10 e 20-12 sofreu este macaco mais duas re-inoculações, cujos resultados foram idênticos aos anteriores, porém a 6.ª inoculação, feita a 25-4-51 com a cultura "Maria D." (retrocultura da "CI"), na dose de 1,5 cc., foi a que lhe produziu as mais violentas reações. A 22-5 o símio apresentava vários nódulos secundários, quando foi exibido aos médicos da Secção de Bacteriologia e em seguida biopsiado. Do exame histológico feito pelo Dr. J. P. Guimarães (P.C. 17.071 de 1-6-51) consta granuloma com predominância de macrófagos, algumas células gigantes e leucócitos eosinófilos. Depois dum repouso de 3 meses, no Biotério Geral, foi o rhesus reinoculado a 14-8 com a mesma retrocultura "Ma. D.", apresentando intensa reação local no dia seguinte. A 28-8 foram-lhe extirpados dois nódulos, da frente e face direita para bacteriologia. O exame histopatológico dum desses nódulos feito pela Dra. Rita Cardoso (P.C. 17.352 de 11-9-51), revelou granuloma com células epitelióides e células gigantes do tipo Langhans, facto de alta importância no tipo de lesão estudada.

Em dezembro de 1954 as retroculturas obtidas deste rhesus, assim como os cortes e esfregaços da fase experimental, apresentavam os mesmos caracteres primitivos.

RHESUS Nº 6 — Tendo verificado que a cultura «Maria D.» era bastante virulenta para o rhesus, inoculei 1,5 cc. dela neste exemplar n.º 6, fêmea adulta, virgem de qualquer experiência anterior, com o fito especial de produzir lepromas para o fabrico de Lepromina. Feitas injeções de 0,5 cc. na fronte e regiões malares a 5-11-51, no dia seguinte já eram vistos grandes nódulos agudos nos três pontos injectados. No 10.º dia (14-11) foram extirpados êsses 3 nódulos, (V. fig. 28, Est. 6) cujos esfregaços foram fortemente positivos para bacilos a.a.r. isolados e em globias intra e extracelulares e feito exame histopatológico (P.C. 17.537).

Com os outros dois nódulos preparei 20 cc. de Lepromina pelo método de Fumio Hayashi, a qual foi empregada em seres humanos, comparativamente com as Leprominas Hansen e Stefansky, de que darei informes noutro trabalho. No 62.º dia da inoculação extirpei o nódulo residual da fronte do macaco, cujo esfregaço foi negativo para bacilos a.a.r., assim como os cortes (P.C. 17.608, de 23-1-52).

Cerca de 42 meses após a biópsia, re-examinei os cortes do P.C. 17.537: os corados pela HE mostram granulomas em que predominam os macrófagos, e os corados pelo ZN (surpreendentemente bem conservada a coloração!) mostram granulomas peçados de bacilos a.a.r., isolados, em feixes e em globias tanto extra como intracelulares, em macrófagos e leucócitos polimorfocelulares. Estes cortes comparados com os lepromas humanos, flóridos, são indistinguíveis.

RHESUS n. 7 — Este macaco, que servira ao Dr. Henrique Penna para estudos da febre amarela, foi inoculado a 23-4-52 com a cultura de «Jesus» (retrocultura de lesão experimental nele produzida pela inoculação da "CII"), sendo 0,5 cc. da emulsão injectada na fronte e iguais doses nas faces e sob o mamilo direito (pele muito pelada). 4 hs. após as injeções o animal, apesar de grande e forte, pesando 5 kg, apresentou-se muito caído e com intensa inchação na cara e 48 hs. depois havia, nos pontos inoculados da cara, três nódulos avermelhados, do tamanho de grãos de milho. Na 2.ª semana (7-5) havia no peito um empastamento de 2 cms. de diametro e na cara 3 nódulos do tamanho de avelãs, que extirpei duas metades do da fronte e da face direita para bacteriologia, histologia e passagens. Os esfregaços desses nódulos, corados pelo ZN, revelaram bacilos a.a.r. gigantes e granulosos, e de um deles obtive excelente retrocultura. O exame histopatológico (P.C. 17.815) revelou um granuloma igual aos anteriormente descritos com predominância de células plasmáticas, gigantes e grandes células mononucleares vacuoladas, muitas encerrando bacilos a.a.r. Com êste rhesus encerrei esta série de experiências.

*Cebus fatuellus* ns. 1 e 2 — O Dr. Henrique Penna cedeu-me, gentilmente, um casal de *Cebus* para as minhas experiências. Apesar de serem macacos de pele negra e peluda, de difícil observação, inoculei-os a 26-10-50 cada um com 1 cc. do *inoculum* "CI". Dois meses após, o macho apre-



sentava um nódulo discreto na fronte e a fêmea nada. A 5-1-51 re-inoculei-os e a 8-1-51 a baciloscopia das fezes de ambos revelou muitos bacilos a.a.r. A 25-1-51 extirpei o nódulo frontal do macho, cujos esfregaços revelaram abundantes bacilos, isolados e em globias, intra e extra-celulares, assim como os cortes histológicos (P.C. 16.905). Tais cortes corados pelo ZN são tão ricos em bacilos quanto os do rhesus n. 6. O *Cebus* fêmea não reagiu e sacrificado no 110º dia da 1ª inoculação, todos os exames da sua pele, ganglios e visceras deram resultados negativos.

### CONCLUSÕES

1. A inoculação de culturas de bacilos a.a.r. isolados de leprosos produziu na pele glabra de rhesus lesões nodulares semelhantes a lepromas, sem se generalizarem ao tegumento peludo nem às visceras, não obstante a procóce eliminação dos bacilos pelas fezes e pelo muco nasal.

2. A histopatologia desses nódulos mostrou, algumas vezes, estrutura lepromatosa, seguida de tuberculoide nas re-inoculações, o que prova um certo grau de imunidade.

3. Das lesões primárias os bacilos foram sempre re-isolados, sendo tais retroculturas de regra mais virulentas para os símios que as suspensões dos respectivos tumores.

### PROTÓCOLOS DAS EXPERIÊNCIAS

RHESUS N° 2. Macho de 4 meses de idade, pesando 2,5 kg.

22-3-50. 1.ª Inoculação: 1,5 c.c. de cultura em caldo glicerinado a 5%, de 29-12-49, da amostra "Chaves", (velha de 80 dias) em partes iguais na fronte e regiões malares, igual dose em cada região malar, por via subcutanea. Esfregaço do *inoculum* + + +. Sõmente bacilos ácido-álcool resistentes.

23-3-50. 24 hs. depois: grande reação local, sobretudo na fronte, apresentando-se o animal muito agitado.

24-3-50. O animal continúa muito agitado, aparentando grande sofrimento. Nodulação aguda em cada ponto da inoculação.

25-3-50. O animal está mais calmo. O nódulo da face direita é o maior.

29-3-50. O animal já se alimenta melhor e os nódulos regrediram.

1-4-50. O nódulo da fronte é o mais acentuado.

5-4-50. 14.º dia da inoculação. O animal, apresentando grandes tumores faciais, foi mostrado aos Drs. Magarinos Torres e Arêa Leão e fotografado. A' palpação os nódulos da fronte e face direita apresentam-se duros, do tamanho duma azeitona comum. A pele da face cianótica. O nódulo da face esquerda está achatado, de 2x1 cm de diâmetro, e 1 cm abaixo há um nódulo secundário, cianótico, de aspecto de um leproma humano flórido. No dia 8 os nódulos estavam maiores.

10-4-50. 19º dia da inoculação: 2ª fotografia. 1ª *Biópsia* — Tumor da face direita. Esfregaço + + + Parte do tumor foi tratada e semeada em vários tubos de Loewenstein e o resto foi enviado ao Dr. Magarinos Torres, para exame histopatológico.

P.C. 16.398, de 12-4-50: Pele de macaco "Rhesus" inoculado há 19 dias com a cultura Chaves: "O derma mostra extensa reação inflamatória, na qual tomam parte dominante, grandes células monocleares (macrófagos), por vezes com vacuolos no citoplasma. Em diversas áreas são encontrados, ainda, leucócitos heterófilos (inflamação purulenta). Nos pontos em que o exsudado é constituído de modo quase exclusivo por macrófagos, nota-se a presença de bacilos ácido-álcool resistentes, contudo, em pequeno número. Uma seme-

lhança microscópica notada entre o presente granuloma e o leproma do homem, são os seus limites nítidos, seguindo-se à zona do granuloma típico uma outra em que o derma conserva estrutura normal. A descrição feita acima, aplica-se aos dois fragmentos enviados.

Manguinhos, 12 de abril de 1950. *Dr. C. B. Magarinos Torres*, Chefe da Divisão de Patologia."

13-4-50. 22.º dia da inoculação. 2.ª *Biópsia* — Feita pelo Dr. Murillo Fontes, usando a Novocaina como anestésico. Foram extirpados dois nódulos da fronte e um da face esquerda. A suspensão de dois desses nódulos foi inoculada no Rhesus n.º 4 e uma parte dela tratada pela soda e semeada em 12 tubos de Loewenstein. O esfregaço do sangue das biópses, corado pelo Ziehl-Neelsen, revelou poucos bacilos a.a.r. Fragmentos da pele circundante desses tumores foram enviados ao Dr. Magarinos Torres, para exame histopatológico.

P.C. 16.406, de 15-4-50. Fragmentos de pele do M. rhesus n.º 2, inoculado em 22-3 com a cultura "Chaves": "O fragmento está revestido por epitélio pavimentoso estratificado, sem particularidades. Profundamente situado no derma, existe um grande nódulo bem circunscrito, constituído por células mononucleares, algumas de citoplasma vacuolado, células fusiformes e linfócitos. Ocasionalmente, notam-se polimorfonucleares. A pesquisa revelou escassos bastonetes ácido-álcool resistentes.

Rio, 20 de dezembro de 1950 — *Dr. Jorge P. Guimarães*".

14-4-50. O animal se ressentiu muito com a biópsia; está comendo pouco, melhorando no dia seguinte.

29-4-50. As feridas estão cicatrizadas. Na região malar esquerda restam dois pequenos nódulos residuais.

29-4-50. 2.ª *Inoculação*, após 5 semanas da primeira, na fronte e face direita, com emulsão, pobre em bacilos, de pus da lesão facial do Rhesus n. 3, inoculado com a cultura "Emilia".

1-5-50. Ausência de reação local. Nalguns tubos de Loewenstein, semeados a 10 e 14-4 com material deste Rhesus (n.º 2), começaram a germinar colônias amarelas, semelhantes à da amostra «Chaves» inoculada. No 5º dia da re-inoculação apareceram crescências na fronte e face direita. 10-5. Dos 12 tubos de Loewenstein semeados em 14-4 sete apresentam germinação com aspecto da cultura original inoculada.

12-5-50. Exame: à vista e à palpação verificou-se a existência de dois lepromas nítidos, do tamanho dum grão de milho, nos sobrólhos, e na face direita ligeiro empastamento. Ao retirar o símio da gaiola ele feriu-se na antiga cicatriz da face esquerda, cujo esfregaço revelou alguns bacilos a.a.r.

13-5-50. A inchação da face direita está tomando o aspecto de nódulo; queda de pelos em redor dos nódulos frontais.

5-6-50. Franca regressão das lesões acima. 20-6-50. O animal aparenta aspecto normal.

20-6-50. 3.ª *Inoculação*, suspensão da retrocultura "Emilia" de 12-6, do Rhesus n. 3 Dose 0,5 c.c. na fronte e iguais nas regiões malares.

21-6-50. O animal apresenta-se muito doente. A reação local foi muito violenta. Ainda a 23-6 o animal apresentava grande abatimento, inapetência e tristeza. As inoculações produziram grandes nódulos, cianóticos. 26-6. Foram tomadas novas fotografias.

29-6-50. Persistem os 4 nódulos, 2 na fronte e 2 nas faces, do tamanho duma avelã, congestos. O estado geral (EG) do animal melhorou. O patologista Dr. Jorge P. Guimarães viu os 3 rhesus inoculados.

30-6-50. O Dr. Arthur Marques Porto, do Serviço de Leprosia do Distrito Federal, veio ver êsses três Rhesus, com facies leprosa.

5-7-50. 3ª *Biópsia* — O Dr. Vianna Dias anestesiou o símio com DIAL Ciba, na dose de 0,5 c.c. por kg. O animal dormiu durante 2 hs. Biopsiei 4 nódulos ulcerados, dando dois ao Dr. Arthur Marques, para os seus estudos. Com pus *in natura* e suspensão do tumor semeei 15 tubos de Loewenstein. O esfregaço do pus de cada lesão revelou muitos bacilos a.a.r. semelhantes aos da amostra "Chaves", alguns ramificados, cuja fluorescência, verificada pelo Dr. Laerte Andrade, foi positiva. Do nódulo enviado à Divisão de Patologia veio o seguinte resultado:

P.C. 16.559, 6-7-50. Fragmento de pele do macaco rhesus inoculado com a cultura "Emilia".

"O fragmento é revestido por epitélio pavimentoso estratificado, que mostra, em certa altura, destruição e infiltração por leucócitos polimorfonucleares e fibrina (ulceração). No



derma existe um infiltrado celular inflamatório difuso, constituído predominantemente por linfócitos e células mononucleares, algumas de citoplasma vacuolado. Notam-se, ainda, células fusiformes e leucócitos polimorfocelulares. Chama a atenção a presença de hemorragia. A pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes, resultou negativa.

Rio, 20 de dezembro de 1950. — *Dr. Jorge P. Guimarães*”.

17-7-50. 4.<sup>a</sup> *Biópsia* — Extirpação dum nódulo residual da fronte e de pele da axila, enviados à Secção de Anatomia Patologica, para exame. As fezes eliminadas pelo animal durante a biópsia revelaram alguns bacilos a.a.r. P.C. 16.600 de 17-7-50. Fragmento de pele da fronte (nódulo) do Rhesus n. 2, inoculado com a cultura “Emilia”.

“O fragmento é revestido pela epiderme aparentemente normal. No hipoderma aparecem diversos nódulos que correspondem a um processo inflamatório peculiar. As células que o formam, são fundamentalmente grandes, mononucleadas, cujo citoplasma parece continuar-se com fibras, estabelecendo ligações recíprocas entre elas; em outros pontos, tais elementos são obscurecidos em razão da presença de grânulos intensamente corados pela hematoxilina (área de necrose com cariorrexis) ao nível destes focos, existe acentuada ectasia dos capilares e hemorragia. Ausência de bacilos a.a.r.

Manguinhos, 8 de agosto de 1950 — *Dr. Jorge P. Guimarães*.”

P.C. 16.601 data: 17-7-50. Fragmento de lesão ulcerada da axila do Rhesus n. 2 inoculado com a cultura “Emilia”.

“O fragmento compreende músculo estriado e abundante tecido conjuntivo, fibroso, no qual se nota processo inflamatório crônico. A proliferação de fibrócitos e de fibras colágenas, predomina sobre a infiltração celular. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes.

Manguinhos, 10 de agosto de 1950 — *Dr. Jorge P. Guimarães*.”

10-8-50. Exame do animal: Magro, gânglios impalpáveis, alopecia completa da cauda. O exame do muco nasal, pelo Z-N foi positivo: ++

10-8-50. 4.<sup>a</sup> *Inoculação*, 1,5 c.c. de emulsão da própria cultura do animal, obtida de pus tratado pela soda a 7-7, na raiz do nariz e nas regiões malares.

11-8-50. Reação local intensa, com notável inchaço nos três pontos inoculados. O EG do animal é bom e ele está se alimentando regularmente.

12-8-50. O EG do símio é bom apesar da nodulação aguda nos pontos inoculados. A 20-8 os nódulos estavam maiores e se ulcerando.

1-9-50. Todos os três nódulos estão em regressão. O animal foi sangrado, obtendo-se 5 c.c. de sangue para os estudos do Dr. Nicanor Botafogo.

10-10-50. O EG do animal é bom e a pele está cicatrizada.

20-10-50. O símio apresenta aparência normal: 70.<sup>o</sup> dia da 4.<sup>a</sup> inoculação. 5.<sup>a</sup> *Inoculação*, 2 c.c. de suspensão da retrocultura “Emilia” obtida de rato branco sacrificado a 10-7-50, nos sobrôlhos e regiões malares.

21-10-50. O animal apresenta a cara toda inchada e cianótica e parece sofrer muito. A 24-10 a reação local está mais intensa e já há nodulação nos quatro pontos injectados. Foi tomada fotografia.

26-10-50. O animal apresenta o EG melhor, porém os nódulos maiores.

30-10-50. Apresenta dois grandes nódulos agudos nos sobrôlhos, outro na face esquerda e extensos empastamentos em ambas as regiões malares.

3-11-50. As lesões cutâneas aumentaram. A 7-11 foi tomada nova fotografia. O exame do pus que saiu das lesões revelou-se fortemente positivo para bacilos a.a.r. intra e extracelulares idênticos aos da amostra “Chaves I”, Parece que a passagem da cultura “Emilia” pelo rato aumentou a sua virulência.

8-11-50. 5.<sup>a</sup> *Biópsia*. Foram extirpados, sem anestesia, três nódulos, sendo dois da fronte e um da região malar direita. O esfregaço do pus revelou muitos bacilos a.a.r. intra e extracelulares e o esfregaço da pele em muito menor número. Um nódulo foi tratado para sementeiras, que deram, como de costume, retrocultura. A Secção de Anatomia Patológica mandei três fragmentos de nódulos, cujo exame se lê no P.C. 16.792 de 9-11-50. Fragmento de pele do Rhesus reinoculado em 20-10-50 com a cultura “Emilia”.

“Os preparados microscópicos mostram a epiderme sem alterações dignas de nota. Em toda a extensão do derma, existe um granuloma inflamatório sob a forma de infiltrados nodulares, constituídos predominantemente por células fusiformes (células epitelioides?) e linfócitos, esboçando uma disposição folicular. Nódulos de maiores dimensões mostram

a zona central necrótica e infiltrado por polimorfonucleares. Pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes, negativa.

Rio, 11 de dezembro de 1950 — *Dr. Jorge P. Guimarães.*”

Infelizmente o melhor material dessa 5.<sup>a</sup> Biópsia não foi aproveitado e é extranhavel a ausência de bacilos nos córtex quando os havia em grande abundância nos esfregaços. Diz o relatório acima que foi examinado “um fregmento de pele”, e não o nódulo simulando leproma.

10-11-50. 6.<sup>a</sup> Biópsia somente para bacteriologia.

20-11-50. Colhido pus e examinado, revelou-se positivo ++. Foi tratado e semeado.

20-12-50. Persistem os grandes tumores da face e surgiram placas de alopecia na cabeça e pelo corpo. Semeado um tubo de Loewenstein, com pus escasso mas ainda positivo para bacilos a.a.r. No dia 26 o animal permanecia no mesmo estado.

5-1-51. Ao biopsiar um nódulo secundário da face esquerda do símio, que durou muitos dias e simulava leproma, verifiquei estar o mesmo em regressão. Uma punção do grande tumor da face direita deu abundante pus caseoso, cujo esfregaço corado pelo Z-N revelou raros bacilos. A 26-1 foi colhida nova amostra de pus, que foi tratado pela soda e semeado em 4 tubos de Loewenstein.

1-2-51. O animal foi fotografado de novo. Nova punção do tumor da face direita deu abundante pus caseoso, cujo esfregaço foi fracamente positivo, apesar disso foi o material tratado e semeado em Loewenstein.

10-2-51. Dois tubos de Loewenstein das últimas sementeiras mostram várias colônias amarelas, circulares e esparsas, as quais a 19-2 estavam bem desenvolvidas e com aspecto de pureza.

19-2-51. Colhidas duas amostras de pus, que foram tratadas separadamente e sementeiras em 4 tubos de Loewenstein e 3 de caldo glicerinado.

26-2-51. Nova biópsia da lesão da face direita para bacteriologia. O animal foi transferido para o Biotério Geral.

4-4-51. O símio foi de novo trazido para o laboratório em bom EG e com as lesões residuais da cara bastante atenuadas. Permaneceu em repouso por mais 20 dias, perfazendo 56.

25-4-51. 6.<sup>a</sup> Inoculação — Com 1,5 cc. de suspensão da cultura “Emilia”, 2.<sup>a</sup> geração de 4-1-51, re-inoculei o animal em dois pontos da fronte e nas regiões malares. No dia seguinte apresentava reação intensa.

28-4-51. Apresenta nodulação franca e a pele rubra.

3-5-51. Nova fotografia. 7.<sup>a</sup> Biópsia — Material enviado ao Dr. M. Torres. 2.<sup>a</sup> Sangria: 3 cc. para o Dr. Julio Muniz. Pus *in natura* semeado em 4 tubos de Loewenstein. Esfregaços corados pelo Z-N e Fontes, positivos. P.C. 17.040 de 3-5-51. Fragmento de tumor do Rhesus inoculado a 25-4-51 com a sua própria retrocultura da amostra “Emilia”. “Os preparados microscópicos mostram, em um ponto, solução de continuidade da epiderme (ulceração). No derma e hipoderma existe intensa infiltração celular inflamatória, constituída por grandes células mononucleares (macrófagos) por vezes de citoplasma vacuolizado e leucócitos poliformonucleares, estes últimos em alguns campos se acumulam formando micro-abcessos. Os vasos da região estão dilatados e congestos. Nota-se, ainda, áreas de edema e pequenos focos de hemorragia. Presença de bastonetes ácido-álcool resistentes.

Rio, 29 de maio de 1951. *Dr. Jorge P. Guimarães.*”

9-5-51. Nova biópsia para bacteriologia, de nódulo da face direita. Exame de fezes positivo para bacilos a.a.r. Houve germinação em várias sementeiras.

22-5-51. 8.<sup>a</sup> Biópsia — Extirpação de nódulos do sobrolho e face do lado esquerdo. Parte do material foi utilizada em sementeiras e parte remetida à Secção de Anatomia Patológica.

P.C. 17.072 de 23-5-51. Fragmento de lesão da face esquerda do Rhesus n. 2, inoculado a 25-4-51 com suspensão da cultura “Emilia” de 4-1-51. Resultado do exame: “Os preparados microscópicos mostram, em um ponto, solução de continuidade da epiderme (ulceração). No derma e hipoderme existe um infiltrado celular inflamatório, constituído predominantemente por grandes células mononucleares (macrófagos) frequentemente de citoplasma vacuolizado, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Os vasos da região estão dilatados e congestos, e são frequentes focos de hemorragias. Áreas circunscritas de necrose são também observadas. Não foram vistos bacilos ácido-álcool resistentes.

Rio, 1 de junho de 1951. *Dr. Jorge P. Guimarães.*”



O animal foi remetido para o Biotério Geral para repouso e engórda.

14-8-51. Voltou para o laboratório, em excelente E.G.

7.<sup>a</sup> Inoculação, 1 cm<sup>3</sup> de suspensão da retrocultura "Emilia" do Rhesus n. 3, de Loewenstein de 22-5-50, injectado na fronte e regiões malares.

15-8-51. O animal está deprimido e recusando alimento; apresenta inchaço e eritema em toda a cara. No dia seguinte o eritema regrediu e começou a nodulação nos pontos das injecções. A 17-8 essas nodulações tinham o tamanho de azeitonas medianas.

21-8-51. O nódulo da raiz do nariz é o maior e o da face direita supurou. Na face esquerda se formaram dois nódulos, sendo um pequeno, no angulo do olho, parecendo secundário.

24-8-51. O nódulo da fronte está maior e íntegro; os dois das faces estão regredindo, e o nódulo secundário do angulo externo do olho esquerdo cresceu um pouco.

28-8-51. 9.<sup>a</sup> Biópsia — Foram extirpados 3 nódulos, um da fronte e dois das regiões malares. Como hemostático se usou pó de café torrado, que é excelente. O pus que saiu foi semeado *in natura* em dois tubos de Loewenstein e a sua baciloscopia foi positiva, fracamente. As fezes do animal colhidas na ocasião revelaram poucos bacilos. Do fragmento da biópsia remetida à Secção de Anatomia Patológica consta: P.C. 17.351 de 29-8-51. Fragmento de pele do Rhesus inoculado a 14-8 com cultura "Emilia" (retrocultura do Rhesus n. 3). Resultado: «Infiltração do derma por agrupamento de grandes células mononucleares, dotadas de citoplasma abundante e de forma variavel, às vezes formando um reticulo. Ao lado dessas células, as quais constituem maioria e têm a morfologia de células epitelioides, notam-se linfócitos, alguns leucócitos polimorfonucleares e raras células gigantes. Epiderme sem alterações. Ausencia de bacilos ácido-álcool resistentes, nos cortes examinados.

Rio, 11 de setembro de 1951 — *Dra. Rita Alves de Almeida Cardoso.*"

11-9-51. As lesões da cara do símio estão quase cicatrizadas. Restam um nódulo na face esquerda e outro menor, secundário, no angulo externo do olho direito.

15-10-51. Exame das fezes negativo para b.a.a.r. O animal apresenta apenas um nódulo residual na face esquerda e foi devolvido ao Biotério Geral para repouso, engórda e posterior utilização para outros fins.

Dezembro, 1954 — Cerca de 50 meses após as experiências, os esfregaços do muco nasal do rhesus 2, da pele da cara do rhesus 4, passagem da infecção do rhesus 2 e do *inoculum* (Cultura «E»), corados pelo Z-N em 10-8-49, 25-5 e 7-7-1950 estavam inalterados, apresentando os bacilos a.a.r. isolados, em feixes, intra e extracelulares. Também estavam inalterados os cortes histológicos das lesões, corados pela H-E.

RHESUS N.º 3 — Macho de 4 meses. 13-4-50. 1.<sup>a</sup> Inoculação: 2 c.c. de suspensão da cultura "Emilia" em meio de Loewenstein, de 1-4-50: 12 dias de idade, nos sobrólhos e regiões malares.

17-4-50. Inflamação nodular nos pontos das inoculações.

20-4-50. 8.<sup>o</sup> dia: Inflamação mais intensa, de coloração avermelhada, simulando uma lepra lepromatosa L3.

24-4-50. 11.<sup>o</sup> dia: Ao ser laçado o símio, para ser fotografado, arrebentaram-se três tumores da face. Com pipeta estirada colhi pus, que semei, *in natura*, em 3 tubos de Loewenstein. Outra porção, após tratamento pela soda a 10%, semei em 5 tubos do mesmo meio. Os esfregaços desse material, corados pelo Z-N, assemelham-se a esfregaços de emulsão de leproma. O exame das suas fezes revelou alguns bacilos a.a.r. Os esfregaços do pus do muco nasal e das fezes, examinados no dia 25-4 pelo Dr. Laerte de Andrade, foram positivos à fluoroscopia.

25-4-50. 12.<sup>o</sup> dia: O símio continua, apesar da aspiração de pus de três tumores, simulando uma cara lepromatosa L3. (Vide fotos 13 e 14, Estampa 2).

28-4-50. 15.<sup>o</sup> dia: O símio foi decapitado pelo Dr. Murillo Fontes para se conservar a peça no muséu de patologia. Fragmentos de tumor e de visceras, e gânglios, foram enviados ao Dr. Magarinos Torres para o exame histopatológico. Os esfregaços do pus revelaram abundantes b.a.a.r., enquanto que os da pele e dos gânglios, raros.

PP. CC. de 28-4-50. Rhesus N.º 3. Natureza e origem do tecido: P.C. 16.429: Fragmento de pele da face, em que havia grande tumor; gânglios inguiniais e axilares, e testiculos. P.C. 16.430: Fígado, baço, rim e pulmão. Observação: Rhesus inoculado em 13-4-50 com emulsão de cultura da leprosa Emilia. Resultado do exame anátomo-patológico: "Fragmento de pele (compreendendo a lesão referida na informação). Nota-se um

processo inflamatório agudo purulento-hemorrágico, associado à destruição da epiderme (ulceração). Presença de bacilos ácido-álcool resistentes, no exsudato inflamatório. O exame das vísceras, revela hiperemia do fígado e rins, conservando o baço a estrutura normal.

*Resumo:* O animal apresenta um processo agudo hemorrágico-purulento na lesão cutânea associada à presença de bacilos ácido-álcool resistentes. Não existe granuloma semelhante leproma. Ausência de lesão inflamatória nas vísceras examinadas. Manguinhos, 25 de maio de 1950 — *Dr. Jorge P. Guimarães.*"

29-4-50. O pus colhido nos tumores e a suspensão de triturado da pele, foram tratados e semeados em 12 tubos de Loewenstein, um de batata e outro de caldo glicerinados. Os esfregaços foram ++, assim como a fluoroscopia do pus, verificada pelo Dr. Laerte. Tais esfregaços re-examinados 15 dias após (11/5) ainda estavam fluorescentes. 11-5. Alguns tubos de Loewenstein semeados com o pus germinaram, produzindo colônias amarelas. Esta retrocultura foi posteriormente inoculada no Rhesus N.º 2 (14-8-51).

28-5-50. *Necropsia:* Extirpação dum fragmento de pele da lesão frontal da peça conservada durante 30 dias no líquido de Kayserling e enviado à Seção de Anatomia Patológica.

P.C. 16.480 de 30-5-50. Fragmento de pele da cara do Rhesus N.º 3. Resultado do exame anátomo-patológico: "Os preparados compreendem epiderme que não mostra lesões dignas de nota. Na parte profunda do derma, existe extenso processo inflamatório, que parece ter sido apanhado pela biópsia em apenas uma de suas margens. Chama a atenção, nesta zona, a existência de grandes células mononucleares com o citoplasma vacuolado. O retículo interposto entre os vacúolos, cora-se em azul pela hematoxilina. Entre esta extensa área inflamatória profunda da epiderme, nota-se infiltração peri-vascular (linfócitos e macrófagos) no plexo subpapilar. Presença de bacilos ácido-álcool resistentes.

*Resumo:* Verificamos a existência de extenso processo inflamatório no derma, em cujas margens existem numerosos macrófagos vacuolados com morfologia que lembra a da célula leprosa. Manguinhos, 5 de junho de 1950. — *Dr. Jorge P. Guimarães.*"

Em 15-7-1954, ou sejam cerca de 51 meses de conservação do material (cabeça) do Rhesus N.º 3, em líquido de Kayserling, cortei dois fragmentos das bordas de duas lesões faciais, cujos esfregaços revelaram abundantes bacilos a.a.r. Remeti esse material à Seção de Anatomia Patológica para estudo.

P.C. 19.156 de 15-7-54. Pele da face e da frente de macaco Rhesus inoculado com lepra pelo Dr. Souza-Araujo. Observação: Conservado durante muito tempo em Kayserling. Resultado: "Os cortes de pele mostram a estrutura histológica bem conservada, bem como os tecidos estão excelentemente corados pela hematoxilina-eosina. No tecido celular subcutâneo existe um grande abscesso mal delimitado contendo leucócitos em desintegração e tecidos necrosados. Presença de bacilos ácido-álcool resistentes nos cortes corados pelo Ziehl. — Rio, 1.º de outubro de 1954. — *Dr. Eitel Duarte.*"

A 30 de dezembro de 1954 re-examinamos o esfregaço do inoculum deste Rhesus (13-4-50) corado pelo Z-N, apresentando massas bem coradas de bacilos finos a.a.r.; os esfregaços de pele e pus da cara corados a 28-4-50 pelo ZN, apresentando bacilos grandes e granulósos bem corados; esfregaço da sua retrocultura corado a 20-6-50 apresentando bacilos de aspecto normal. Novos cortes feitos a 30-12-54 do bloco P.C. 16.480 (fragmento da peça do museu, extirpado a 30-5-50) corados pelo HE apresentam, segundo o Dr. Eitel Duarte, a estrutura de granuloma tuberculoide, e corados pelo ZN apresentam, além de massas fucsínófilas, inúmeros bacilos g.g.v. livres e intracelulares por todo o corte, excepto na epiderme.

RHESUS N.º 4, macho de 1 ano de idade, com 4 kgs.

13-4-50, 1.ª inoculação: 3 c.c. de emulsão de 2 nódulos de Rhesus, 2, inoculado a 22-3 com a cultura "Chaves I" e biopsiado hoje. Essa emulsão tinha poucos bacilos. 1.ª Passagem.

17-4-50, Aparentemente nenhuma reação.

20-4-50. Até hoje, nada. Mudado do biotério para o laboratório.

1 a 12-5 — Nada aparente, nem à palpação.

12-5-50. 2.ª inoculação: 2 c.c. de emulsão da retrocultura "Chaves I" obtida dos nódulos do Rhesus 2, da biópsia de 13-4, sendo 1 c.c. nos sobrôlhos e 1 c.c. nas regiões malares.



13-5-50. Tumefação nos 4 pontos inoculados. O animal está bocejando, repetidamente, o que não fazia antes; está triste e inapetente.

23-5-50. 12.<sup>o</sup> dia: Apresenta 2 nódulos nos sobrôlho, dos quais um ulcerado, e outro, bastante maior, em cada face. Colhi pus do nódulo da face direita e fiz dois esfregaços, num deles o Dr. Laerte verificou fluoroscopia positiva tanto em bacilos isolados como em globias. O outro esfregaço, corado pelo Z-N, revelou campos com 3 células, com globias. Os exames das fêzes pelo Z-N + e do muco nasal ++. O pus foi semeado *in natura* e tratado pela soda em 8 tubos de Loewenstein. Vide a foto do dia 23-5, n.<sup>o</sup> 19, Est. 4.

25-5-50. 1.<sup>a</sup> biópsia: Mediante anestesia geral por injeção na veia safena esquerda de 3,5 c.c. da seguinte fórmula: morfina 4,0; Hidrato de cloral 80,0 e água destilada 400,0 g. O animal dormiu profundamente e o Dr. Murillo Fontes extirpou-lhe os 2 grandes tumores malares (foto n. 20), para bacteriologia e inoculações. Os esfregaços do pus e do tumor, foram fortemente positivos: +++.

Foram tratados pela soda a 10% o sangue da ferida, o pus e o triturado dum fragmento do tumor, e semeados 3 tubos de Loewenstein com o sangue, 6 com o pus e 6 com o sedimento do tumor. Fragmento dos 2 tumores foram encaminhados ao Dr. M. Torres, para exame histopatológico.

P.C. n.<sup>o</sup> 16.476, de 25-5-50: Fragmento de pele do Rhesus n.<sup>o</sup> 4 inoculado em 12-5, com emulsão de cultura "Chaves".

Resultado do exame anátomo-patológico: "Os fragmentos compreendem a epiderme que não apresenta modificações dignas de nota. Na parte profunda do edema, existe processo inflamatório extenso, no qual aparecem vasos sanguíneos (arteríolas e capilares) regularmente distribuídos, sem indício de nova formação recente. As células do exsudato inflamatório, são predominantemente mononucleares. Em certos campos estão associadas a linfócitos e polimorfonucleares e ainda, em outros campos, predominam os polimorfonucleares (inflamação fibrino-purulenta) por vezes associados a extravasamento de hemátias (inflamação purulenta hemorrágica). Ausência de células gigantes e de necrose de caseificação. Pesquisa positiva de bacilos ácido-álcool resistentes.

Resumo: Verificamos um processo inflamatório com características peculiares devidas à sua constituição por células que são predominantemente macrófagos e a tendência para supuração e hemorragia em áreas circunscritas. O quadro histológico não corresponde estritamente ao do granuloma da lepra observado no homem. — Manguinhos, 7 de junho de 1950. — Dr. Jorge P. Guimarães.»

Quando o animal despertou arrancou e comeu os curativos.

1-6-50. 2.<sup>a</sup> biópsia: nódulo da fronte para o Dr. Jorge.

O esfregaço do pus da lesão foi +. Foi feito curativo das feridas da 1.<sup>a</sup> biópsia. O animal arranca frequentemente as crostas das lesões e as come. Germinação nos 3 tubos de Loewenstein semeados com pus *in natura* a 23-5 e outros 3 semeados com pus-soda (nestes a germinação é pobre). O animal continua com grandes ulcerações na face.

10-6-50. 15.<sup>o</sup> dia de biópsia: surgiram 2 nódulos secundários na fronte e asa, direita do nariz, do tamanho duma lentilha, semelhantes a lepromas. As úlceras estão custando a cicatrizar. O animal come tudo quanto arranca das úlceras.

14-6-50. No sobrolho direito continua a crescer uma nodulação.

20-6-50. As úlceras estão quase cicatrizadas.

22-6-50. Os nódulos secundários estacionaram.

10-8-50. Exame do muco nasal: +++ . V. desenho 5, Estampa 1. Cicatrizes lisas; pele de aspecto normal; gânglios impalpáveis. Regrediram todas as lesões.

10-8-50. 3.<sup>a</sup> Inoculação: 1,5 cc. da emulsão da sua própria retrocultura: da biópsia de 25-5, na raiz e regiões malares.

11-8-50. Aparência de sofrimento; recusando comida, inclusive goiabada de que muito gosta.

12-8-50. Eritema difuso em toda a face. Estado geral melhor. Essa inflamação durou 15 dias; supuração ocular vários dias; ulceração na face direita e sobrolho esquerdo.

1-9-50. O nódulo do sobrolho esquerdo ulcerou. Exame do pus +. Apareceu um nódulo secundário no sobrolho direito. Baciloscopia da ulceração da face direita: + e do muco +. 1.<sup>a</sup> Sangria: 5 cc. para o Dr. Botafogo.

30-9-50. Está completamente curado das lesões e biópsias.

26-10-50. Apresenta 4 cm. acima do olho esquerdo um nódulo secundário, aspecto lepromatoso, do tamanho dum avelã. 4.<sup>a</sup> Inoculação: 2 cc. de emulsão da cultura «CI» obtida do Rhesus n. 5 (passagem do 2 e do 4), de 11-8-50, somente nas faces.

27-10-50. Estado geral abalado. Apresenta intenso eritema em toda a face.

1-11-50. 3.<sup>a</sup> biópsia: nódulos da fronte (o secundário) e da face esquerda. Pús da face: + aspecto «CI». Sangue da biópsia +.

P.C. N.º 16.783 — 1-11-50 Fragmento de pele do Rhesus n.º 4. Resultado do exame anátomo-patológico: O material enviado, compreende 2 fragmentos:

1.º *fragmento* — A epiderme não mostra alterações dignas de nota. Profundamente situado no derma, existe um grande nódulo constituído por células fusiformes (células epitelióides?) e linfócitos, associados a leucócitos polimorfonucleares. A parte central do nódulo mostra necrose e hemorragia.

2.º *fragmento* — A epiderme não mostra alterações dignas de nota. Em toda a extensão do derma, notam-se infiltrados nodulares de limites mais ou menos bem nítidos, semelhante, em sua histologia, o nódulo descrito anteriormente. São constituídos por células mononucleares com citoplasma vacuolado, células fusiformes, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Nota-se, ainda, congestão e edema no derma. Pesquisa de bacilos a.a.r., positiva.

*Nota* — O quadro histológico apresenta pontos de contacto com a reação leprotica, tipo lepromatoso, descrita em material humano. (Revisão do resultado anterior (10-11-50) sob orientação do Dr. Torres). — Rio, 8 de dezembro de 1950. — Dr. Jorge P. Guimarães.

20-12-50. Exame: cicatriz perfeita das biópsias; persistem nodulações na fronte. 5.<sup>a</sup> Inoculação: 2 cc. de emulsão da retrocultura «Jesus» (CII), de 24-10 *in natura* sendo 0,5 cc. na raiz do nariz e 1,5 nas regiões malares. O símio está muito magro e apresenta alopecia no trem posterior e no dorso. 21-12 Muito caído; não quiz comer nem mesmo biscoito doce, pelo que é louco. Toda a cara avermelhada, sem nodulação; eritema intenso difuso. 22-12. Continua o mau estado geral. Cara sempre vermelha; início de nodulação.

23-12-50. Ainda em estado de grande sofrimento; não liga à comida.

26-12-50. Apresenta 3 grandes nódulos na fronte e faces, com centro supurado. Estado geral melhor.

5-1-51. Persistem 3 grandes nódulos, 1 na raiz do nariz e 2 nas faces, estes ulcerados. Estado geral bom. 9-1 No mesmo estado.

16-1-51. Exame do pús +, outro esfregaço ++ e feixes de bacilos a.a.r. com a morfologia da cultura «CI». Semeados 2 tubos de Loewenstein com o pús *in natura*. Transferido para o biotério geral por estar muito magro.

4-4-51. Voltou para o laboratório, peludo e sadio.

25-4-51. Reexaminado: pele completamente curada, 125 dias após a 5.<sup>a</sup> inoculação. 6.<sup>a</sup> Inoculação: 1,5 cc. de emulsão da sua própria retrocultura (CI), semeada a 25-10-50, sendo partes iguais nos sobrolhos e nas faces.

26-4-51. Reação moderada. 28-4 Nodulação incipiente.

30-4-51. Erisipela em toda a face: inflamação purulenta no olho direito.

7-5-51. Os 4 pontos inoculados ulceraram. Continua com aspecto erisipelatoso.

9-5-51. Face purulenta, esfregaço de pús +; semeado num tubo de Loewenstein. Sangrado para o Dr. Muniz.

4.<sup>a</sup> biópsia: nódulo do sobrolho direito para o Dr. Jorge. P.C. N.º 17.051, 10-5-51: Nódulo do sobrolho direito do Rhesus n. 4, inoculado a 25-4 com emulsão de sua própria cultura «CI». Resultado do exame anátomo-patológico: "Os preparados microscópicos mostram, situadas profundamente na hipoderme, áreas de necrose em cujo centro notam-se ainda, vasos sanguíneos. Estas áreas estão muito próximas e são circundadas por leucócitos polimorfonucleares. Mais na periferia veem-se grandes células mononucleares (macrófagos), linfócitos e células plasmáticas, de mistura com os polimorfonucleares. A pesquisa de bacilos ácido-álcool resistentes, resultou negativa. — Rio, 29 de maio de 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães».

23-5-51. 5.<sup>a</sup> biópsia: do nódulo secundário do sobrolho esquerdo e asa do nariz. Esfregaços desse nódulo e do muco nasal, negativos.

PP. CC. 17.081-82 de 23-5-51: Fragmento do nódulo sobrolho esquerdo e fragmento da asa do nariz do Rhesus n. 4, inoculado a 25-4 com a sua própria cultura (Retrocultura «Chaves I»).



Resultado do exame anátomo-patológico: 17.081: — Os preparados mostram no derma e hipoderme, um infiltrado celular inflamatório, constituído, predominantemente, por grandes células mononucleares (macrófagos), frequentemente de citoplasma vacuolizado e linfócitos, notando-se, ainda, abundantes leucócitos polimorfonucleares. Veem-se, também, hemorragias e células plasmáticas. Não foram encontrados bacilos ácido-álcool resistentes.

17-082 — Os preparados microscópicos mostram, no derma e hipoderme, um infiltrado celular inflamatório, constituído por grandes células mononucleares (macrófagos), linfócitos e leucócitos polimorfonucleares, notando-se, também, células plasmáticas. Em alguns pontos do fragmento vêem-se hemorragias. Ocasionalmente, vêem-se leucócitos eosinófilos. Não foram encontrados bacilos ácido-álcool resistentes. — Rio, 6 de junho de 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães».

Este Rhesus foi transferido para o Biotério Geral onde fecundou a sua companheira de laboratório, "Sofia" e morreu 1 ano após. O re-exame dos esfregaços e cortes de lesões deste rhesus, feito a 30-12-54, confirmou a presença de bacilos a.a.r. perfeitamente corados, assim também os esfregaços da cultura obtida de camundongo branco infectado com pús de lesão deste rhesus, em junho e julho de 1950.

RHESUS N.º 5. Fêmea jovem, muito brava. 25-5-50. 1.<sup>a</sup> Inoculação: 2 c.c. de emulsão do tumor do Rhesus n.º 4, produzido pela inoculação da cultura "Chaves I", da biópsia desta data, sendo 0,5 cc. em cada face e em cada sobrolho. Baciloscopia da suspensão: +++.

26-5-50. 1.º exame do símio, com o Dr. Arthur Marques: notámos ligeiras excrescências.

10-6-50. Aparentemente nada importante. O animal está amañando-se.

14-6-50. 20.º dia da inoculação: estão se formando nódulos na face esquerda e sobrolho direito.

20-6-50. Biópsia da lesão do sobrolho direito, cujo esfregaço corado pelo Z-N revelou bacilos a.a.r. fragmentados. Fluoroscopia +. Semeaduras +.

2.<sup>a</sup> Inoculação: 2 c.c. de emulsão da retrocultura do pus do Rhesus N.º 4 inoculado com a retrocultura original de 23-5 do Rhesus n. 2, nos sobrôlhos e faces. A fluoroscopia dessa emulsão foi positiva.

21-6-50. O animal não mostra reacção notável.

23-6-50. Apareceram nódulos no sobrolho esquerdo e regiões malares.

26-6-50. O símio foi fotografado. 28-6 Os nódulos cederam um pouco. O esfregaço de pus dos mesmos revelou bacilos a.a.r. e globias. Tratado o pus pela soda foi semeado em 10 tubos de Loewenstein.

30-6-50. Novo exame do símio com o Dr. Arthur Marques.

5-7-50. Nova fotografia da cara do animal. 8-7 Em vários tubos de Loewenstein surgiram colónias amarelas.

11-8-50. Cuidadoso exame do animal não revelou gânglios hipertrofiados, nem lesões cutâneas; os nódulos da face estão quase desaparecidos.

3.<sup>a</sup> Inoculação: 1,5 c.c. de suspensão da sua própria cultura de 28-6 (passagens dos Rhesus 2 e 4), sempre na pele da cara. O exame do *inoculum* estava fortemente positivo para b.a.a.r. granuloso.

12-8-50. O animal apresenta nódulos agudos nos pontos das inoculações. Colhido seu muco nasal, corado pelo Z-N foi positivo. Fluoroscopia: +

1-9-50. O animal apresenta cianóse geral na face, com nódulos em regressão, e um grande, integro no sobrolho direito e foi sangrado, obtendo-se 5 c.c. de sangue para os estudos do Dr. Botafogo Gonçalves.

30-9-50. Aparentemente o animal está curado.

26-10-50. 4.<sup>a</sup> Inoculação: 2 cc. da suspensão em sôro fisiológico da sua própria retrocultura ("CI"), de 11-8-50, originária da 2.<sup>a</sup> inoculação. Injectadas partes iguais nas faces e sobrôlhos. 27-10 Nódulos agudos nos 4 pontos da inoculação.

30-10-50. O animal foi fotografado. Esfregaço de pús da face direita, corado pelo Z-N, foi ++. Esse pús foi semeado, *in natura*, em 3 tubos de Loewenstein. 3-11 As lesões progrediram muito, mas o símio está esperto.

7-11-50. Nova fotografia das lesões. Colhido pús das lesões a sua baciloscopia mostrou bacilos idênticos aos da cultura "CI". Esse pús foi semeado, e a 30-11 começou a germinar.

8-11-50. Dois nódulos biopsiados dos sobrôlhos, apresentando o aspecto de lepromas humanos, foram enviados ao Dr. Jorge Guimarães para exame:

P. C. N.º 16.973 de 8-11-50: Fragmento de pele do Rhesus n.º 5, reinoculado em 26-10-50. Resultado do exame anátomo-patológico: "Os preparados microscópicos mostram a epiderme sem alterações dignas de nota. No derma existe um granuloma inflamatório constituído de grande nódulo formado por células mononucleares de citoplasma vacuolado, células fusiformes e linfócitos. É intensa a infiltração por leucócitos polimorfonucleares, muitos com cariorrexis e a zona central do nódulo, correspondendo ao bordo do preparado, mostra necrose e hemorragia. Pesquisa de bacilos a.a.r., negativa. — Rio, 11 de dezembro de 1950. Dr. Jorge P. Guimarães."

12-12-50. A sementeira de 7-11 apresenta germinação amarela-punctiforme, sobre toda a superfície do meio de Loewenstein.

20-12-50. Restam pequenas nodulações na fronte.

5.ª Inoculação: 0,8 c.c. da suspensão da cultura "L" do doente 16 Mirueira, Recife (de 13-10-50). Essa cultura foi obtida de lesão produzida em cicatriz de Leprominoreação, d'aí a designação «L», no braço esquerdo do paciente, em cuja coxa direita inoculei a cultura "Emilia", viva.

21-12-50. Reação local intensa; um grande nódulo na face. E.G. regular.

23-12-50. Tornou-se mais intensa a reação local; nódulos maiores. E.G. bom.

26-12-50. Apresenta um grande nódulo pustuloso em cada face. Baciloscopia nas fezes ++, assim como a fluoroscopia.

5-1-51. Apresenta dois grandes nódulos nas regiões malares, o do lado direito já ulcerado. As lesões da fronte estão cicatrizando.

14-2-51. Restam pequeninos nódulos na fronte e um maior na face direita.

26-2-51. Biópsia do nódulo da face direita. Removido para o biotério geral.

4-4-51. Voltou para o laboratório em bom EG. e com as lesões cicatrizadas.

25-4-51. Exame geral do símio: apresenta a pele da face atrofiada e cianótica e alopecia em redor da cara toda.

6.ª Inoculação: 1,5 cc. de suspensão da cultura "Chaves I" (retrocultura de Maria Domingas) de 4-1-51, nas faces e sobrôlhos.

26-4-51. Reacção local pouco intensa. A 28-4 nodulação mais accentuada.

3-5-51. O símio foi fotografado de frente e de perfil com grande sucesso. O pus colhido num nódulo, cuja baciloscopia foi ++, semeiei, *in natura*, em 3 tubos de Loewenstein e 1 de caldo glicerinado.

4-5-51. Biópsia do nódulo da face direita para bacteriologia.

5-5-51. Extirpação dos nódulos da face esquerda e sobrolho e de nódulos secundários, cujos esfregaços foram +++ e por isso remetidos ao Dr. M. Torres.

No mesmo dia o animal foi sangrado, obtendo-se 5 cc. para o Dr. Muniz.

P.C. n. 17.052 de 10-5-51. Fragmentos de nódulos da face esquerda do Rhesus n.º 5, Chiquita, inoculado a 25-4 com cultura de "Maria Domingas" (retrocultura da amostra Chaves I). Resultado do exame anátomo-patológico: "Os fragmentos mostram, em alguns pontos, solução de continuidade da epiderma (ulceração). No derma e hipoderme, existe infiltração celular inflamatória, constituída de grandes células mononucleares (macrófagos) e leucócitos polimorfonucleares. Em alguns campos estes últimos predominam, formando micro-abcessos. Os vasos da região estão moderadamente dilatados e congestos. Notam-se, ainda, pequenos focos de hemorragias. Presença de raros bastonetes ácido-álcool resistentes. — Rio, 30 de maio de 1951. — Dr. Jorge Guimarães".

P.C. 17.053 de 10-5-51. Nódulo secundário do Rhesus Chiquita, inoculado a 25-4 com cultura de "Maria Domingas". Resultado do exame anátomo-patológico: "O fragmento mostra, em um ponto, solução de continuidade da epiderme (ulceração). No derma e hipoderme, existe infiltração celular inflamatória, constituída por grandes células mononucleares (macrófagos) e leucócitos polimorfonucleares, predominando os primeiros. Notam-se, ainda, linfócitos e células plasmáticas. Presença de bastonetes e granulações ácido-álcool resistentes. — Rio, 30 de maio de 1951. Dr. Jorge P. Guimarães."

22-5-51. Apresenta vários nódulos secundários na face direita. Mostrei o símio aos Drs. Genésio Pacheco, Gobert Costa e Laerte de Andrade. Em seguida extirpei dois nódulos e os remeti ao Dr. Jorge Guimarães para exame.



PP. CC. de 23-5-51. 17.070 e 17.071. Material do Rhesus n. 5 (Chiquita) inoculado com cultura "Maria Domingas" a 25-4-51.

P.C. 17.070. Fragmento de pele do ponto de inoculação. Resultado do exame:

"Os preparadões microscópicos mostram a epiderme ulcerada em um ponto. No derma existe um infiltrado inflamatório, constituído por grandes células mononucleares (macrófagos), frequentemente de citoplasma vacuolado, linfócitos e polimorfonucleares. Estes últimos formam, por vezes, micro-abcessos. Situada profundamente na hipoderme, vê-se uma área de hemorragia. Não foram encontrados bacilos ácido-álcool resistentes.

P.C. 17.071. Fragmento de pele (nódulo secundário). "Os preparadões microscópicos mostram a epiderme sem alterações. No derma e hipoderme, existem infiltrados celulares, mais ou menos bem circunscritos, constituídos, predominantemente, por grandes células mononucleares (macrófagos) frequentemente com citoplasma vacuolizado, notando-se, ainda, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. No derma os infiltrados se dispõem, de preferência, junto a folículos pilosos e glândulas sebáceas. Leucócitos eosinófilos e células gigantes, são ocasionalmente vistos. Não foram encontrados bacilos ácido-álcool resistentes. — Rio, 1 de junho de 1951. Dr. Jorge P. Guimarães."

14-8-51. Depois de um repouso de cerca de 3 meses, no Biotério Geral, o símio foi trazido de novo para o laboratório, apresentando apenas lesões residuais na fronte e regiões malares.

7.<sup>a</sup> Inoculação: 1,5 c.c. de suspensão da mesma retrocultura de "Maria Domingas", de 4-1-51 (procedente de caldo lactosado de 1-8-50), injectado, em partes iguais na fronte e regiões malares.

15-8-51. Intensa reacção local, com nodulação, nos três pontos injectados.

16-8-51. Os nódulos têm o tamanho de grãos de milho.

17-8-51. Os nódulos estão mais condensados.

21-8-51. Os três nódulos estão do tamanho duma azeitona mediana, supurando.

24-8-51. Os três nódulos continuam supurando.

28-8-51. Extirpei o nódulo da fronte e o da face direita. O pus obtido na ocasião, que se revelou positivo para b.a.a.r., foi semeado, *in natura*, em 2 tubos de Loewenstein. A pele foi enviada à Secção de Anatomia Patológica para exame.

P.C. 17.352, de 29-8-51. Fragmento de pele do Rhesus n. 5 (Chiquita), inoculado a 14-8 com cultura "Maria Domingas". Resultado do exame anátomo-patológico:

"Presença, no derma e hipoderma, de infiltração celular inflamatória descontínua, vendo-se grande número de leucócitos polimorfonucleares, os quais são mais abundantes nas porções mais profundas do derma e no hipoderma; ao lado dos leucócitos, encontram-se grandes células mononucleares, de forma variada e de citoplasma abundante (Células Epitelioides) e células gigantes do tipo Langhans. Epiderme sem alterações. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes, nos cortes examinados. — Rio, 11 de setembro de 1951. Dra. Rita Alves de Almeida Cardoso."

1-9-51. A cicatrização das feridas das biópsias foi rápida por termos usado como hemostático pó de café torrado. O símio apresenta dois pequenos nódulos secundários no angulo externo do olho direito.

11-9-51. Persistem êsses nódulos. 19-9. Melhor aspecto. A baciloscopia das fezes do animal foi negativa e o Rhesus foi devolvido ao Biotério Geral para futura utilização noutros fins.

RHESUS N.º 6 (Femea adulta). 5-11-51 — Inoculado com 1,5 cc. de emulsão da cultura "Maria Domingues" em Loewenstein, de 2-6-51, sendo 0,5 cc. na fronte e igual dose em cada face e na virilha direita, todas as injeções por via sub-cutânea, visando a produção de nódulos para o fabrico de Lepromina.

6-11-51. Apresenta nódulos agudos nos três pontos inoculados. Estado geral aparentemente bom.

13-11-51. Os três nódulos da face estão maiores, endurecidos e o da fronte com pustula central.

14-11-51. 10.º dia da inoculação. Foram tomadas fotografias de cada lado da face e em seguida extirpados os três nódulos, que também foram fotografados. Os esfregaços desses nódulos, corados pelo Z-N se mostraram fortemente positivos: Bacilos a.a.r. isolados, em globias extra e intracelulares, e massas. Bacilos gigantes, granulados e vacuolados: g.g.v. Do nódulo pustuloso da frente foi semeado pus, *in natura*, em 2 tubos de Loewenstein, que germinaram, no devido tempo. Um tumor foi enviado à Dra. RITA CARDOSO para histopatologia e com o restante foram fabricados 20 cc. de *Leptomina* para aplicação no homem.

P.C. 17.537, 14-11-51. Rhesus n.º 6. Fragmento de tumor da face. Observação: O animal foi inoculado em 5-11 com cultura "Maria Domingas".

Resultado do exame anátomo-patológico: "Processo inflamatório agudo purulento extenso, associado à presença de células mononucleares volumosas, contendo notável quantidade de bacilos ácido-álcool resistentes. Estes germes também são encontrados no citoplasma de leucócitos polimorfonucleares. — Rio, 23 de janeiro de 1952. Dra. Rita A. A. Cardoso.

15-11-51. Esfregaços de pus das feridas das biópsias, corados pelo Z-N e pelo "F", foram positivos. Tratado esse pus pela soda a 10%, foi o seu sedimento semeado em 4 tubos de Loewenstein, 1 de caldo e outro de batata glicerinados. Houve germinação mais ou menos extensa, idêntica à cultura original, tanto desse pus como da emulsão de tumor tratada pela soda a 17-11-51.

24-12-51. As feridas das biópsias estão cicatrizadas e o símio apresenta uma extensa nodulação secundária, de 1,5 cm. de extensão, no sobrolho direito.

4-1-52. 62.º dia da inoculação. As cicatrizes da face estão quase perfeitas. Extirpei o nódulo residual da frente, cujo esfregaço, corado pelo Z-N foi negativo. Esse material foi remetido à Secção de Anatomia Patológica, para estudo.

P.C. 17.608, 4-1-52. Rhesus n.º 6. Biópsia da pele. Animal inoculado há 60 dias com cultura «Maria Domingas». Resultado do exame anátomo-patológico: «Nos córtex corados pela hematoxilina-eosina, em ponto circunscrito, vê-se solução de continuidade da epiderme, a cujo nível existe acúmulo de leucócitos polimorfonucleares. Em continuidade com essa região (ponto de inoculação?), encontra-se zona de necrose do derma, associada à intensa infiltração por leucócitos polimorfonucleares. Em torno dessa zona, nota-se proliferação de fibrócitos e de vasos sanguíneos. Em focos isolados, aparecem grandes células mononucleares, dotadas de citoplasma abundante, muitas vezes vacuolado, no lado de linfócitos e leucócitos polimorfonucleares. Ausência de bacilos ácido-álcool resistentes nos córtex corados pelo método de Ziehl-Neelsen. — Rio, 23 de janeiro de 1952 — Dra. Rita A. A. Cardoso.»

10-1-52. O símio foi transferido para o biotério geral para engorda e posterior uso para outros fins.

RHESUS N.º 7 — Fêmea de 5 kg., número 5.030, cedido por Dr. Henrique Penna.

23-4-52. Inoculado com 2 c.c. de suspensão da cultura "Jesus" (retrocultura da amostra "Chaves II"), de Loewenstein de 1-2-52, sendo 0,5 cc. na frente e igual dose nas regiões malares e mamilo direito, todas por via subcutânea. A pele do peito é muito peluda. 4 horas após as injeções o animal se apresentou muito caído, com intensa inchação nos pontos inoculados. 48 hs. após apresentava na face 3 nodulos agudos, avermelhados e do tamanho de grãos de milho.

3-5-52. Nodulação franca nos 3 pontos da face, tumores de tamanho variando entre grão de feijão e de milho; face eritematosa e infiltrada. O animal foi mostrado hoje ao Prof. Dr. Mario Malfatti, de Buenos Aires.

7-5-52. Após exame e palpação das lesões o animal foi fotografado. Os nódulos da frente e das regiões malares têm o tamanho de avelãs. O eritema se amainou; os nódulos têm consistência dura. No peito, ao lado do mamilo direito a lesão consiste num empastamento duro, de 2 cm. de diâmetro.

7-5-52. Para estudo bacteriológico e histopatológico extirpei metade do nódulo da frente e do nódulo da face direita. Os esfregaços desse material, corados pelo Z-N, revelaram bacilos a.a.r. gigantes e granulados. Suspensões das duas amostras de tumores foram inoculadas em murideos. A emulsão tratada pela soda foi semeada em 5 tubos de Loewenstein e um de caldo glicerinado.



P.C. 17.815, 7-5-52: Rhesus n.º 7. Fragmento de tumor do lado direito da face. Animal inoculado a 23-4-52 com cultura "Jesus", sub-strain "Chaves II". Resultado do exame anátomo-patológico: "Intensa infiltração do derma e da hipoderma por linfócitos, células plasmáticas, células gigantes e, em maioria, grandes células mononucleares, de citoplasma vacuolado, muitas das quais encerram bacilos ácido-álcool resistentes, longos, vacuolados e granulados. Epiderme sem alterações importantes.

Rio, 28 de maio de 1952. *Dra. Rita A. A. Cardoso.*"

10-5-52. O tumor da face esquerda está maior e é formado por dois nódulos do tamanho duma avelã, avermelhados. As feridas das duas biópsias estão cobertas de crôstas.

15-5-52. Estão supurando os dois grandes nódulos da face esquerda e do peito, que não foram biopsiados. Colhido e semeado *in natura* esse pus no meio de Loewenstein, a 5-6-52 apresentava franca germinação em 3 tubos, de aspecto semelhante à cultura "Chaves II" original.

17-2-54. A cultura obtida da biópsia acima está ótima e foi repicada.

*Cebus fatuellus* N.º 1. Macho caréca, n.º 29.905 do Laboratório Rockefeller. 26-10-50 — Inoculado com 1 c.c. de suspensão em soro fisiológico da cultura "Chaves I", retrocultura do Rhesus n.º 4 e passagem do Rhesus n.º 2, original de 25-5-50. Injectado em partes iguais na fronte e regiões malares. Este símio apresenta a pele negra e peluda, de difícil observação. 20-12. Nascendo pelos na cabeça. Apresenta um nódulo na fronte e completa cicatrização dos pontos de inoculações nas faces.

5-1-51. Re-inoculado, nas mesmas regiões anteriores, com 1 cc. da mesma cultura acima.

8-1-51. Exame das fezes: positivo para bacilos a.a.r. Apresenta um nódulo do tamanho duma pequena azeitona no lado direito da fronte.

25-1-51. Biópsia do nódulo frontal, que apresenta o aspecto macroscópico de leproma, e mostra alopecia em redor. Metade do tumor e um fragmento de pele do peito (zona de alopecia) enviados à Secção de Anatomia Patológica para estudo. Os esfregaços do nódulo, corados pelo Z-N são ricos em b.a.a.r. e globias intra e extracelulares. Inúmeras células com globias. Nos esfregaços os bacilos afectam o tipo g.g.v. da cultura "Chaves I."

P.C. 16.905, 27-1-51. *Cebus* macho. Tumor da fronte e fragmento de pele da alopecia do peito. Observações: Animal inoculado a 26-10-50 e re-inoculado a 5-1-51 com a cultura "Chaves I", de Rhesus.

Resultado do exame anátomo-patológico: «Os preparados microscópicos mostram, em alguns pontos, solução de continuidade da epiderme (ulceração). No derma e hipoderma existe intensa infiltração celular inflamatória, constituída, predominantemente, por grandes células mononucleares (macrófagos) e leucócitos polimorfonucleares, assumindo estes últimos, frequentemente, uma disposição peri-vascular. Os vasos da região estão dilatados e congestos, e são vistos pequenos focos de hemorragia. Presença, em grande abundância, de bacilos ácido-álcool resistentes, principalmente intracelulares. Rio, 30 de maio de 1951. *Dr. Jorge P. Guimarães.*"

O triturado do tumor, semeado *in natura* a 21-1 a 29-1 estava contaminado.

A 13-2-51 foi sacrificado o *Cebus* para estudo das visceras. Não havia nada anormal.

*Cebus fatuellus* N.º 2. Fêmea N.º 29.907 do Laboratório Rockefeller. Cedido, como o 1.º, pelo Dr. Henrique Penna.

26-10-50. Inoculado com 1 c.c. de suspensão da cultura "Chaves I" passagens dos Rhesus 2 e 4, de 25-5-50, nas regiões malares; pele negra e peluda.

20-12-50. Até agora o animal não apresentou sinais de doença.

5-1-51. Foi re-inoculado com a mesma cultura na fronte e regiões malares, como sempre por via sub-cutânea.

8-1-51. Exame das fezes: positivo para bacilos a.a.r.

14-2-51. Sacrificada, mediante injeção de cloroformio nos pulmões. Necropsia: Cortados fragmentos de pele da fronte, face, ganglios axilares, crurais, inguinais e sub-maxilares, fragmentos dos pulmões, fígado, baço, pancreas, rim esquerdo e testículo esquerdo. Tudo negativo, no 110.º dia da 1.ª inoculação.

## LEPRA EXPERIMENTAL EM MACACOS

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

## ESTAMPA 1

Figs. 1 e 1a — Cultura «Chaves I» obtida em 1949 da pele do leproso J. L. Chaves.

Fig. 2 — Desenho de esfregaço de pele do Rhesus 2 inoculado com a cultura «Chaves I». Coloração pelo Ziehl-Neelsen, 25-5-50.

Fig. 3 — Esfregaço da retrocultura do Rhesus 2, corado pelo «Fontes».

Fig. 4 — Esfregaço de pus do tumor do Rhesus 4 (passagem da infecção do Rhesus 2). Biópsia de 25-5-50 e coloração pelo Z-N.

Fig. 5 — Esfregaço do muco nasal do Rhesus 4, em 10-8-50, após três meses de incubação. Tanto esse muco como as fezes do Rhesus 4 foram positivos à Fluoroscopia.

Fig. 6 — Esfregaço da retrocultura do Rhesus 4 (passagem da infecção do Rhesus 2), que serviu para infectar o Rhesus 5. Corado pelo Z-N.

Fig. 7 — Esfregaço de pus da lesão cutânea do Rhesus 5 (passagem da infecção do Rhesus 4), corado pelo Z-N, em 28-6-50.

Fig. 8 — Esfregaço da cultura «Emilia» que serviu para infectar o Rhesus 3, corado pelo Z-N.

Fig. 9 — Esfregaço da cultura «Emilia» corado pelo método de Fontes.

Fig. 10 — Esfregaço da cultura «Maria Domingas» (4a. retrocultura da amostra «Chaves I»), que serviu para infectar o Rhesus 6, em 5-11-51.

## EXPLANATION OF THE FIGURES

## PLATE N. 1

Figs. 1 and 1a — «Chaves I» strain obtained in 1949 from skin lesion of the leper J. L. Chaves.

Fig. 2 — Drawing of smear of skin lesion of Rhesus 2, inoculated with «Chaves I» strain, stained by Ziehl-Neelsen method, in 25-5-50.

Fig. 3 — Smear of the retroculture from Rhesus 2 stained by «Fontes».

Fig. 4 — Smear from pus of tumor of Rhesus 4 (passage from Rhesus 2 infection), biopsied in 25-5-50, stained by Z-N.

Fig. 5 — Smear from nasal mucus of Rhesus 4 (passage from Rhesus 2) on Aug. 10, 50, after 3 months incubation. Both nasal mucus and feces of this Rhesus 4 were positive to fluoroscopy.

Fig. 6 — Smear from retroculture of Rhesus 4 (passage from Rhesus 2), which was used to infect Rhesus 5. Stained by Z-N.

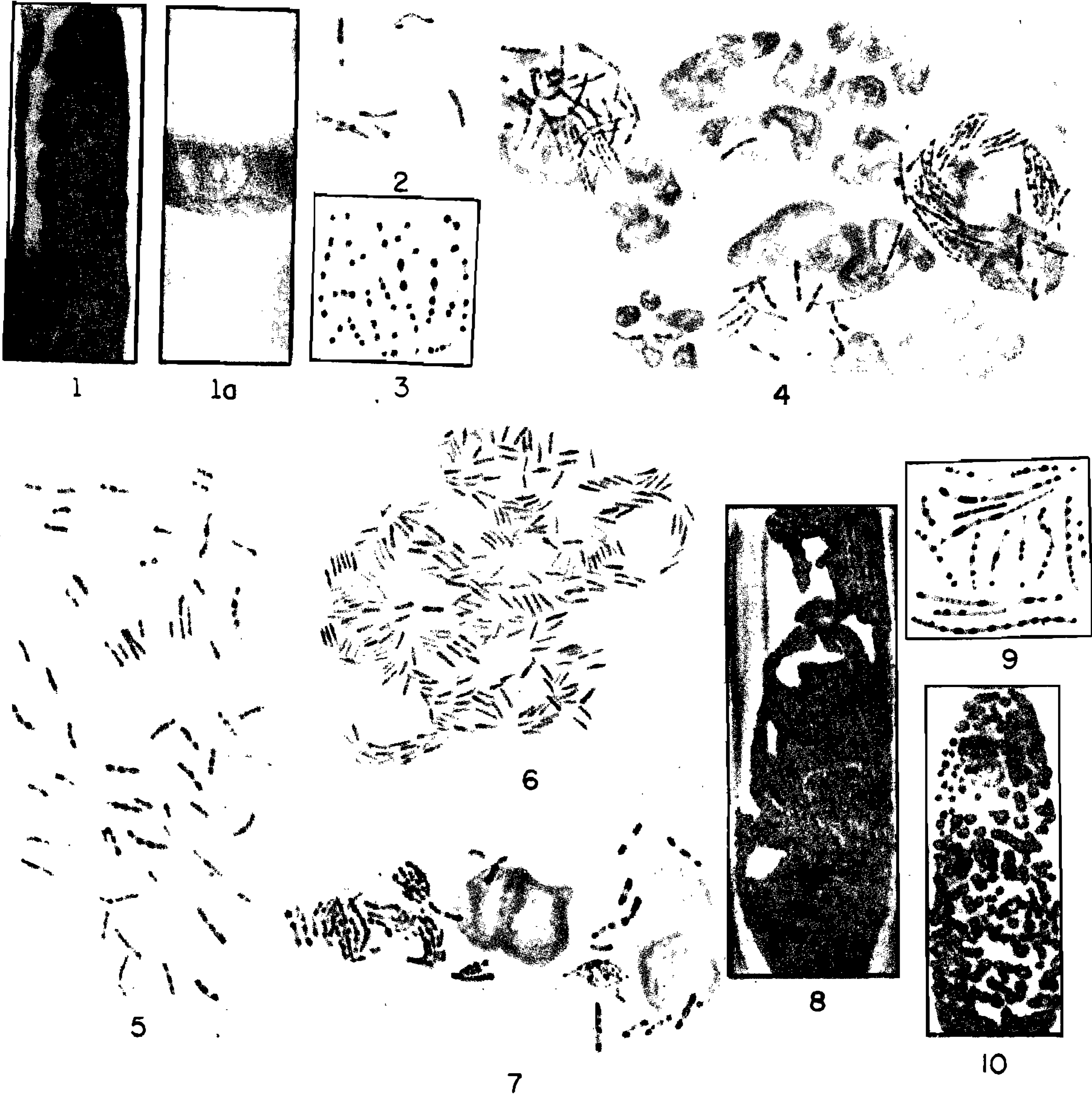
Fig. 7 — Smear of pus from cutaneous lesion of Rhesus 5 (passage from Rhesus 4 infection), stained by Z-N, on June 28th, 50.

Fig. 8 — Smear of «Emilia» strain culture which was used to infect the Rhesus 3, stained by Z-N.

Fig. 9 — Smear of the «Emilia» culture stained by «Fontes» method.

Fig. 10 — Smear of the «Maria Domingas» strain (4th retroculture from the «Chaves I» strain), which was used to infect Rhesus 6, on 5-11-51.



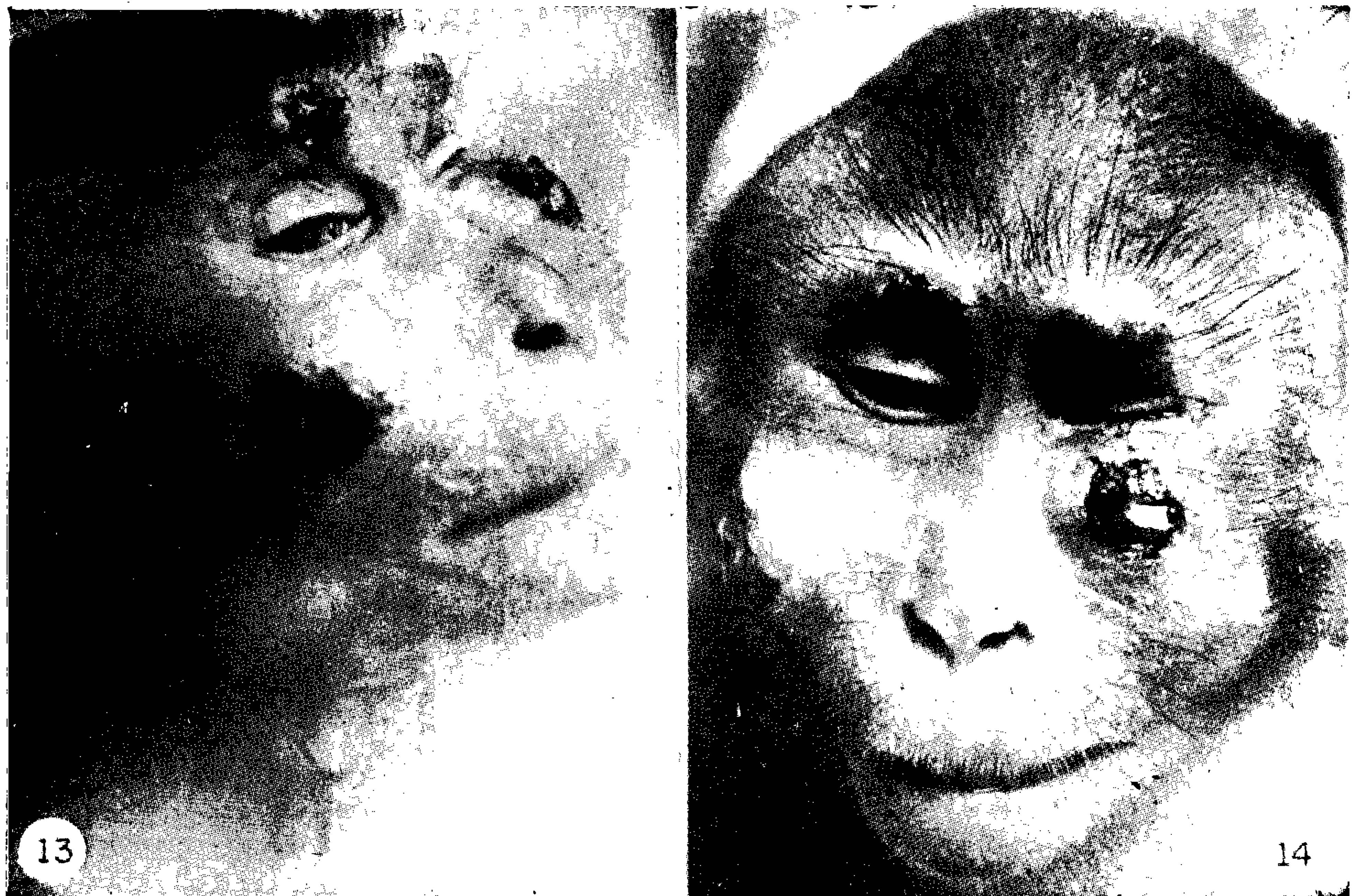






Fotos 11 e 12. Rhesus 2 infectado a 22-3-50 com a cultura «Chaves I». 14º dia de incubação. Com dois nódulos metastáticos. Da biópsia do 22º dia se obteve retrocultura.

Fotos 11 and 12. Rhesus 2 infected on March 22-50 with «Chaves I» strain, taken on 14th day incubation. Sec two metastatic nodules. From biopsy of April 13 (22th day) was obtained retroculture.



Fotos 13 e 14. Rhesus 3 inoculado a 13-4-50 com a cultura «Emilia», tomadas no 12º dia de incubação. Decapitado a 28-4-50.

Photos 13 and 14. Rhesus 3 inoculated on April 13-1950 with «Emilia» strain, taken on 12 day incubation. Decapited on April 28-50.



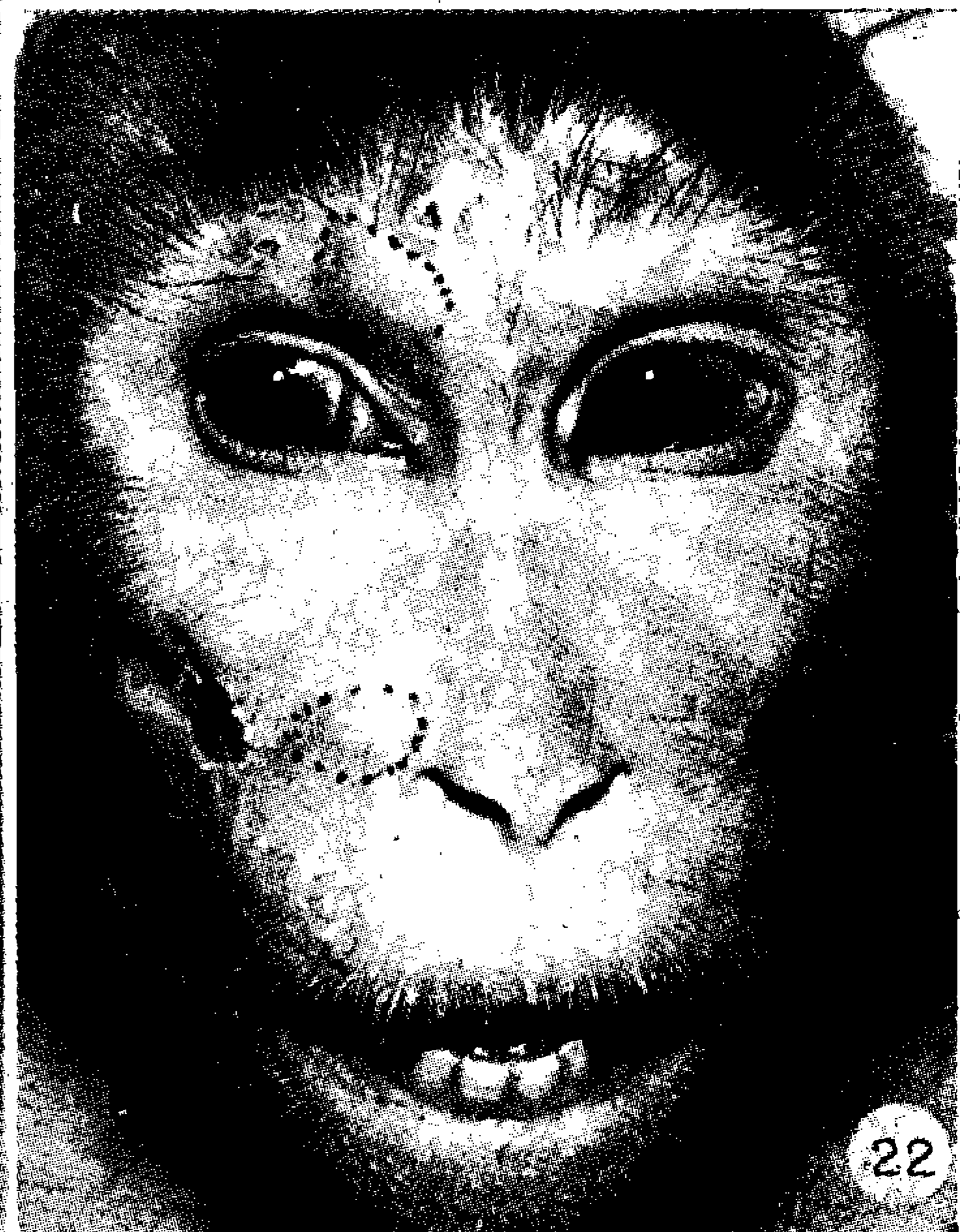


Fotos 15 e 16. Rhesus 2 (2ª fase) inoculado a 26-6-50 com a cultura «Emilia». Biópsia no 15º dia, a 5-7-50.  
 Foto 17. Rhesus 2 no 46º dia de incubação da infecção pela retrocultura de rato da amostra «Emilia».  
 Foto 18. O mesmo no 95º dia de incubação, cuja biópsia ainda deu retrocultura.

Photos 15 and 16. Rhesus 2 (2nd phase) on 15th day after inoculation with «Emilia» strain and after biopsy.  
 Photo 17. The same after 46 days of inoculation with retrocultura from rat infected with «Emilia» strain.  
 Photo 18. The same after 95 days incubation, when still gave retroculture.



## ESTAMPA 4



Fotos 19 e 20. Rhesus 4 infectado por passagem do Rhesus 2 no 13º dia de incubação (25-5-50), quando lhe foram extirpados os 3 tumores, que deram retrocultura idêntica à amostra «Chaves I».

Fotos 21 e 22. O Rhesus 4 no 7º e 15º dias após as biópsias. A foto 22 mostra 2 nódulos secundários.

Photos 19 and 20. Rhesus n. 4 infected by passage from Rhesus n. 2 at the 13th day of incubation (25-5-50) when where extirpated the three tumors, which gave subculture (Strain Chaves I).

Photos 21 and 22. Rhesus n. 4 and 15th days after biopsies. N. 22 chows two secondary nodules.





Fotos 23 a 25. Rhesus 5 inoculado com a cultura «Maria Domingas» (4ª retrocultura da Chaves I) a 25-4-51. Seu aspecto no 9º e 23º dias de incubação. O animal mostrou-se hipersensibilizado.

Photos N. 23 to 25. Rhesus n. 5 inoculated with «Maria Domingas» culture (4th retroculture from Chaves I). at 9th and 23th days of incubation. The monkey was hypersensitized.



Fotos 26 e 27. Rhesus 6 inoculado a 5-11-51 com a cultura «Maria Domingas», no 9º dia de incubação quando lhe foram extirpados os tumores para fabrico de lepromina.

Photos 26 and 27. Rhesus n. 6 inoculated on 5-11-51 with «Maria Domingas» strain, at 9th day incubation when its tumors were extirpated for preparation of Lepromin.



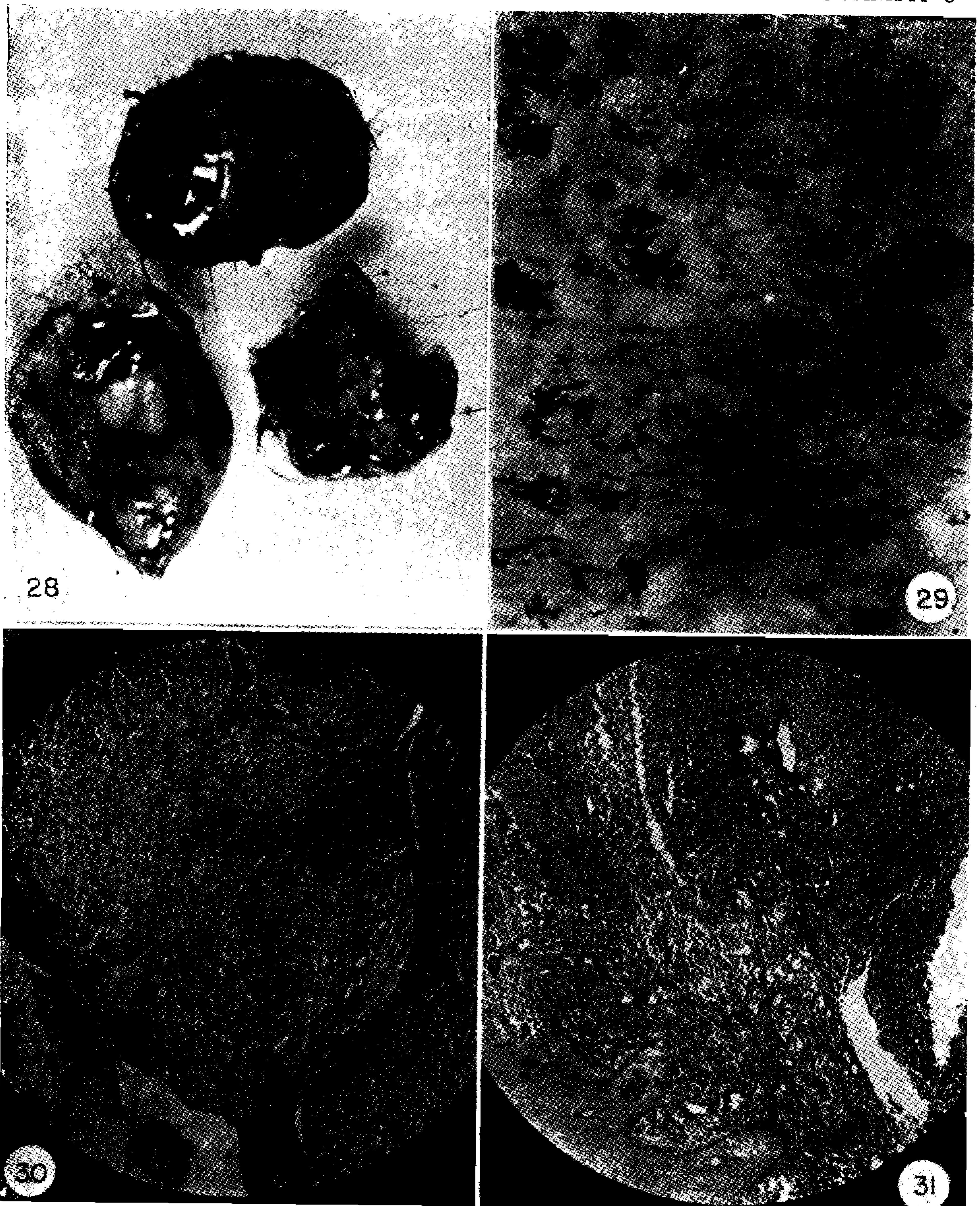
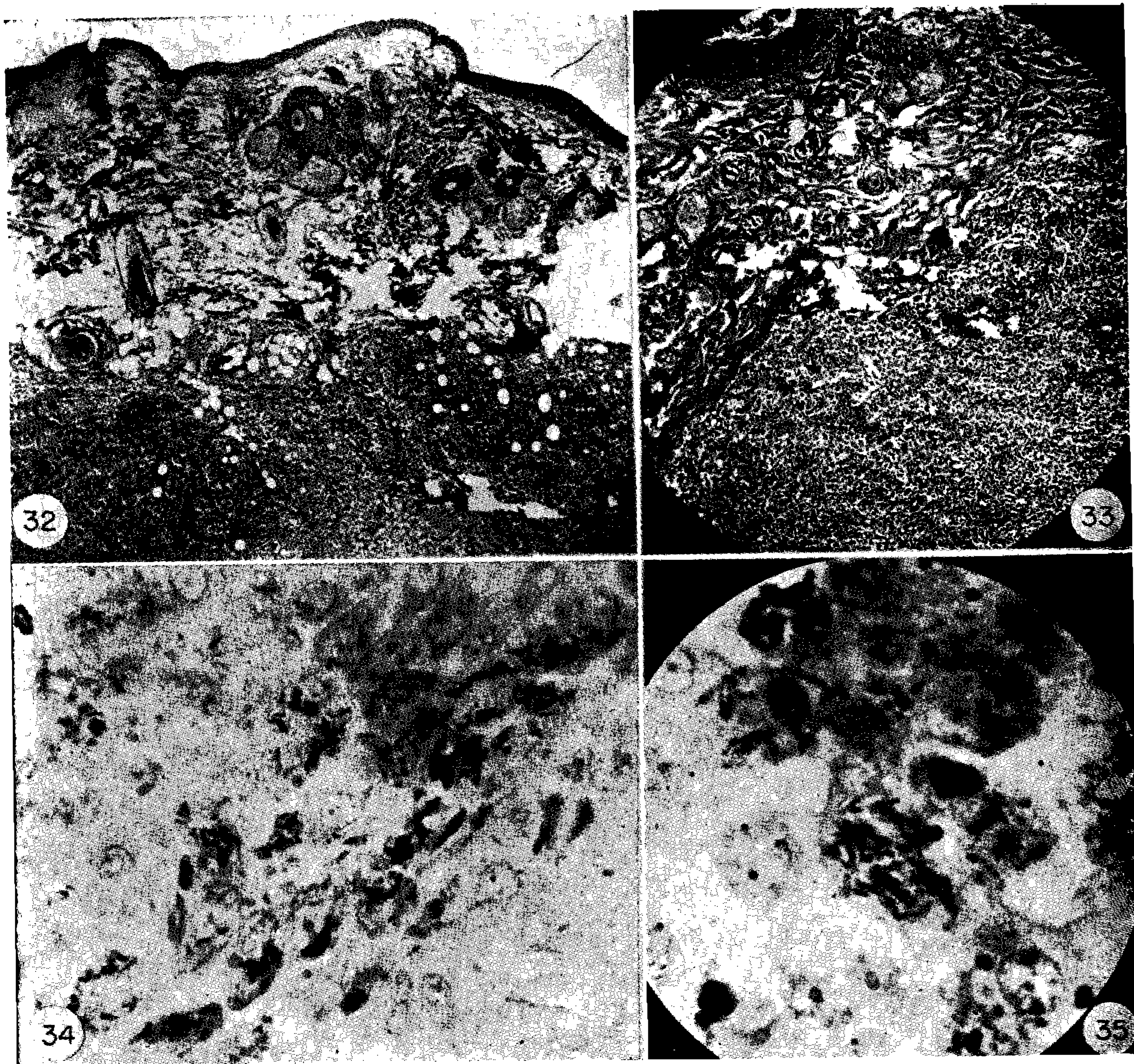


Foto 28. Tumores extirpados do Rhesus 6 a 14-11-51, utilizados no fabrico de Lepromina. Fotomicro 29. Corte dum tumor da foto 28 pelo Ziehl-Neelsen mostrando bacilos a. a. r. intra e extracelulares. 1200x. Fotomicros 30 e 31. Cortes das biópsias do Rhesus 6 no 9º e 60º dias de incubação, corados pela Hematoxilina-Eosina mostrando granulomas. 128x.

Photomicro 29 Section of one tumor of photo 28 stained by Ziehl-Neelsen, showing many acid-fast bacilli. Photomicros 30 and 31. Sections of biopsies from Rhesus n. 6, performed on its 9th and 60th days of incubation stained by Hematoxylin-Eosin, showing granulomas. 128x.



## ESTAMPA 7



Fotomicros 32 e 33. Cortes de nódulo facial do Rhesus 2 inoculado a 22-3-50 com a cultura «Chaves I», corados pela Hematoxilina-Eosina, mostrando granulomas (45x e 128x) que o Dr. Torres achou semelhantes ao leproma do homem (P.C. 16.398).

Fotomicros 34 e 35. Cortes de nódulo facial dum *Cebus fatuellus* inoculado a 26-10-50 com a retrocultura do Rhesus 4, passagem do Rhesus 2, biopsia de 25-1-51. Corados pelo Ziehl-Neelsen mostrando abundantes bacilos a.a.r. (P.C. 16.905).

Photomicros 32 and 33. Sections of facial tumor of Rhesus n. 2 inoculated on 22-3-50 with strain «Chaves I», stained by H. E. showing granulomata (45x and 128x) which Dr. Torres considered as similar to human leproma.

Photomicros 34 and 35. Sections of facial nodule of *Cebus fatuellus* inoculated on 26-10-50 with retroculture of Rhesus n. 4. Biopsy of 25-1-51. Stained by Ziehl-Neelsen method showing abundant acid-fast bacilli. 1200x.

Fotomicros de Miguel Cesar.



## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

## ESTAMPA 8

1º Lado esquerdo: *Rhesus 1* inoculado com a cultura «Hecke» (20º dia): Estampa com 5 figuras coloridas, no centro um tubo de Loewenstein com a cultura original, 13-7-49. À esquerda esfregaço de pús do Rhesus acima, 1.300 x: massa de bacilos a.a.r.; e em baixo círculo com 4 bacilos, 1 bipolar, 2 com 3 nódulos, nas extremidades e centro e o 4.º com 4 grânulos. Aumento 7.000x. Do pús do Rhesus obtive a 2.ª retrocultura: esfregaço de bacilos granulosos pelo Ziehl-Neelsen 1.300x e em baixo os mesmos a 7.000x (germens idênticos aos do pús).

Figura 1a colorida, do mesmo Rhesus, no 20º dia de incubação, apresentando os nódulos da fronte e face esquerda, tendo ao seu lado uma fotografia confirmativa.

2º Lado direito: *Rhesus 3* inoculado com a cultura «Emilia» (11º dia): figura colorida mostrando os 4 nódulos da cara do animal, 2 na fronte e dois nas faces. Em baixo uma estampa colorida com 5 figuras: no centro 1 tubo de Loewenstein com a cultura amarela obtida do pús do Rhesus 3, inoculado. À esquerda esfregaço do pús que deu essa retrocultura 1.300x e em baixo 3 bacilos granulosos (cocótricas com 5 e 6 grânulos). À direita do tubo esfregaço da retrocultura, pelo Ziehl-Neelsen a 1.300x e desenho de 4 bacilos granulosos 7.000x.

2a estampa do Rhesus (11º dia) com nódulos na fronte e faces e a fotografia à esquerda confirmando essas lesões.

3º Em baixo do quadro: 3 estampas coloridas, nos extremos as figuras de frente e de perfil esquerdo do Rhesus 2 inoculado com a cultura «Chaves», no 19º dia de incubação. Acima da figura direita, uma fotografia confirmativa. No centro, uma estampa colorida com 5 figuras: à esquerda círculo representando o esfregaço da pele do tumor do Rhesus 2: bacilos granulosos 1.300x e círculo com 4 bacilos com condensações em barra 7.000x. No centro 1 tubo de Loewenstein com a cultura amarela obtida da emulsão do tumor do Rhesus 2: Biópsia de 13-4-50. À direita esfregaço pelo Ziehl-Neelsen da retrocultura 1.300x: bacilos idênticos ao da cultura original: a.a.r. granulosos. Do mesmo esfregaço em baixo um círculo com 5 bacilos, todos bipolares, 7.000x.

## EXPLANATION OF THE FIGURES

## PLATE N. 8

1. *Left side: Rhesus N. 1*, inoculated with the «Hecke» culture (20 days old): plate with 5 color figures, in the center a tube of Loewenstein medium with the original culture of July 13th 1949. On the left side, pus smear from the above Rhesus, 1,300x: bundle of a.a.f. bacilli; at the bottom, a circle with 4 bacilli, 1 bi-polar, 2 with 3 nodules — at the extremes and center —, and the 4th with 4 granules, 7000x. From the pus of Rhesus No. 1 there was obtained the 2nd retroculture: smear of granulated bacilli by Ziehl-Neelsen, 1300x, and at the bottom, the same again, 7000x (germs identical to those of the pus). Fig. No. 1a color, from the same Rhesus, on the 20th day of incubation, showing the forehead and left cheek nodules, with a confirmative photo.

2. *Right side: Rhesus N. 3* inoculated with the «Emilia» culture (11th day): figure in color, showing 4 tumors, 2 on forehead and 2 on the cheeks. On the lower part, a color plate, with 5 figures: in the center, one tube of Loewenstein medium with yellow culture obtained from the pus of Rhesus No. 3, inoculated. On the left, a pus smear from this retroculture 1300x and, on the lower part, 3 granulated bacilli (cocotrices with 5 and 6 granules). On the right of the tube, a smear of the retroculture, by the Z-N method, 1300x, and a drawing of 4 granulated bacilli, 7000x 2a plate of Rhesus (11th day), with nodules on the forehead and cheeks and, on the left, a confirmative photo of these lesions.

3. *Lower portion of the plate: 3 color plates*, at the 2 extremes, front and left profile of Rhesus No. 2, inoculated with the «Chaves» strain, on the 19th day of incubation. Above, a confirmative photo. In the center, a color plate with 5 figures: on the left, a circle representing the smear of a skin tumor of Rhesus No. 2: granulated bacilli, 1300x, and another circle with 4 bacilli with protoplasmic condensations, 7000. In the center, one tube of Loewenstein medium, with a yellow culture obtained from the emulsion of the tumor of Rhesus No 2: biopsy from April 13th, 1950. On the right, a smear stained by the Z-N method, of the retroculture, 1300x: bacilli are identical to those of the original culture: granulated a.a.f. Below, from the same smear, a circle with 5 bacilli, all of them bi-polar, 7000x.

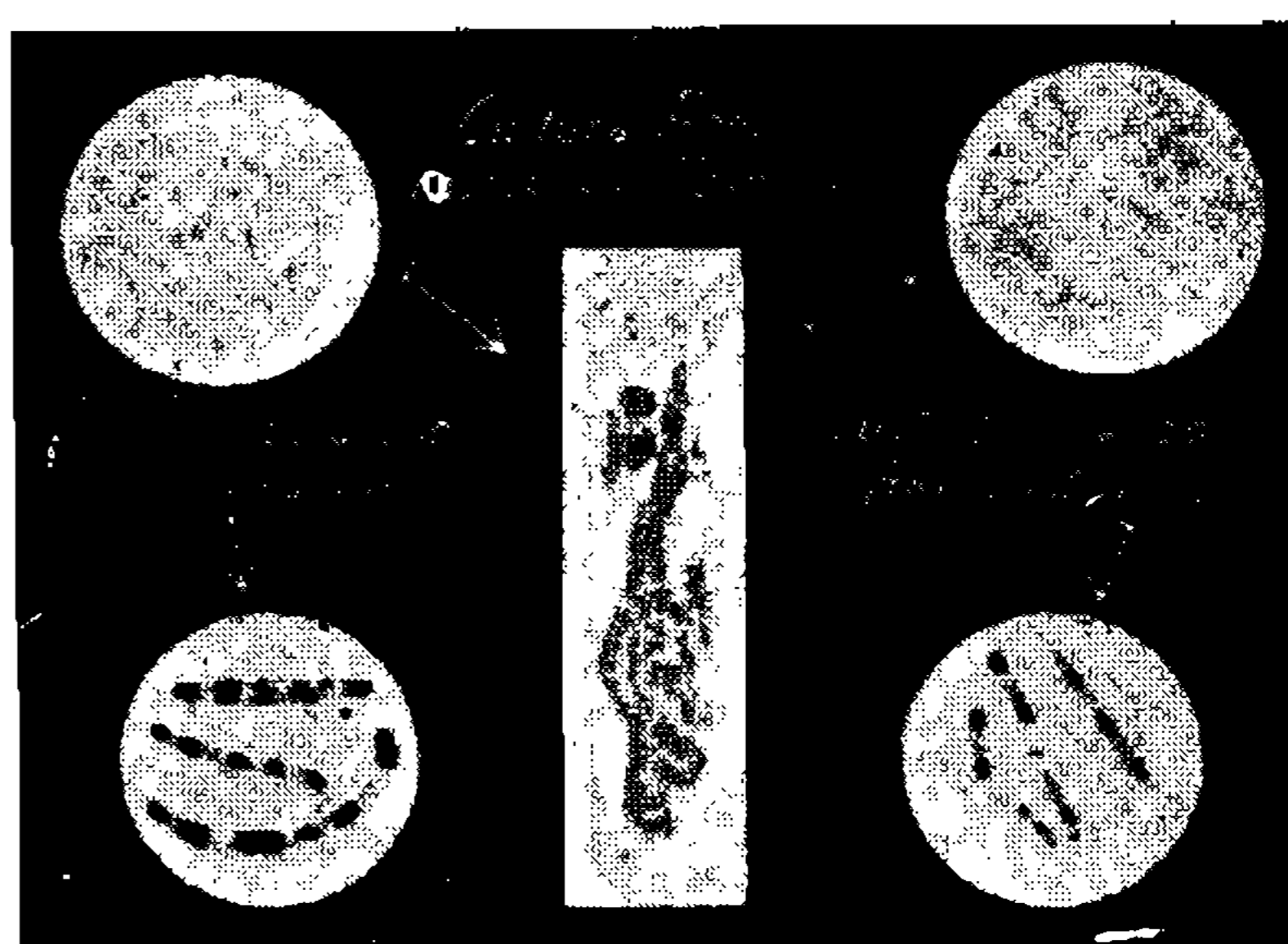
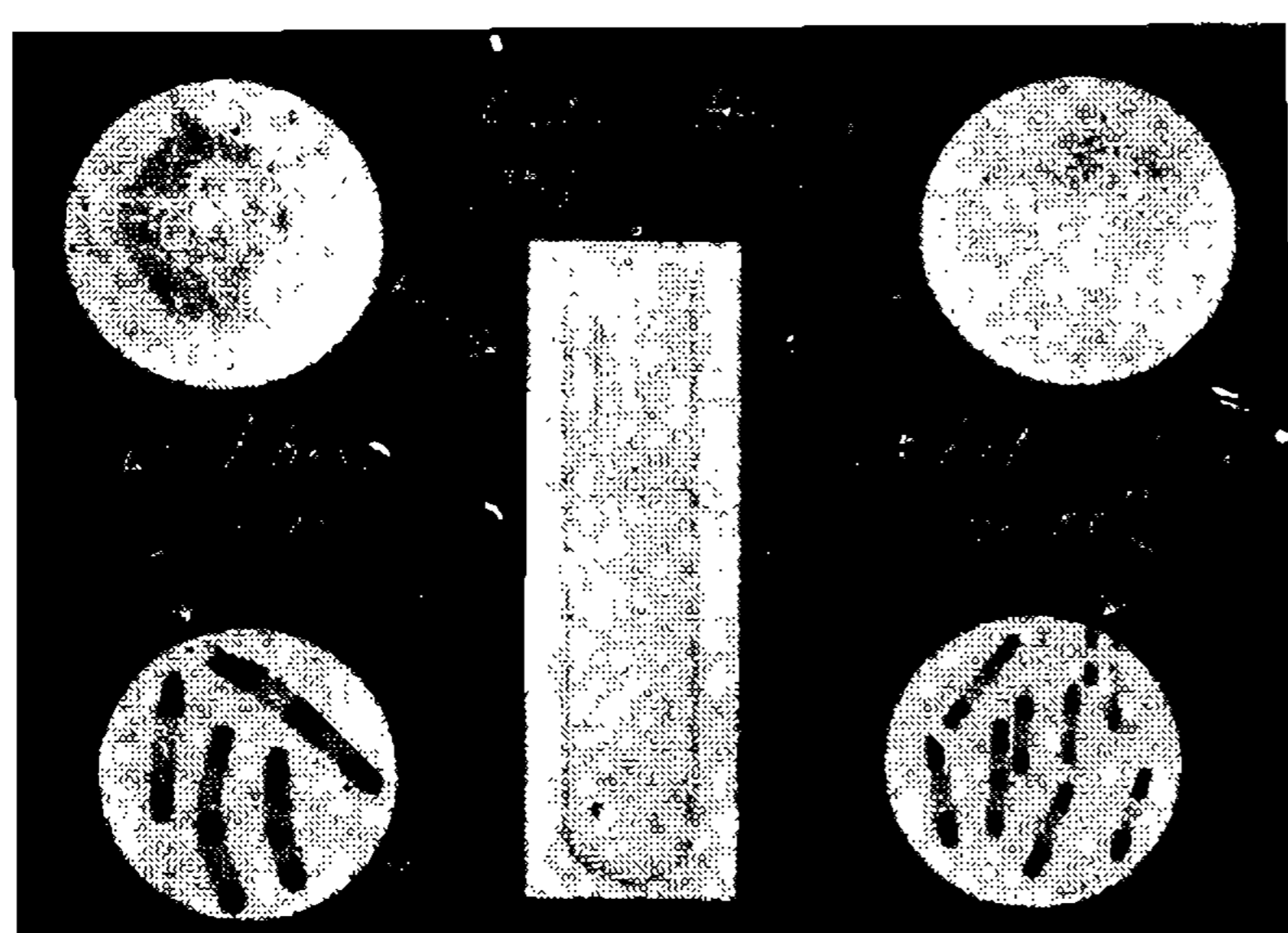




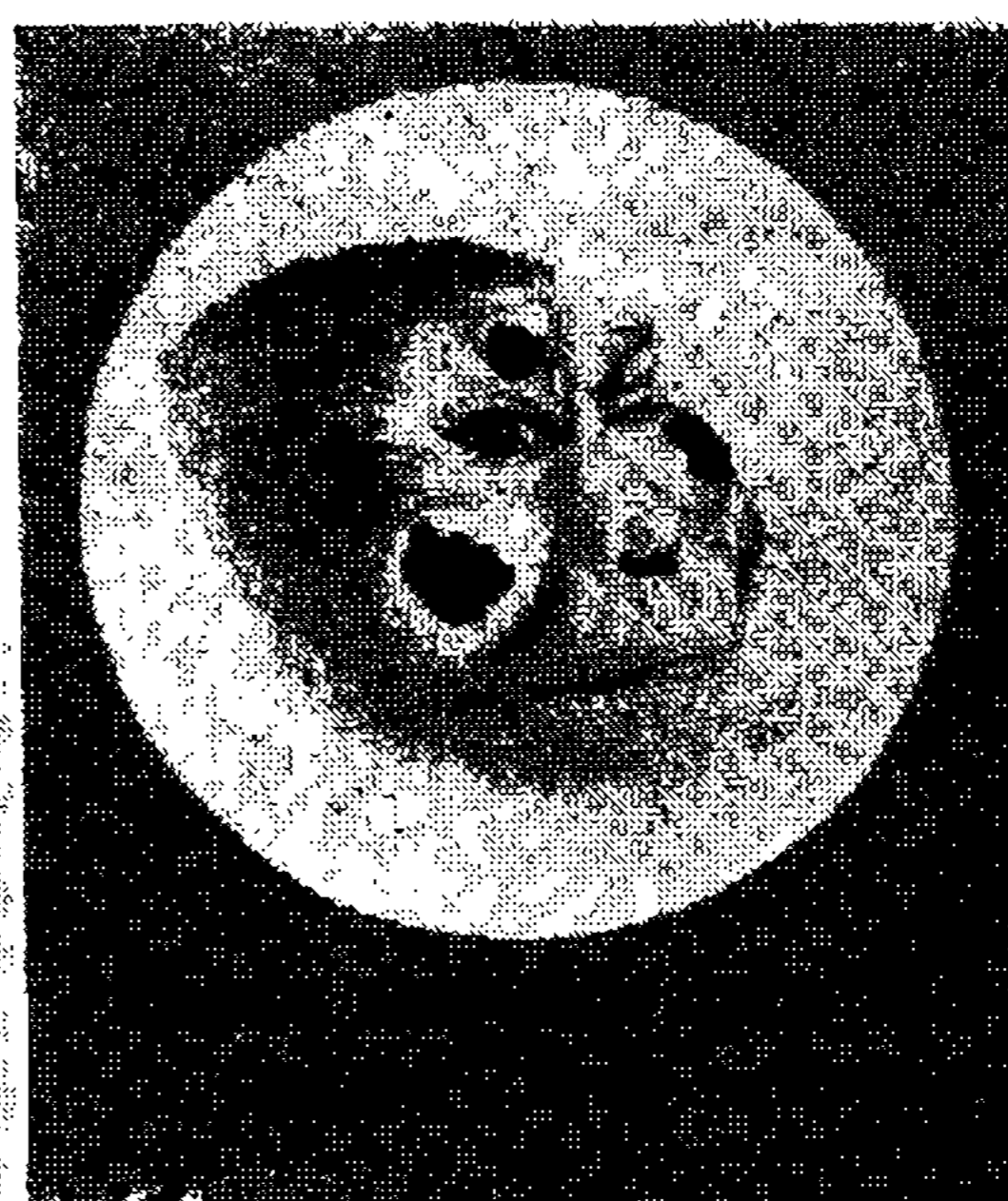
1°



2°



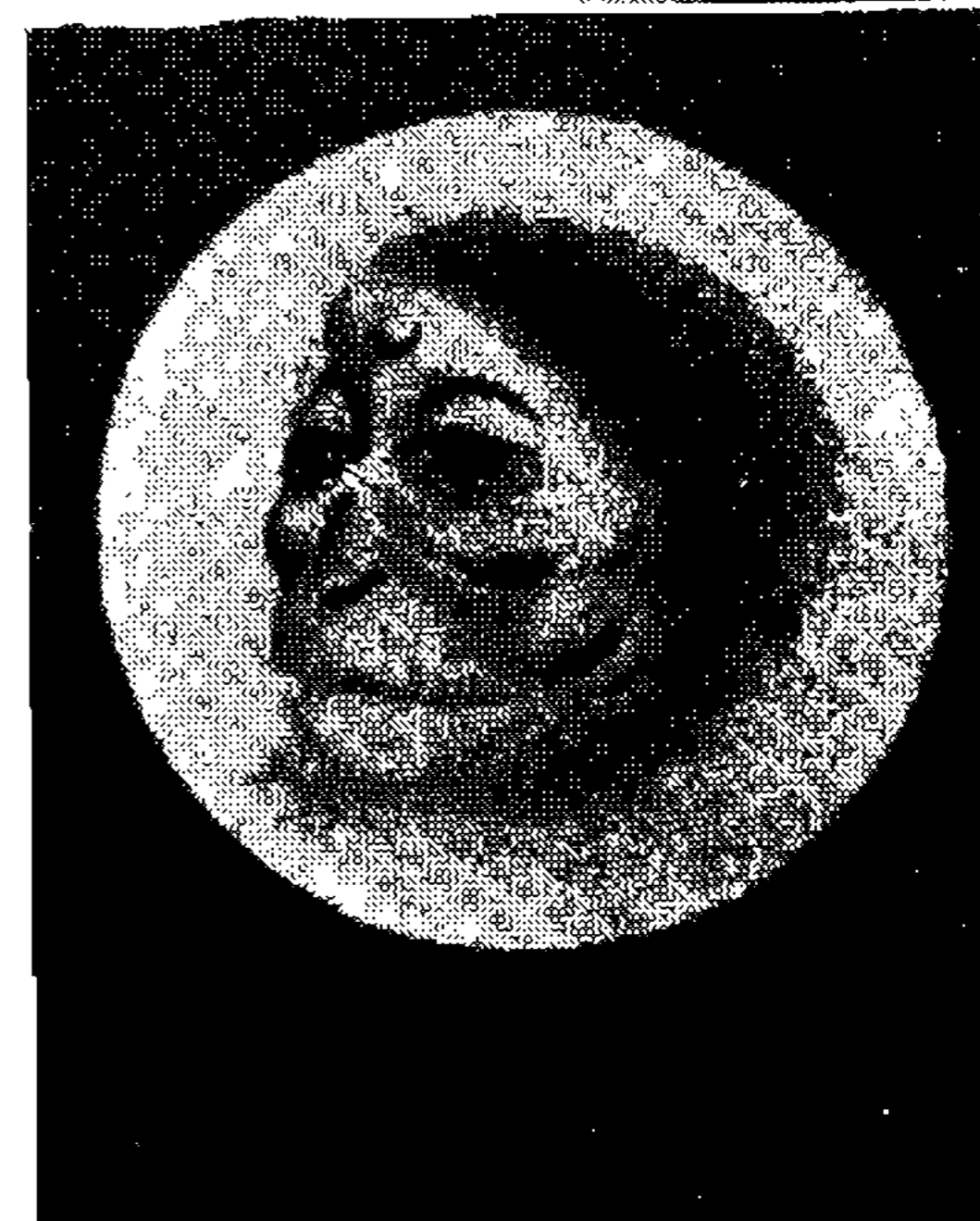
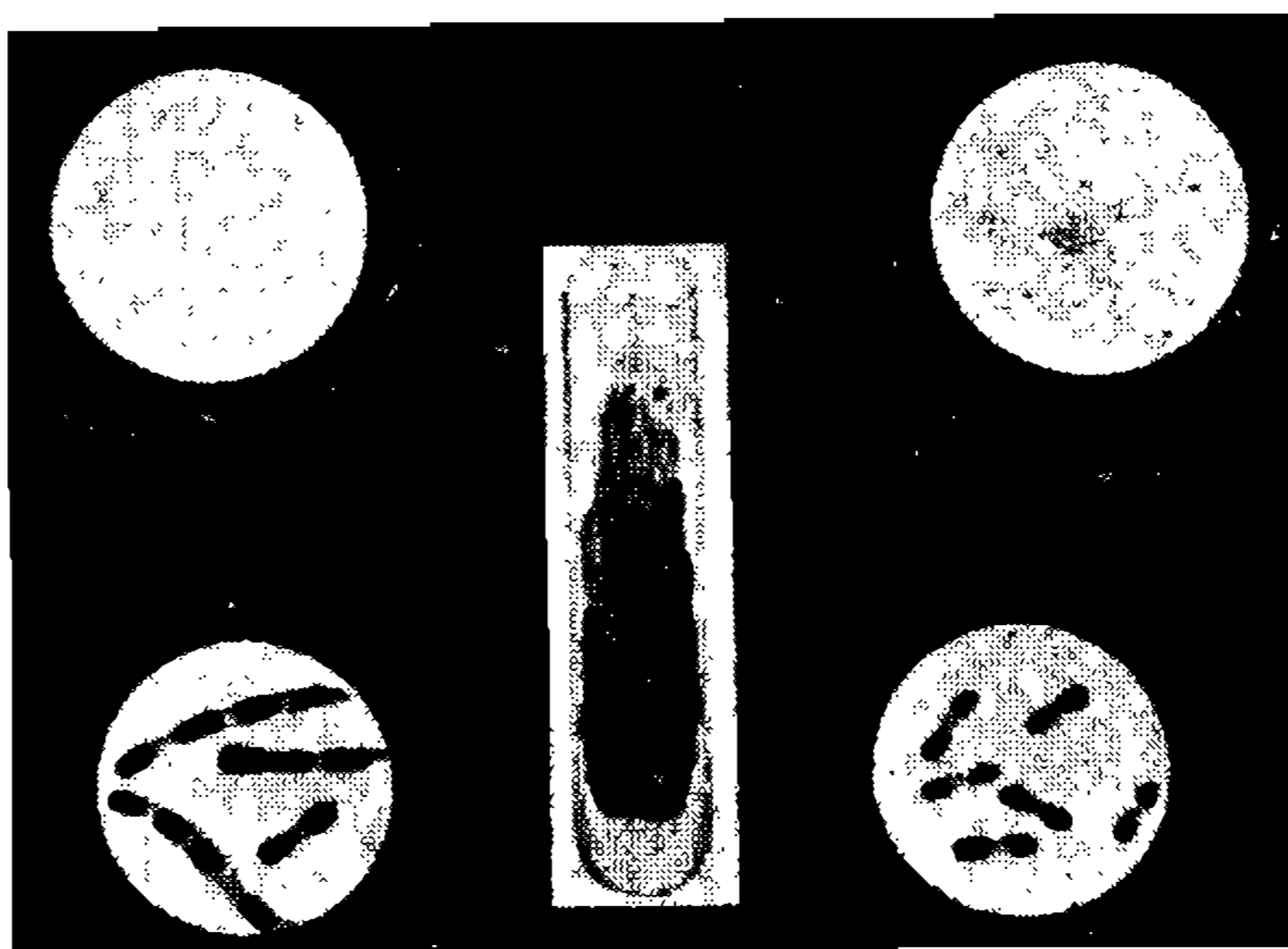
1a.



2a.



3°



3a.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

## ESTAMPA 9

4º *Rhesus* inoculado com retrocultura do *Rhesus* 2 («Chaves»), 12º dia. Passagem do *Rhesus* 2 ao *Rhesus* 4. É uma estampa colorida mostrando o *Rhesus* 4 com 2 grandes tumores nas faces e 2 menores nos sobrôlhos. Em baixo dessa estampa outra com 5 figuras: À esquerda esfregaço de pús de rato inoculado com a cultura «Chaves», corado pelo Ziehl-Neelsen, mostrando bacilos granulosos, alguns cocótricos; e em baixo desse círculo outro representando 4 bacilos do mesmo material 7.000x, todos com duas a 4 granulações, das quais algumas em barra.

No centro 1 tubo de Loewenstein com 2/3 de cultura amarela, de pús-soda de tumor de Camundongo. À direita, em cima, um círculo com esfregaço da cultura desse tubo, corado pelo Ziehl-Neelsen, mostrando somente elementos a.a.r., porém alguns homogêneos, a maioria já granulosos: Etiqueta: «Cultura camundongo «Chaves» inoculado com material do *Rhesus* 4 (Chaves). Outro círculo com 8 elementos a.a.r., todos com condensação do protoplasma em barras.

4a O mesmo *Rhesus* 4, desenho de perfil lado esquerdo, mostrando os nódulos da face desse lado, do sobrolho, e um pequeno, secundário. Passagem do *Rhesus* 2, 12.º dia de incubação. Em baixo uma fotografia confirmando o desenho acima.

5º Estampa do *Rhesus* 4 (passagem do *Rhesus* 2), representando as biópsias de 25-5-50, no 1.º de Junho seguinte: feridas ulceradas, rubras, sangrando pelo arrancamento do curativo pelo símio. São 3 ulcerações nos sobrôlhos e duas grandes nas faces.

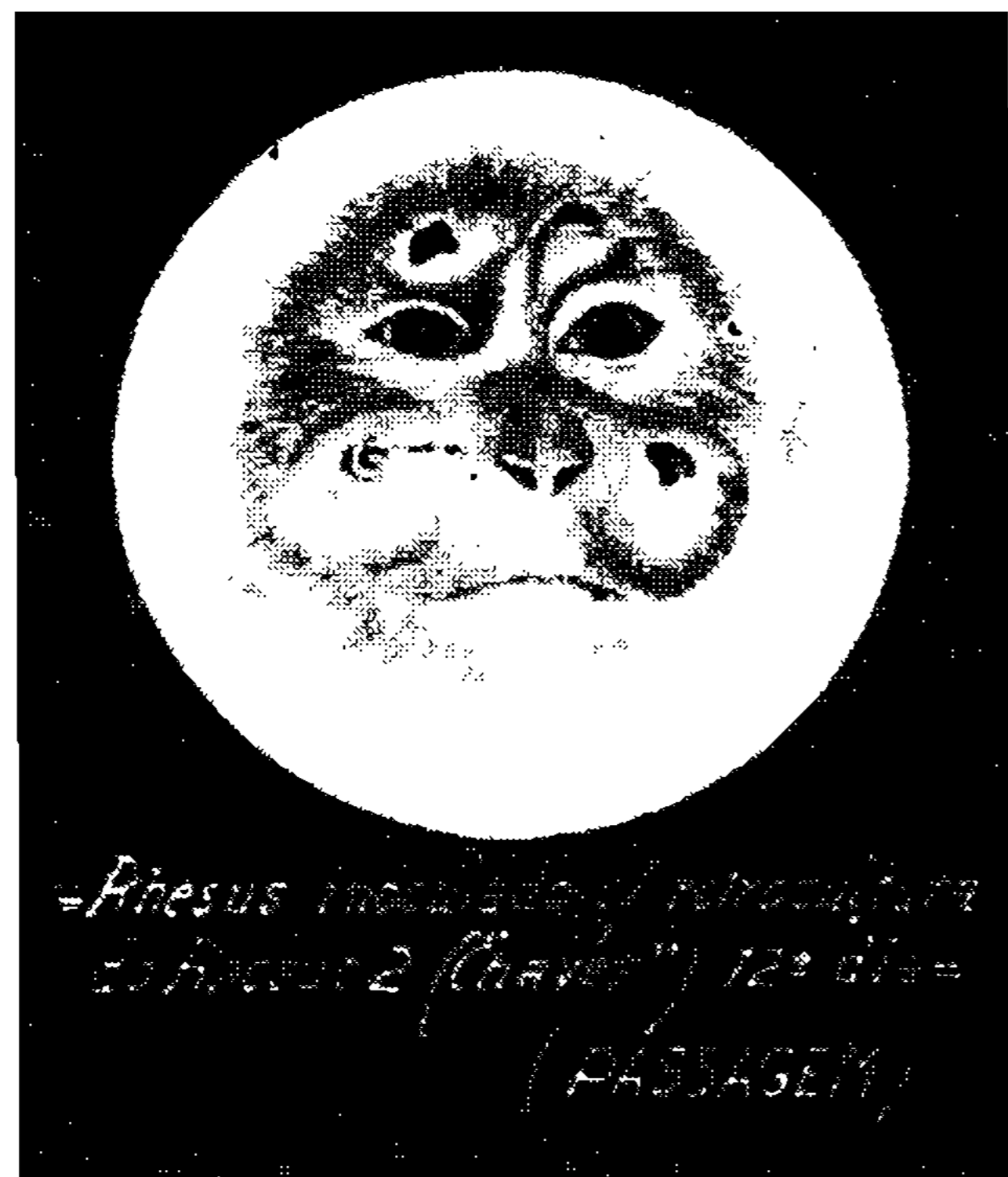
Estampa central com 5 figuras coloridas, sendo: à esquerda círculo representando esfregaço de pús do *Rhesus* 4 inoculado com a cultura «Chaves», 1.300x. Em baixo, um círculo com 4 longos bacilos do mesmo pús, com 3 a 6 granulações ou condensações em barra, corados pelo Ziehl-Neelsen 7.000x. No centro 1 tubo de Loewenstein com 2/3 da germinação da cultura amarela obtida da sementeira de emulsão-soda do tumor da face do *Rhesus* 4, passagem do *Rhesus* 2 (C. «Chaves»). À direita, em cima, um círculo representando esfregaço da referida retrocultura, com predominância dos bacilos granulosos. Em baixo, outro círculo com 5 elementos desse esfregaço corados pelo Ziehl-Neelsen, 4 bipolares, com condensações em barra e um com grânulo circular no centro, 7.000x.

5a O mesmo *Rhesus* 4, em desenho 15 dias após a biópsia (9-5-50) representando pequenas ulcerações residuais nas faces e nódulos secundários junto à *asa nasi* direita e à direita da raiz do nariz.

Etiqueta: «*Rhesus* 4 (passagem cultura «Chaves») com nódulos secundários. Em baixo uma fotografia confirmando essas lesões.

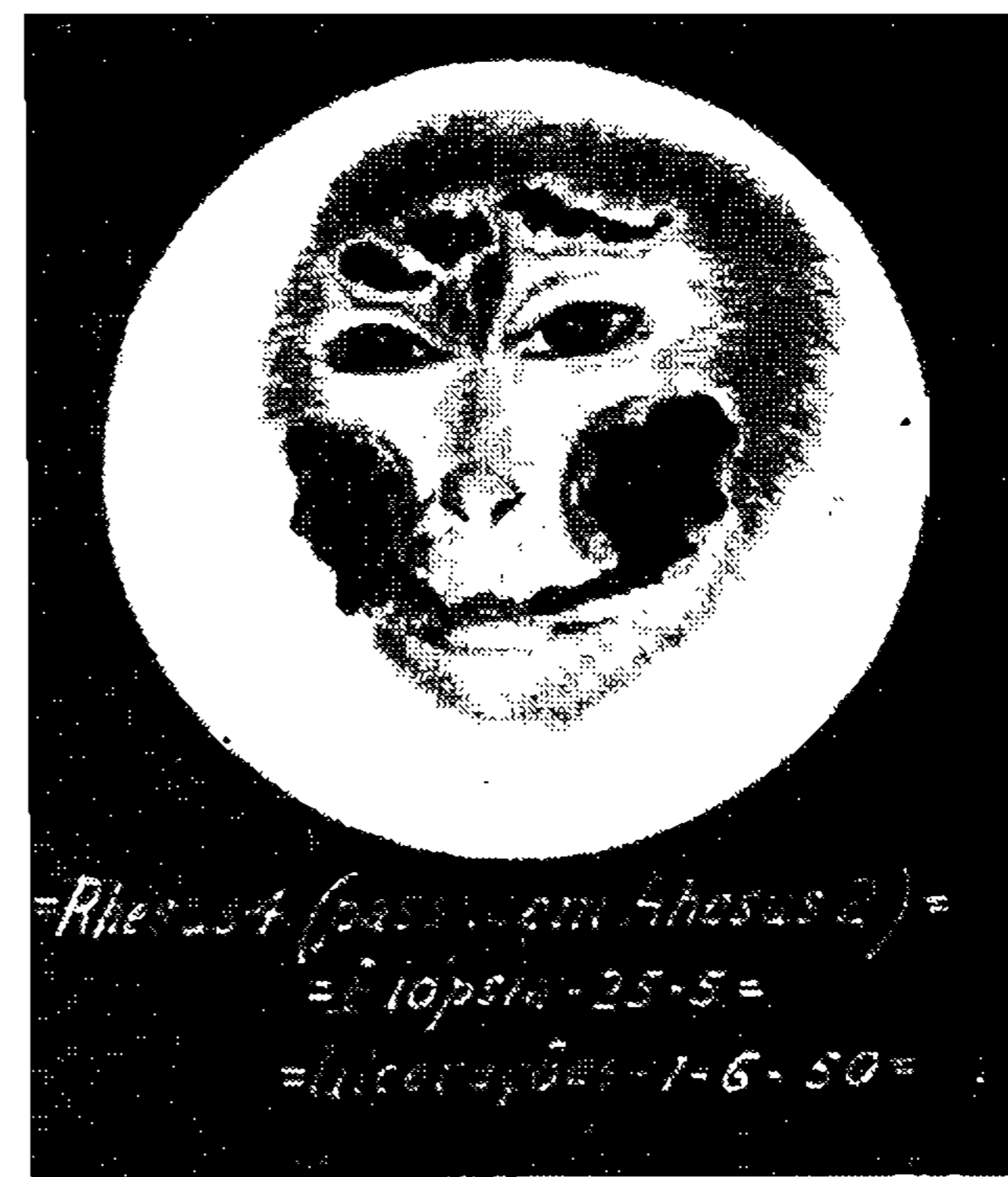


ESTAMPA 9



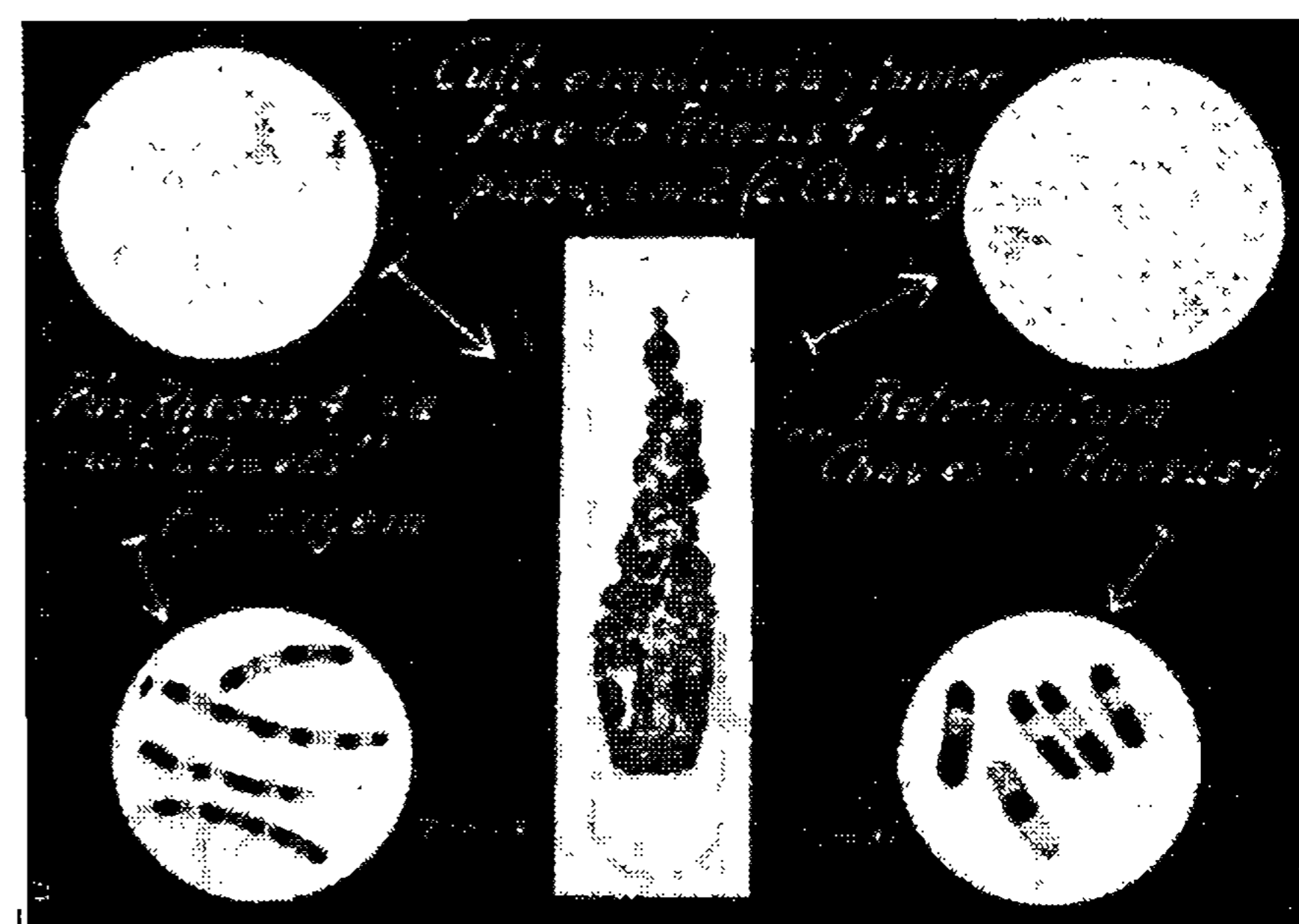
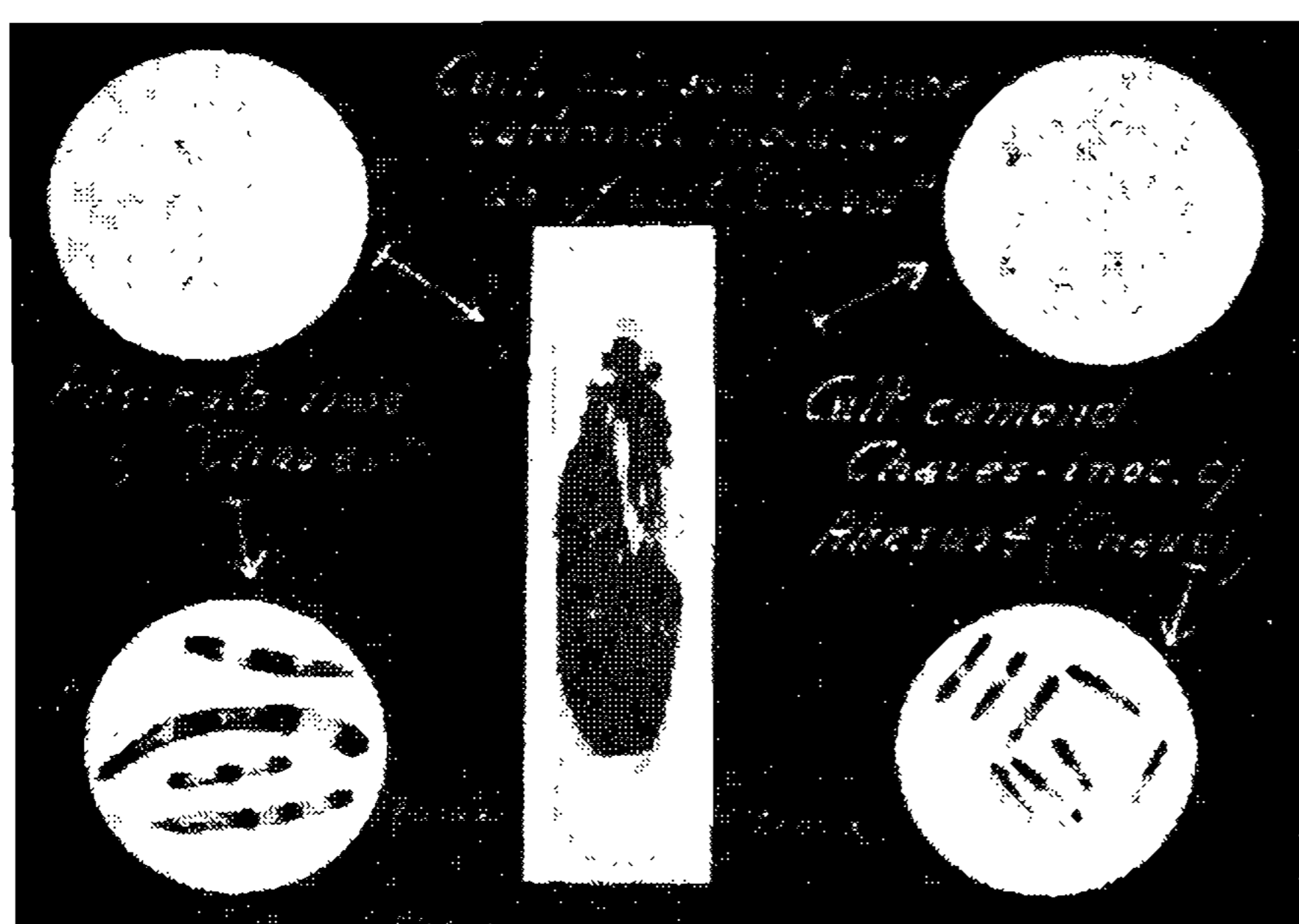
4º

-Rhesus inoculado com vírus  
 do Píscar 2 (Chaves) 12º dia =  
 (PASSAGEM)



5º

-Rhesus 34 (passagem - hesus 2) =  
 = Elopsin - 25-5 =  
 = Licorapólar - 1-6-50 =



4a



5a





## EXPLANATION OF THE FIGURES

## PLATE N. 9

*Rhesus No. 4*, inoculated with the retroculture of *Rhesus No. 2* («Chaves»), 12th day. Passage from *Rhesus No. 2* to *Rhesus No. 4*. This is a color plate, showing *Rhesus No. 4* and *No. 2* with 2 large facial tumors and 2 smaller ones over the eyebrows. Below, there is another one, with 5 figures: at the left side, the pus smear of a rat inoculated with the «Chaves» strain, stained by the Z-N method, showing granulated bacilli, some cocco-trices; below this circle, there is another one, with 4 bacilli of the same material, 7.000x, all of them presenting 2 to 4 granulations, some of which in bars. In the center, one tube of Loewenstein medium, with 2/3 of germination of yellow culture from the tumor of a mouse treated with soda (Ary gave the designation «rat» to both mice and rats, and so the material that gave origin to the retroculture must be the same rat pus). In the upper right-hand corner, a circle with a smear of the culture from that tube stained by the Z-N method, showing only a.a.f. germs, some homogeneous, and the majority already granulated: Label: «Mouse culture «Chaves», inoculated with the material from *Rhesus No. 4* (Chaves)». Another circle with 8 a.a.f. elements, all of them with condensation of the protoplasm, forming bars.

4. The same *Rhesus No. 4*, left profile drawing, showing the nodules on this side of the face, on the eyebrow, and a smaller secondary one. Passage from *Rhesus No. 2*, on the 12th day of incubation. Below, a confirmative photo of this drawing.

5. Plate of *Rhesus No. 4* (passage of *Rhesus No. 2*), representing the biopsies from May 25th 1950, on the following June 1st: ulcerated reddened wounds, bleeding, due to tearing off of dressings by the monkey. There are 3 ulcerations on the eyebrows and two larger ones on the cheeks. Central plate with, 5 color figures: on the left, a circle representing the pus smear from *Rhesus No. 4*, inoculated with the «Chaves» strain, 1.300x. Below this, a circle with 4 large bacilli of the same pus, with 3-6 granules or condensations in bars, stained by the Ziehl-Neelsen method, 7.000x. In the center, one tube of Loewenstein medium, with 2/3 of a yellow culture, obtained from the sowing of the soda-emulsion of the facial tumor of *Rhesus No. 4*, passage from *Rhesus No. 2* («Chaves» strain). On the upper right-hand corner, a circle representing a smear of the above-mentioned retro-culture, with a predominance of granulated bacilli. Below this, another circle with 5 elements of this smear, stained by the Ziehl-Neelsen method, 4 of them bi-polar, with condensations in bars, and one circular granule in the center, 7.000x. The same *Rhesus No. 4*, in a drawing made 15 days after the biopsy (June 9th 1950), representing small residual ulcerations on the cheeks and secondary nodules next to the right *asa nasi* and to the right side of the root of the nose. Label: «*Rhesus No. 4* (passage from the «Chaves» strain) with secondary nodules». Below, a confirmative photo of these lesions.



## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

## ESTAMPA 10

6º *Rhesus* nº 2 inoculado com cultura «Emilia» (7º dia). Desenho mostrando 2 grandes nódulos íntegros na face e sobrólho esquerdos, e outro alongado na face direita e um pequeno circular na fronte direita, ulcerando. Em baixo estampa com 5 figuras, sendo à esquerda uma circular representando esfregaço de pús-Rhesus 3 (não 2 como escreveu o desenhista), inoculado com cultura «Emilia» 1.300x. Duas células de pús parasitadas, uma globia frouxa com bacilos medianos, e espalhados muitos bacilos longos, granulósos. Em baixo outro círculo com 4 elementos, 1 com 1 nódulo central de diâmetro duplo ao do bacilo e uma barra apical, 2 com 3 nódulos e 1 com 2 nódulos e uma barra apical longa. No centro 1 tubo de Loewenstein, com cultura amarela, em minúsculas e inúmeras colônias circulares, proveniente do pús do Rhesus 3. À direita um círculo de esfregaço desta cultura corado pelo Ziehl-Neelsen, mostrando somente bacilos a.a.r., todos granulósos. Em baixo outro círculo com 5 elementos a.a.r., 1 com uma barra apical, outro com 2 barras bipolares, 1 com um grânulo central e 1 barra apical, e o 5º com 3 nódulos nitidamente circulares.

Um desenho da cabeça do Rhesus 3 no 7º dia da inoculação com cultura «Emilia», de perfil esquerdo, mostrando 4 tumores. Outro desenho no 16º dia da mesma inoculação, mostrando o símio de frente, com 4 grandes tumores, 2 nos sobrólhos e 2 nas faces, todos em início de ulceração. Em baixo 2 fotos confirmativas desses 2 desenhos: 6a e 6b.

7º Desenho do Rhesus 5, 2ª passagem da cultura «Chaves» (7º dia), mostrando, de frente, 2 enormes nódulos nas faces e 3 menores na fronte. Em baixo outro desenho do mesmo Rhesus no 7º dia, perfil esquerdo tendo debaixo uma foto confirmativa. À direita deste desenho outro, de frente, do mesmo Rhesus 5 no 16º dia de incubação com a inoculação da retrocultura «C» do Rhesus 4. No centro uma estampa com 5 figuras, sendo uma circular à esquerda, esfregaço do pús do Rhesus 5 e outro círculo com 3 elementos a.a.r. 7.000x. No centro da estampa 1 tubo de Loewenstein da retrocultura do material do Rhesus 5: com inúmeras pequenas colônias amarelas, pequeninas, tendo à sua direita um desenho do esfregaço da mesma, 1.300x: bacilos a.a.r. granulósos e em baixo outro círculo representando 4 desses elementos, bacilos longos, granulósos, pleomórficos, com nódulos polares ou centrais, ou barras de condensações nos pólos, ou elemento cocótrice com nódulos circulares ou barras de protoplasma condensado.

Desenhista *Ary Gonçalves*.

N.B. — Todas as figuras foram desenhadas do natural e os macacos fotografados em seguida. As culturas, desenhadas do natural, em tubos grossos de Loewenstein, estão um pouco esquematizadas, mas perfeitas, assim como estão perfeitos os desenhos das preparações microscópicas. — *Souza-Araujo*.



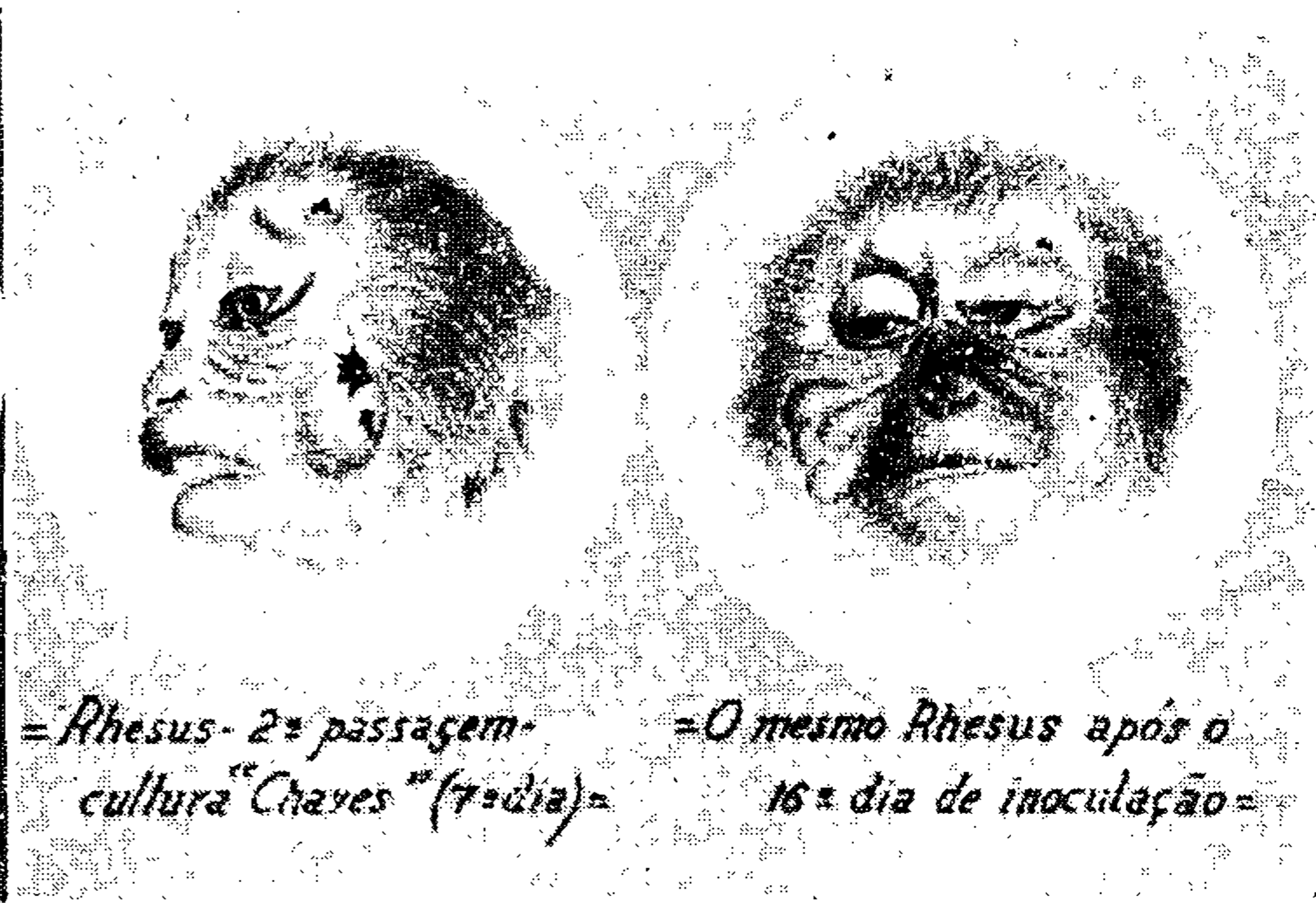
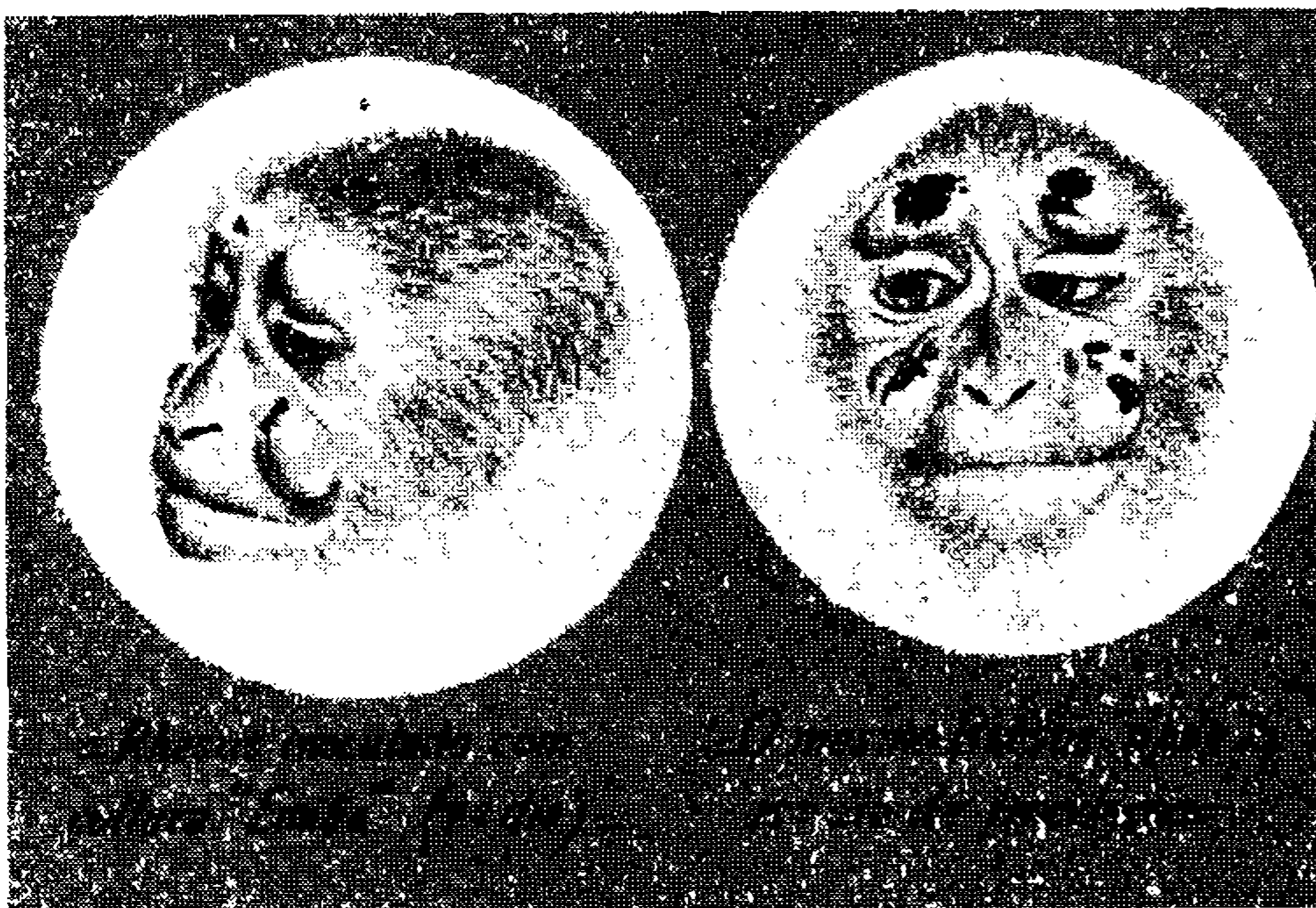
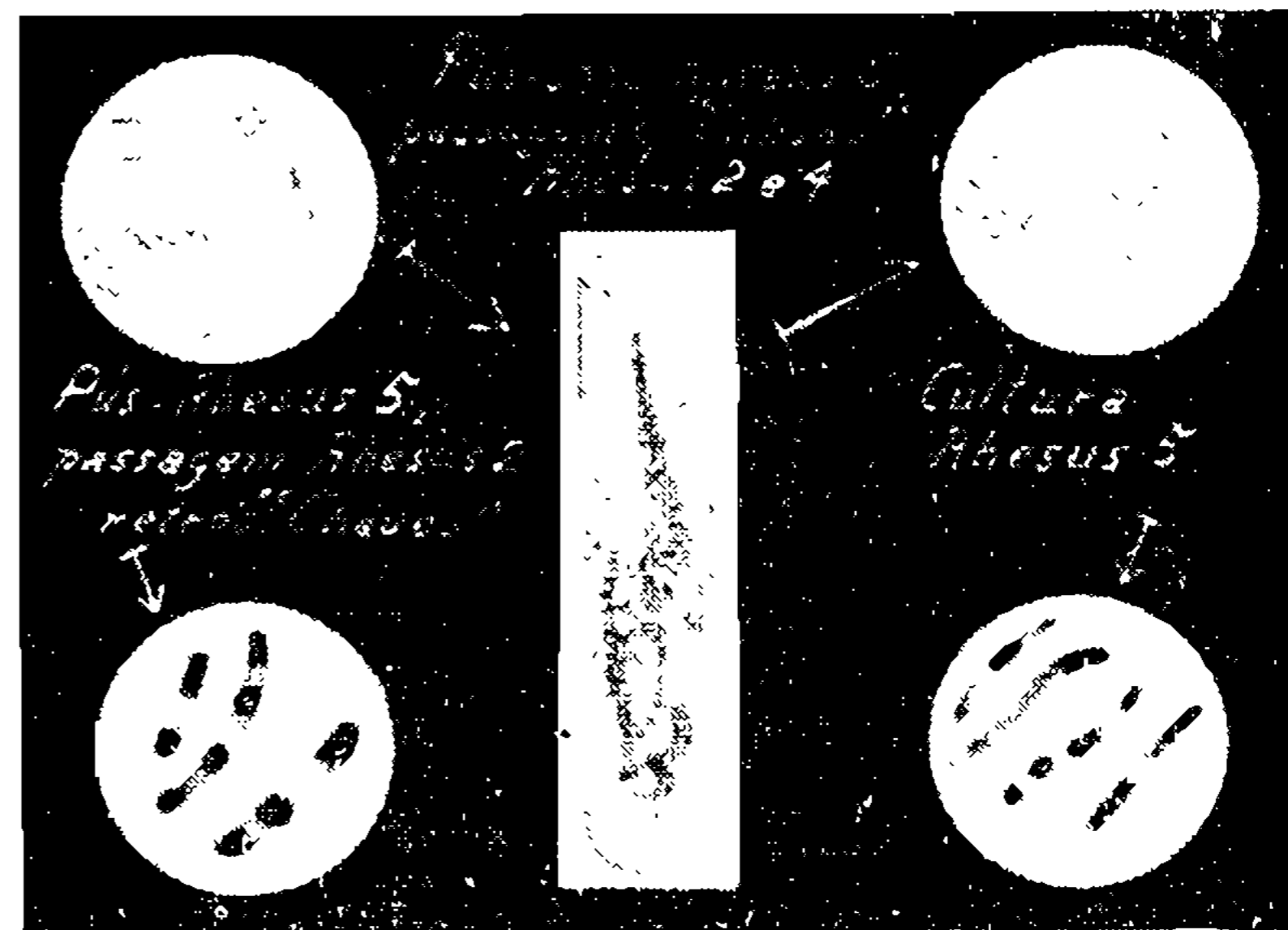
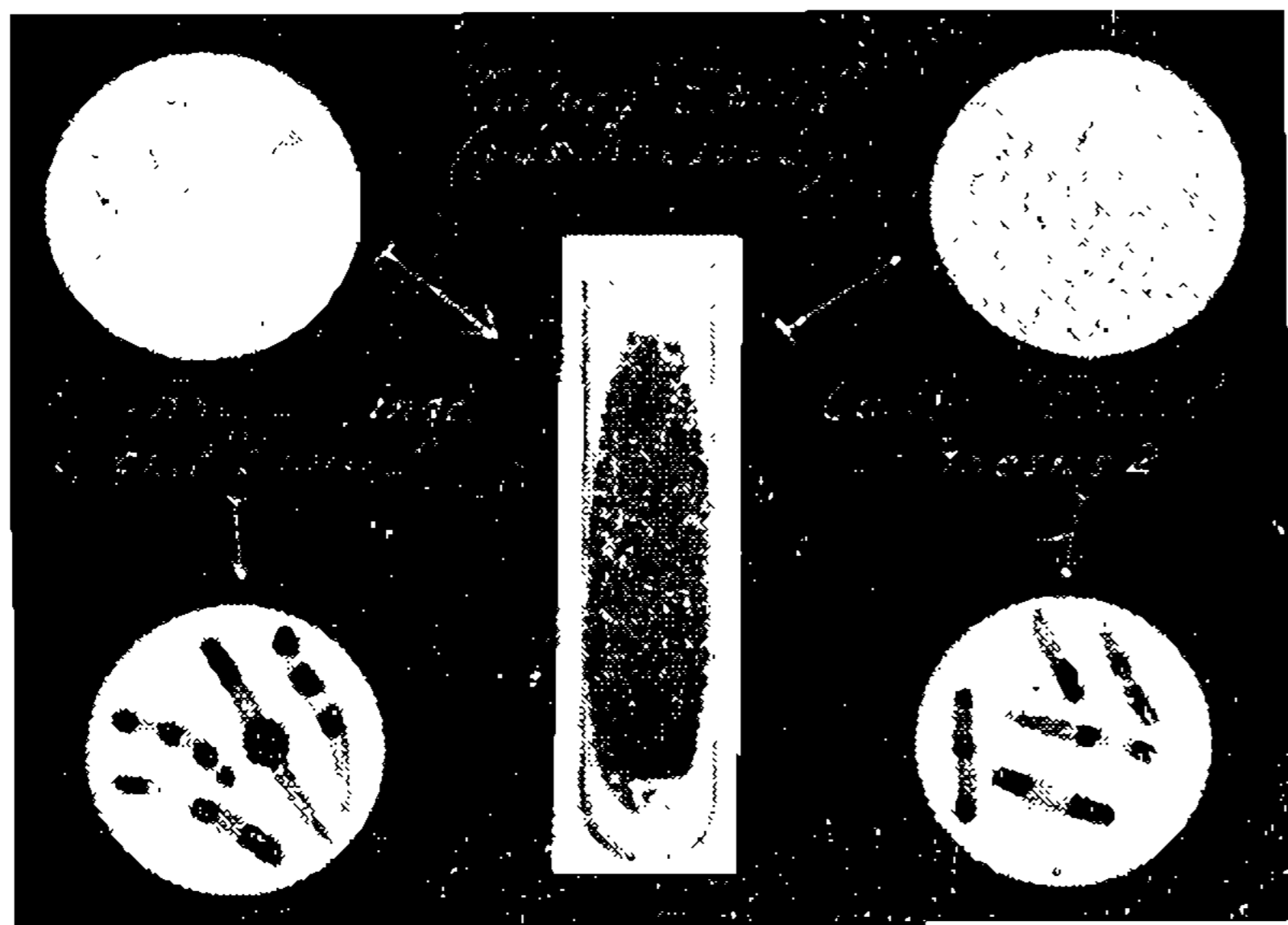
ESTAMPA 10



6°



7°



6a



6b



7a



7b



## EXPLANATION OF THE FIGURES

## PLATE No. 10

6. *Rhesus N. 2*, inoculated with the «Emilia» strain (7 days incubation). Drawing showing 2 large, compact tumors on the left cheek and eyebrow, and another long one on the right cheek, and a smaller, circular one, on the right side of the forehead, this one ulcerating. Below, a plate with 5 figures, of which the circular one on the left represents the pus smear of *Rhesus No 3* (and not *No. 2*, as according to the drawer), inoculated with the «Emilia» strain, 1.300x. Two parasite pus cells, one loose globia with median bacilli and many scattered large bacilli, granulated. Below, another circle, with 4 elements, 1 with 1 central nodule, the diameter of which is twice that of the bacillus and 1 apical bar, 2 with 3 nodules and 1 with 2 nodules and a long apical bar. In the center, one tube of Loewenstein medium, with a yellow culture within innumerable very small circular colonies, originated from the pus of *Rhesus No 3*. On the right, a circle with a smear from this culture, stained by the Z-N method, showing a.a.f. bacilli, all granulated. Below, another circle with 5 a.a.f. elements, 1 with apical bar, another with 2 bi-polar bars, 1 with a central granule and 1 apical bar, and the 5th with 3 clearly circular nodules. A drawing of the head of *Rhesus No. 3*, on the 7th day after inoculation with the «Emilia» strain, left profile side, showing 4 tumors. Another drawing, made on the 16th day after this same inoculation, showing the monkey front view, with 4 large tumors, 2 eyebrows and two on the cheeks, all of them starting ulceration. Below, photos confirming the above drawings: 6a and 6b.

7. Drawing of *Rhesus No. 5*, 2nd passage from the «Chaves» strain (7 days old), showing 2 enormous nodules on the cheeks and 3 smaller ones on the forehead. Below another drawing of this same *Rhesus*, on the 7th day, left profile view, with the respective confirmative photo. On the right, another drawing, front view of the same *Rhesus No 5*, on the 16th day of incubation with the inoculation of the "C" retroculture of *Rhesus No. 4*. In the center, a plate with 5 figures, one of them circular, on the left, a pus smear of *Rhesus No. 5*, and another circle containing 3 a.a.f. elements, 7.000x. In the center, one tube of Loewenstein medium, retroculture of the material from *Rhesus No. 5*: with innumerable very small yellow colonies, and at the right, a drawing of the respective smear, 1.300x: granulated a.a.f. bacilli, and below this another circle representing 4 of these elements, large granulated pleomorphic bacilli, with polar or central nodules, or condensation in bars at the poles, or coccotrix element with circular nodules or with protoplasm condensed in bars.

*Ary Gonçalves, Del.*

---

*Note:* all drawings were made *ad naturam* and the monkeys were photographed immediately afterwards. The culture, also drawn from the natural, in thick Loewenstein tubes, are a little schematized, but still perfect, as are also perfect the drawings of the microscopic preparations. — *Souza-Araujo.*



## TRANSLATION

## Experimental Leprosy in Monkeys

Patogenic action of acid-alcohol fast bacilli isolated from lepers («Chaves» and «Emilia» strains) for *Macaca mulatta* and *Cebus fatuellus* (\*)

## MATERIAL AND METHODS EMPLOYED

This is a resumé of our studies concerning experimental leprosy, in a period extending from November 1949 to December 1954, with seven *Macaca mulatta* and two *Cebus fatuellus* specimens. Since we had repeatedly noticed, in previous experiments, that hairy animals are refractory to leprosy infections, we preferred the Rhesus monkey, due to its hairless face.

*Inocula* — The following a.a.f. bacilli cultures, isolated from lepers, were used as infection agents:

1. "Hecke" ("H") strain, a non-chromogenic culture obtained from the biopsy (July 13, 1949) of a lepromatous lesion of A. A. Hecke, male, age 26, Case L2-N1, after a 50 days' incubation period, at 37°C. (1)

2. «Chaves I» («CI») strain, a chromogenic culture obtained from the 7th biopsy (September 15, 1949) of a lepromatous lesions on J. L. Chaves, male, age 30, Case L2-N2, after a 30 days' incubation period, at 37°C.

3. "Chaves II" ("CII") strain, a chromogenic culture obtained from the 14th biopsy of the left knee residual lesion, on the above patient, after a 3.220cc intravenous *Promin* injection; morphologically and biologically identical to the "CI" strain.

4. "Maria D." ("M.D.") strain, a retroculture of the "CI" strain, obtained from the biopsy (January 23, 1950) of a cicatrised abcess resulting from a 3 + Mitsuda reaction, injected into the left forearm of Maria D., age 18, Case Lt, in consequence of an inoculation into the patient's right thigh, using 0.2 cc of the emulsion of her husband's (Chaves) culture. A chromogenic culture morphologically and biologically identical to the "CI" strain.

5. "Emilia" ("E") strain, a chromogenic culture obtained from the biopsy (Feb. 28, 1950) of a lepromatous lesion on Emilia J. P., age 53, case L2-N2, after a 20 days, period of incubation, at 37°C (2). There are highly acid-alcohol fast, Gram positive bacilli, which, when stained by the Fontes method present the classic forms of pathogenic mycobacterias; positive reaction to fluoroscopy and partially positive reaction to the cyto-chemical reaction of Dubos for virulence, according to the intensity of their

---

(\*) Part of a lecture presented at the "Cours Supérieur International sur Maladies Tropicales et le Paludisme", organized by the "Conseil des Organisations des Sciences Médicales". University of Stanbul, Turkey, Aug. 25, 1953.



yellow pigmentation. These bacilli were all examined under the electronic and phase contrast microscopy; the results of this examination will be the subject of another paper.

*Inoculation via and doses* — Our monkeys have always been inoculated by sub-cutaneous means. In order to infect rat with the Stefansky bacillus, Marchoux used 0.4 cc of a fresh leproma emulsion. For monkeys, that are from 30 to 50 times heavier than rat, we have used from 1 to 2 cc. of a culture emulsion, therefore no more than 5 times that used for rat. As to the bacteria, the culture suspensions correspond to those of the leproma.

#### SUMMARY OF RECORDS

RHESUS N.º 1. Female, age 4 months. Inoculated on Nov. 11, 1949, using 0.5 cc of the "Hecke" culture emulsion, 2nd generation, dated Sept. 26, 1949, in equal dosis into forehead and chest. On Nov. 21 a nodule made its appearance on the left brow; as regards the chest, a very hairy region, nothing abnormal could be seen. On Nov. 25, it was inoculated into forehead and cheeks, using 0.5 cc. of an emulsion from the same «H» culture, 3rd retroculture, originated from pus of an inguinal tumour of a black mouse. By Nov. 29th, a nodule could be perceived on the right cheek, and by Dec. 15th, there appeared 2 small nodules on the forehead, one of them a residual of the first, the other of the second inoculation, besides one large nodule on each cheek, the histopathology of which, effected 60 days after the inoculation (Jan. 9, 1950), revealed granulomas similar to those found in the human leproma. (3)

RHESUS N.º 2. Male, age 4 months, weight 2.5 kg., inoculated on March 22, 1950 into forehead and malar regions, using 1.5 cc of the "Chaves I" culture, in 5% glycerin broth, 80 days old. This monkey was submitted to 7 inoculations, in a period extending over March 22, 1950 to August 14, 1951; this might appear exaggerated: Charles Nicolle and Blaizot (4), however, inoculated a *Bonnet chinois*, which is smaller than the Rhesus, 16 times in a period of 60 days, using human leprosy material. From April 10, 1950 to August 8, 1951, Rhesus N.º 2 suffered 9 biopsies, for bacteriology, histopathology and inoculation purposes. The material resulting from the first biopsy, effected on April 10th 1950, the 19th day after inoculation, revealed an abundance of a.a.f. bacilli in smears and sections, its histopathology, according to Professor Magarinos Torres (P.C. 16.398), was found to be similar to that of the human leproma. The 2nd inoculation was carried out on April 29, 1950, using a tumour suspension of Rhesus N.º 3 infected by the "Emilia" culture. 15 days later the two malar nodules looked like florid lepromas, and their bacilloscopy was found to be positive. 70 days later (June 20, 1950) the monkey had a normal appearance, and was inoculated with the "Emilia" retroculture of Rhesus N.º 3. Both local and general reactions were much more violent than those resulting from the tumour inoculation. On July 5th, I extirpated this monkey's four facial nodules, sending two to Dr. Arthur Porto Marques, from the Leprosy Service of the Distrito Federal, for his personal studies.

the remaining two being used for bacteriology and histopathology. The smears of these tumours, stained by the Ziehl-Neelsen, Gram and Fontes methods, were found to be positive. The suspensions of these tumours gave positive results for fluoroscopy and the Dubos reaction for virulence. On July 17th, the fluoroscopy of the monkey's faces was found to be positive for a.a.f. bacilli. On this date I extirpated the last residual forehead nodule, also positive for a.a.f. bacilli. On August 10th, the 50th day after inoculation, I found the animal to be very thin, with palpable inguinal ganglions, nasal mucus (++) positive for a.a.f. bacilli, similar to these of the inoculum. On that same day the animal was reinoculated (4th inoculation) using its own culture ("Emilia" strain) obtained from the biopsy effected on July 5th, this reaction being more intensive than the former ones, resulting in nodules which started ulcerating 10 days later, and which were healed after a 60 days' period (October 10th). On October 20th (the 70th day after the last inoculation), the monkey was once more inoculated with a retroculture of a white rat, from the same «Emilia» strain. Reactions, both local and general, were found to be stronger than the preceding ones. Inoculation of human bacillus culture into the rat seems to have greatly increased its virulence. The histopathologic examination of the 5th biopsy, effected on Nov. 8, 1950, according to Dr. Jorge P. Guimarães report (P.C. 16.792), revealed outlines of a tuberculoid granuloma, which constitutes a matter of considerable pathologic significance.

On the 30th day after the 5th inoculation (Nov. 20th), the (++) positive pus collected from the lesions was treated and sown into the adequate media. On the 60th day (Dec. 20th), there could still be seen large facial tumours; alopecy spots were found on head and body of the monkey. The bacilloscopy of the nodules remained positive until Feb. 1, 1951 and on the 19th and 26th of this same month it was still possible to effect material collection in these nodules, for bacilloscopy purposes. After a 6 months' rest, I proceeded to the 6th inoculation of the monkey (April 25, 1951) using as an *inoculum* the 2nd generation of the Rhesus own retroculture, "E" strain. Once more the animal reacted violently. On the 3rd and 9th of May, pus and skin for bacteriology was collected from the lesions. The bacilloscopy resulted positive. After an eleven weeks' rest in the general bioterium, the 7th inoculation was carried out, on August 14, 1951, using only 1cc. of the «E» culture, obtained by means of inoculation into Rhesus N.º 3. Local and general reactions were still found to be rather strong; there were formed 3 nodules, at noseroot and malar regions. Bacilloscopy of feces and nasal mucus of this monkey, effected on Aug. 28th, was positive for a.a.f. bacilli, as before. The 3 nodules were then extirpated and their bacilloscopy was found to be strongly positive.

The material resulting from this 9th and last biopsy was submitted to histopathology. Dr. Rita Cardoso's report (P.C. 17.351) revealed a granuloma of epithelioid cells and rare giant cells. This retrogressive tendency of a structure similar to that of the human leproma (P.C. 16.398), for a granuloma of the tuberculoid type (PP. CC. 16.792 and 17.351), is very significative.



RHESUS N.º 3 — Inoculated on April 13, 1950, using 2cc. of a suspension of the "Emilia" culture, into forehead and malar regions. On the 12th day after inoculation, it presented a *facies lepromatosa* so characteristic that it was decided, 3 days later (April 28, 1950), to have it decapitated in order to preserve the piece at the Pathology Museum of the Instituto Oswaldo Cruz. After the 11th day of inoculation, nasal mucus and feces of this monkey were found to be positive for a.a.f. bacilli.

Histopathologic examination of facial tumours of the monkey (P.C. 16.480) revealed «an acute haemorrhagic-purulent process associated with a.a.f. bacilli» and, according to Dr. Jorge P. Guimarães, not similar to a leproma. However, upon examination of new sections from fragments of the Museum piece, which had been preserved in Kayserling fluid for 30 days, the same anatomo-pathologist says: "We found an extensive inflammatory process in the derma, the border of which contain many vacuolated macrophagi with a morphology resembling that of the leprous cell». June 7, 1950.

New fragments of this piece, which had been preserved in Kayserling for 51 months (P.C. 19.156) showed well-preserved histologic structure and a sub-cutaneous abcess containing a.a.f. bacilli. New sections from the P.C. 16.480 block, from May 30th 1950, stained on Dec. 30th 1954 by the HE and ZN methods and examined by Dr. Eithel Duarte, revealed a tuberculoid granuloma structure, with many a.a.f. bacilli. The same block that on May 30, 1950 contained vacuolated macrophagi resembling leprous cells, by Dec. 30, 1954 comprised a tuberculoid granuloma with many a.a.f. bacilli.

Two experimented anatomo-pathologists found in the lesions of Rhesus N.º 3 the same that is frequently found in human leprosy, namely alternation of lepromatous and tuberculoid granulomas. This is what is nowadays called bi-polar leprosy.

RHESUS N.º 4 — Inoculated into the face, on April 13, 1950, using a bacilli poor emulsion, from the nodules of Rhesus N.º 2. infected with the "CI" culture on March 22, 1950. This "passage" apparently remained negative until May 5, 1950, when the monkey was inoculated with the "CI" retroculture from the same April, 13th biopsy, 2cc into eyebrows and malar regions. It seems that the monkey became hiper-sensitized as a result of the first inoculation, because 24 hours later it showed strong tumefaction at the four inoculation points and, on the 12th day (May 23), 4 large nodules resembling florid lepromas, on forehead and cheeks. The pus that was collected on this occasion, from the right cheek nodule, revealed an abundance of bacilli and globi, confirmed by a strongly positive fluoroscopy. On that same day the examination of feces and nasal mucus of the monkey revealed the existence of a.a.f. bacilli.

On May 25 the 2 larger nodules were extirpated for bacteriology and histopathology, the smears of which, stained by the ZN method, revealed innumerable bacilli and globi. Their histopathologic examination (P.C. 16.476, dated June 7th 1950) disclosed a peculiar inflammatory process,

constituted predominantly by macrophagi, without either giant cells or caseation necrosis, positive, however, to a.a.t. bacilli, «a histopathologic configuration which does not strictly correspond to that of the granuloma of human leprosy» (Dr. J. P. Guimarães).

By June 1st the sowings of pus collected on May 23rd were germinating in 6 tubes with Loewenstein medium. Two frontal nodules were extirpated (2nd biopsy) and their pus was found slightly positive. On the 15th day after the 2nd biopsy two small secondary nodules appeared, the size of grains, on forehead and right nostril. The wounds resulting from the biopsies took a long time cicatrising, since the animal insisted on taering off and eating crusts. The nasal mucus bacilloscopy, effected on August 8th 1950, three months after the inoculation, was strongly positive, as can be seen in Fig. 5, Plate 1. On that date the monkey was inoculated using 1.5cc of a suspension of its own retroculture, originated from the biopsy effected on May 25, 1950. Next day the animal demonstrated great suffering and refused food; on the 2nd day an intense and diffuse erithema appeared all over its face, persisting for 15 days. By Oct. 26th a secondary nodule could be seen on its left eyebrow, resembling a leproma; since the wounds resulting from biopsies were healed, the monkey was again inoculated using 2cc of a «CI» culture emulsion, retroculture of Rhesus N.º 5, passage of Rhesus N.º 4, into malar regions only. Forty-eight hours later general conditions were much worse and a diffuse erithema appeared all over the monkey's face. The results of the histopathologic examination of the biopsy effected on Nov. 1st, 1950 (P.C. 16.783), of a secondary nodule and of a nodule resulting from the new infection, were very significative. The report, prepared By Dr. J. P. Guimarães under Dr. Magarinos Torres's supervision (Dec. 8, 1950), reads as follows in a final Note: "*The histopathologic configuration maintains points of contact with the leprotic reaction, lepromatous type, as described for human material.*" The fifth and sixth reinoculations presented nothing of importance comparable to the above described.

RHESUS N.º 5. Inoculated on May 25th, into eyebrows and malar regions, using 2cc of the tumour suspension of Rhesus N.º 4, infected with the "CI" culture, 3 + positive bacilloscopy; beginnings of cutaneous nodulations were observed only 20 days later (June 14th). On June 6th the right-eyebrow tumour was extirpated, the smears of which revealed strongly fluorescent a.a.f. bacilli; the sowings produced a good retroculture. On that same day, it was reinoculated with a retroculture of Rhesus N.º 4, originated from Rhesus N.º 2, again into eyebrows and malar regions; reaction was moderate and pus sowings from one of its nodules, effected on June 28th, started germinating on July 8th. It was reinoculated on August 11th, with this same retroculture, with more violent reaction than the former ones, whereupon its nasal mucus was found to be positive to bacilloscopy and fluoroscopy.

On Oct. 26th and Dec. 20th this monkey was submitted to two further reinoculations, and their results were similar to the preceding ones; the 6th inoculation, however, effected on April 25th 1951, using a «Maria D» cul-



ture (retroculture of the "CI" strain), in a dosis of 1.5cc, had the most violent reactions. By May 22nd, the monkey presented several secondary nodules; on this occasion it was exhibited to the doctors of the Bacteriology Section and biopsied. In accordance with a histologic examination carried out by Dr. J. P. Guimarães (P.C. 17.071, on June 1st, 1951), a granuloma with macrophagi predominance was found, as well as some giant cells and eosinophile leucocytes. After a 3 months' rest in the General Bioterium, this Rhesus was again inoculated, on Aug. 14th, using the same "M. D." retroculture; strong local reactions appeared on the following day. On Aug. 28th, two of its forehead and right cheek nodules were extirpated and used for bacteriology. From the histopathologic examination of one of these nodules, effected by Dr. Rita Cardoso (P.C. 17.352, Sept. 11th, 1951) there resulted a granuloma with epitelioid cells and giant cells of the Langhans type, which is of the greatest importance for the type of lesion studied.

The retroculture obtained from this Rhesus, examined in December 1954, and sections and smears of the experimental phase present the same primitive characteristics.

RHESUS N. 6 — Having noticed that the "Maria D." culture was rather virulent for the Rhesus, I inoculated Rhesus N.º 6, adult female, not exposed to any prior experiments, with 1.5cc emulsion of this culture, for the special purpose of producing lepromas for the preparation of Lepromina. A 0.5cc dosis of this culture was injected into the forehead and equal dosis into each malar region, on Nov. 5th 1951; on the following day there could already be seen large and acute nodules at the points of inoculation. Ten days later (Nov. 14th) the three nodules (Fig. 28, Plate 6) were extirpated and their smears resulted strongly positive for isolated a.a.f. bacilli, as well as for intra and extracellular globi; histopathology was performed (P.C. 17.537).

With the remaining two nodules I prepared 20cc of Lepromina, according to the Fumio Hayashi method, and used on human beings in comparison with Hansen and Stefansky Lepromins, a subject about which I shall make a report in another paper.

On the 62nd day after this inoculation I proceeded to the extirpation of the residual nodule on the monkey's forehead; which smear was negative for a.a.f. bacilli, as were the sections (P.C. 17.608, Jan. 23rd, 1952).

More or less 48 months after this biopsy, I, re-examined the sections corresponding to P.C. 17.537: those stained by the HE method revealed granulomas in which there was found a predominance of macrophagi and the ones stained by the ZN method (the coloration of which was surprisingly well-preserved) showed granulomas heavy with a.a.f. bacilli, either isolated, in bundles or in globi, both extra- and intracellular, in macrophagi and in polymorphocellular leucocytes. It is not possible to tell the difference between these sections and those of human florid lepromata.

RHESUS N.º 7. This monkey, that had already been used by Dr. Henrique Penna in connection with yellow fever studies, was inoculated on

April 23rd, using a «Jesus» culture (retroculture of an experimental lesion caused by injection of the «CII» culture). A dosis of 0.5cc of this suspension was injected into the monkey's forehead, and the same amounts into cheeks and under right nipple (where the skin is very hairy). Four hours later the animal, despite its size (it weighed 5kg) and strength, seemed very tired, with strong swelling on the face; forty-eight hours later there could be seen three large, lentil-sized, reddish nodules. During the second week (May 7th) a hard infiltration was felt on its chest, with a diameter of about 2cm, and on its face three grain-sized nodules; one half of the forehead and right cheek nodules was extirpated for bacteriology, histology and inoculations, which smears, stained by the ZN method revealed the existence of giant and granulous a.a.f. bacilli and from one of the nodules and excellent retroculture was obtained. From the histopathologic examination there resulted (P.C. 17.815) a granuloma similar to the ones previously described, with a predominance of plasmatic, giant and large mononuclear vacuolated cells, many of which containing a.a.f. bacilli. With this Rhesus the series of experiments was stopped.

*Cebus fatuellus* Ns. 1 and 2. Dr. Henrique Penna had the kindness of sending me a couple of *Cebus* for my experiments and, despite the fact that these are monkeys with very dark and hairy skin, of difficult observation, I inoculated them, on Oct. 26th, 1950, using 1cc. of the «CI» inoculum for each. Two months later the male *Cebus* presented a small nodule on the forehead, whereas nothing could be noticed in the female. On Jan. 5th, 1951 I again inoculated them and the feces bacilloscopy of both, effected on Jan. 8th, 1951, revealed many a.a.f. bacilli. On Jan. 25th I extirpated the male's frontal nodule and the corresponding smears revealed an abundance of bacilli, either isolated or in globi, intra and extracellular, as did also the histologic cuts (P.C. 16.905). These cuts, stained by the ZN method, were found to be as rich in bacilli as those of Rhesus N<sup>o</sup> 6.

The female *Cebus* did not react and was killed 110 days after the first inoculation: the examinations of skin, lymph-nodes and viscera all resulted negative.

### CONCLUSIONS

1. The inoculation of a.a.f. bacilli cultures from lepers produced in the Rhesus' hairless skin nodular lesions which were found similar to lepromas, without generalization to either hairy skin or entrails, notwithstanding timely elimination of bacilli through feces and nasal mucus.

2. The histopathology of these nodules revealed, in some instances, a lepromatous structure followed by a tuberculoid one in reinoculations, which was a proof that there exists a certain degree of immunity.

3. Bacilli were always re-isolated from primary lesions, and, as a rule, these retrocultures were found to be more virulent for monkeys than the suspensions of the respective tumours.



## BIBLIOGRAPHY

1. SOUZA-ARAUJO, H. C. de  
1950. Caso de lepra maligna (L2-N1) que regrediu rapidamente sob a ação duma terapêutica mista (Sulfona-Fisioterapia). Memórias do Inst. Osw. Cruz, T. 48, Ano 1950, 101-112.
2. SOUZA-ARAUJO, H. C. de  
1950. Bacteriology of Human Leprosy: Two New Chromogenic Cultures of Acid-Fast Bacilli Isolated from Two Patients, Pathogenic for Laboratory Animals and for Man. Fulfilment of Koch's Postulates. Abstracts of Papers, Fifth International Congress for Microbiology, Rio de Janeiro, August, 1950, pp. 63/4.
3. SOUZA-ARAUJO, H. C. de  
1951. Demonstration of two new cultures of *Mycobacterium leprae hominis* (Strains «Chaves» and «Emilia») pathogenic for *Macacus rhesus* and Man. Transactions, Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 45, N° 2, October, 1951, pp. 151/3.
4. CH. NICOLLE ET BLAIZOT  
1913. Essai de Reproduction de la Lèpre chez le Chimpanzé et les Singes inférieures. Arch. de l'Institut Pasteur de Tunis, Avril 1911, p. 275. Résumé: LEPRO, 1913, Vol. 13, pp. 68/70.

## RECORDS OF THE INOCULATIONS

*Rhesus* n.º 2 — Male, age four months, weight 2,500 gms.

22-3-50. *First inoculation* — A total culture of 1.5cc. in 5% glycerin broth, of 29-12-49 from a "Chaves" strain, (80 days old) 0.5cc of which were inoculated into the forehead and 0.5cc into each malar region, subcutaneously.

Inoculum smear + + +. Acid-alcohol fast bacilli only.

23-3-50. 24 hours later: a violent local reaction could be noticed, especially on forehead. The animal was very restless.

24-3-50. Restlessness persists and animal suffers intensely. Acute nodulation appeared at each inoculation place.

25-3-50. The animal is calmer, and the nodule on the right cheek is the more noticeable.

29-3-50. The animal begins to take more nourishment and the inflammation went back. 1-4-50. Forehead nodule bigger.

5-4-50. 14th day after inoculation: the animal, presenting wide-spread facial tumours, is shown to Drs. Magarinos Torres and Arêa Leão. It was photographed on this date. Cyanotic facial skin. Left-side cheek nodule is flattened, size of about 2x1 cm.; 1 cm. below, a secondary cyanotic nodule was noticed, looking like a florid human leproma. On April 8th, the nodules were considerably larger.

10-4-50. 19th day after inoculation: a new photo was taken. *First Biopsy* — Right malar tumour. Smear + + +. A portion of the tumour was treated and inoculated into several tubes with Loewenstein medium; the rest was sent to Dr. Magarinos Torres, for histopathologic examination. P.C. 16.398, 12-4-50. Result of anatomo-pathologic examination of the skin of a Rhesus inoculated with "Chaves" strain culture 19 days before:

"Extensive inflammatory reaction of the derma, predominance of large mononuclear cells (macrophagi) and occasionally vacuolated cytoplasm. Heterophile leucocytes (purulent inflammation) also found in several areas. Where exsudate is formed almost entirely by macrophagi, there could be noticed acid alcohol fast bacilli in small numbers. The microscopic similarity noticed between this granuloma and the human leproma consists in their well-defined limits, the zone of the typical granuloma being followed by another one,

where the derma maintains its normal structure. The above description applies to both pieces that were sent us by Dr. Souza-Araujo.

Manguinhos, April 12th 1950. Dr. C. B. Magarinos Torres, Chief of the Pathology Division."

13-4-50. 22nd day after the inoculation: The second Biopsy was performed by Dr. Murillo Fontes, using Novocain as anaesthetic. Two nodules were extirpated, one on forehead and one on the left cheek. A suspension of these two nodules was inoculated into Rhesus N.º 4, and part of it was treated with a KOH solution and inoculated into 12 tubes with Loewenstein medium. The biopsy blood smears, stained by Ziehl-Neelsen revealed some a.a.f. bacilli. Fragments of the skin around these tumours were sent to Dr. Magarinos Torres, for histopathologic examination, results of which were as follows:

P.C. 16.406, 15-4-50. Fragments of the skin of Rhesus N.º 2, inoculated with a "Chaves" culture on March 22nd. "The fragment is surrounded by stratified pavement epithelium. Deeply seated in the derma there is a large well-defined nodule, composed of mononuclear cells, some with vacuolated cytoplasm, spindle-shaped cells and lymphocytes. Occasional polymorphonuclear cells may be noticed. Research revealed a few acid-alcohol fast rods.

Rio, December 20th 1950. Dr. Jorge P. Guimarães."

14-4-50. The animal suffers under the effects of the biopsy and takes very little nourishment.

15-4-50. The animal begins to feed better and the wounds are healing.

29-4-50. Wounds cicatrized. The small residual nodules remain on the left malar region.

29-4-50. *Second Inoculation* — 5 weeks after the first a second inoculation was made into the right malar region and into the forehead, with a bacilli-poor emulsion, from pus extracted from the facial lesion of Rhesus N.º 3, that had been inoculated with the "Emilia" culture.

1-5-50. No local reaction could be noticed. Some of the tubes with Loewenstein medium, sown on April 10th and 15th with material from this Rhesus showed germination of yellow colonies, similar to the inoculated "Chaves" strain. On the fifth day after inoculation there began to appear excrescences on forehead and right malar region.

10-5-50. From the 12 tubes of Loewenstein medium, sown on April 15th, 7 show germination similar to that of the inoculated culture.

12-5-50. Examination: Two distinct grain-sized lepromata could be seen on the forehead and felt, infiltration on the right side of the face. When the monkey was taken out of its cage, its left malar scar was hurt; a smear thereof revealed some a.a.f. bacilli.

13-5-50. The swelling on the right malar region begins to look like a nodule; hairs round the frontal nodule fell off.

5-6-50. There was noticed a definite regression of the above lesions.

20-6-50. *Third inoculation* — Inoculation of 2 c.c. of a suspension of the "Emilia" retroculture from June 12th obtained from Rhesus N.º 3, in equal amounts (0.5 cc.) injected into each malar region and over each brow.

21-6-50. The animal looks very sick, with violent local reaction. On June 23rd the monkey still seemed sick, inappetent and sad. The inoculation produced large cyanotic nodules. 26-6-50. New photos were taken.

29-6-50. The four congested nodules — two on forehead and one on each cheek are still apparent, about the size of a hazel-nut. The animal's general condition is improved. The pathologist Dr. Jorge P. Guimarães examined all three Rhesus inoculated with a.a.f. bacilli cultures from leprosy patients.

30-6-50. Dr. Arthur Marques Porto, from the Federal District Leprosy Service, came to see the three monkeys affecting leprotic facies.

5-7-50. *Third Biopsy* — Dr. Vianna Dias anaesthetized the monkey with Ciba DIAL, 0.5 cc. p/kg. The animal slept for 2 hours. Four ulcerated nodules were biopsied by myself, and two were sent to Dr. Arthur Marques for his own studies. Fifteen tubes with Loewenstein medium were inoculated with pus *in natura* and tumour suspension. The pus smears of each lesion revealed many a.a.f. bacilli similar to those of the "Chaves" strain, some of them with ramifications, positive by fluoroscopy, as verified by Dr. Laerte



Andrade. The results of the examination of a nodule sent to the Pathology Division are included in P.C. 16.559, 6-7-50. Anatomico-pathologic examination of a skin fragment of a Rhesus monkey inoculated with the "Emilia" culture:

"The fragment is surrounded by stratified pavement epithelium with partial destruction and infiltration by polymorphonuclear leucocytes and fibrine (ulceration). In the derma, a diffuse inflammatory cell infiltrate was found, composed especially by lymphocytes and mononuclear cells, some of which with vacuolated cytoplasm. Spindle-shaped cells and polymorphocellular leucocytes were also noticed. Attention was called to the presence of hemorrhage. No acid-alcohol fast bacilli.

Rio, December 20th 1950 — *Jorge P. Guimarães.*"

17-7-50. *Fourth Biopsy* — One of the monkey's residual forehead nodules was removed and sent to the Pathologic Anatomy Section, for examination. Some a.a.f. bacilli were found in the feces of the animal, as expelled during the biopsy.

P.C. 16.600. July 17th 1950. Examination of a forehead skin fragment (nodule) of Rhesus N.º 2, inoculated with the "Emilia" culture: "The fragment is covered by apparently normal epidermis. Several nodules of a peculiar inflammatory process are noticed in the hypoderma. Fundamentally large, mononuclear cells, the cytoplasm of which seems to be continued by fibres, establishing reciprocal connections among them; in some parts these elements are shaded due to the presence of intensely hematoxylin stained granules (necrosis area with caryorrhexis); a strong ectasia of capillaries and hemorrhage are noticed at the level of these foci. No a.a.f. bacilli were found.

Manguinhos, August 8th, 1950. *Dr. Jorge P. Guimarães.*"

P.C. 16.601. July 17th 1950. Fragment of the ulcerated lesion of the axilla of Rhesus n.º 2, inoculated with the «Emilia» strain. «The fragment comprises striate muscle and an abundance of fibrous conjunctive tissue, in which a chronic inflammatory process is noticed. The proliferation of fibrocytes and collagen fibres predominates over the cellular infiltration. Absence of acid-alcohol fast bacilli.

Manguinhos, August 10th, 1950. *Dr. Jorge P. Guimarães.*"

10-8-50. Examination of the animal: thin; unpalpable lymph nodes; complete alopecia of tail. Bacilloscopy of the nasal mucus; positive (++) .

10-8-50. *Fourth Inoculation* — Suspension of the animal's own culture, obtained from pus treated with soda, at 7-7. 1.5 cc. were inoculated into three different points: nose root and malar regions.

11-8-50. Intense local reaction, with remarkable swelling in the inoculated areas. The animal's general condition is good and it takes nourishment regularly.

12-8-50. Animal still in good general condition, in spite of acute nodulation in the inoculated areas. On August 20th the nodules were larger and started ulceration.

1-9-50. Regress of all three nodules. The animal was bled, and 5cc. of blood were obtained for Dr. Nicanor Botafogo's studies.

10-10-50. Animal in good general conditions and skin is cicatrized.

20-10-50. Monkey's appearance is normal: 70th day after last inoculation.

*Fifth Inoculation* — 2cc. of an "Emilia" retroculture suspension, obtained from a white rat killed on July 10th, 1950, were injected into four different points, in the forehead and malar regions.

21-10-50. The animal's face is all swollen up and cyanotic and the monkey seems to be suffering very much. On October 24th the local reaction was still worse and the four injected points already presented nodulation.

26-10-50. Improvement in general condition of the animal, but nodules are larger.

30-10-50. The animal presents two large and acute nodules over the brows, another on the left cheek and extensive infiltration in both malar regions.

3-11-50. Increase of cutaneous lesions. On November 7th a new photo was made. The pus extracted from the lesions was strongly positive for intra and extra-cellular a.a.f. bacilli, similar to those of the "Chaves I" strain. Apparently the passage of the "Emilia" strain culture in a rat increased its virulence.

8-11-50. *Fifth Biopsy* — Three nodules were excised, without use of anaesthetic, two from the forehead and one the right malar region. The pus smear revealed many intra and extra-cellular a.a.f. bacilli, and much less in a skin smear. One nodule was treated for sowings, which, as usual, produced retroculture. Fragments of three nodules were

sent to the Pathologic Anatomy Section, and the results of their examination are as follows:

P.C. 16.792. November 9th, 1950. Skin fragment of a Rhesus reinoculated with "Emilia" culture on October 20th, 1950:

"The sections show that the epidermis does not reveal noticeable changes. All over the derma an inflammatory granuloma, in the form of nodular infiltrates formed predominantly by spindle-shaped cells (epithelioid cells?), and lymphocytes, in a follicular disposition, may be noticed. Nodules of larger proportions indicate the central necrotic zone, with polymorphonuclear infiltration. Research for acid-alcohol fast bacilli was negative.

Rio, December 11th, 1950. Dr. Jorge P. Guimarães."

Unfortunately the better part of the material of this 5th Biopsy has not been used, and the absence of bacilli, which were found in great numbers in the smears, is rather strange. The above report states that an examination was effected "of a skin fragment" and not of a nodule that simulates a leproma.

10-11-50. *Sixth Biopsy*, for bacteriology, only.

20-11-50. Pus was collected and examined and found positive (++) . It was treated and inoculated into adequate media.

20-12-50. The large facial tumours persist and there appeared alopecia on the head and all over the body. A tube with Loewenstein medium was inoculated with pus still positive for a.a.f. bacilli. On the 26th, the animal's condition was the same.

5-1-51. Biopsying a secondary nodule of the monkey's left cheek, which was several days old and simulated leproma, I found it to be going back. A puncture of the right-side face tumour furnished plenty of a caseous pus, the smear of which, stained by Z-N, indicated scarcity of bacilli. On January 26th, a new pus extraction was made, which was treated by soda and inoculated into four tubes with Loewenstein medium.

1-2-51. The animal was once more photographed. A new puncture of the right-side face tumour gave an abundance of caseous pus, the smear of which was feebly positive, but in spite of this condition the pus was treated and sown into Loewenstein.

10-2-51. Two of the last inoculated tubes present several yellow colonies, circular and wide-spread, which, by the 19th of the same month, were welldeveloped and pure.

19-2-51. Two pus samples were aspirated from the lesions, treated separately and inoculated into four tubes with Loewenstein medium and three with glycerin broth.

26-12-51. A new biopsy of the right malar region was performed for bacteriology. The animal was transferred to the General Bioterium, while I undertake a trip to Argentina.

4-4-51. The monkey was once more transferred to the laboratory, in good general condition and with the residual facial lesions much reduced. It rested for twenty more days, completing 56 days' rest.

25-4-51. *Sixth Inoculation* — The animal was re-inoculated into two different points of the forehead and into the malar regions, with 1.5cc. of an "Emilia" culture suspension, second generation, from 4-1-51. On the next day, intense reaction could be seen.

28-4-51. Definite nodulation and reddish skin.

3-5-51. A new photo was taken. *Seventh Biopsy*. The material obtained was sent to Dr. M. Torres. Second bleeding: 3cc. were sent to Dr. Julio Muniz. Pus *in natura* was inoculated into four tubes with Loewenstein medium. Pus smears stained by Z-N and Fontes, were positive. P.C. 17.040. May 3rd, 1951. Tumour fragment of a Rhesus inoculated on 25-4-51 with its own retroculture from the "Emilia" strain.

"Microscopic examination of the sections shows, at one point, an interruption in the epidermis continuity (ulceration). Intensive inflammatory cell infiltration in derma and hypoderma, consisting of great mononuclear cells (macrophagi), occasionally of vacuolated cytoplasm and polyphormonuclear leucocytes; these do sometimes form micro-abscesses. Veins and arteries of this region are dilated and congested. Areas of edema and small hemorrhage foci may also be noticed. Presence of acid-alcohol fast rods.

Rio, May 29th, 1951. Dr. Jorge P. Guimarães."

9-5-51. A new biopsy for bacteriology was performed, from the rightside facial nodule. Feces positive for a.a.f. bacilli. Germination was found present in several sowings.

22-5-51. *Eighth Biopsy* — Nodules were excised from brow and left cheek. A part of such material was used for bacteriology and the rest was sent to the Pathologic Anatomy Section for examination.



P.C. 17.072. May 23rd, 1951. Fragment from the left cheek lesion of Rhesus N.º 2, inoculated on 25-4-51, with a suspension of the «Emilia» culture from 4-1-51. Results of the examination :

"The sections examination shows, at one point, interruption of the epidermis (ulceration). In the derma and hypoderma, there was found an inflammatory cell infiltrate, with a predominance of large mononuclear cells (macrophagi) and sometimes of vacuolated cytoplasm and polymorphonuclear leucocytes. The blood vessels of the region are dilated and congested, and hemorrhage foci are frequent. Circumscribed necrose areas can also be observed. No acid-alcohol fast bacilli were found. Rio, June 1st, 1951. S/ Dr. Jorge P. Guimarães."

(May 22nd) The animal was sent back to the General Bioterium, for rest and fattening.

14-8-51. The monkey returned to the laboratory in excellent general conditions.

*Seventh Inoculation* — With 1.0 cc of a suspension of an "Emilia" retroculture from Rhesus N.º 3, was inoculated into the forehead and malar regions, 1/3 cc into each point. The inoculum was a 22-5-50 Loewenstein culture.

15-8-51. The animal looks depressed and refuses to take nourishment; swellings and erithema all over its face. On the next day, erithema had decreased and nodulation began to form at the inoculation places. On 17-8 these nodulations were about the size of common olives.

21-8-51. The nodule at the root of the nose is the larger and the one on the right cheek suppurated. Two nodules were formed on the left cheek, the smaller, apparently a secondary one, situated in the angle of the eye.

24-8-51. The forehead nodule is the larger and more integrated; those on the cheeks are regressing, and the small secondary nodule augmented a little.

28-8-51. *Nineth Biopsy* — Three nodules were extirpated, one from the forehead, and two from the malar regions. Roasted coffee powder, which is an excellent hemostatic, was used. The pus obtained was inoculated *in natura* into two tubes with Loewenstein medium and its bacilloscopy resulted slightly positive. The animal's feces, collected on that occasion, also contained but few bacilli. A fragment sent to the Pathologic Division for study resulted in the following P.C. 17.351, 29-8-51:

Skin fragment of a Rhesus inoculated with an "Emilia" culture (retroculture from Rhesus N.º 3) inoculated on August 14th :

"Derma infiltration of groups of large mononuclear cells, with abundant cytoplasm of variable form, occasionally forming a reticule. Besides these cells, which constitute the majority and which have a morphology of epithelioid cells, there are also noticed lymphocytes, some polymorphonuclear leucocytes and a few giant cells. Epidermis without alterations. Absence of acid-alcohol fast bacilli, in the cuts that were examined.

Rio, September 11th 1951. *Dr. Rita Alves de Almeida Cardoso.*"

11-9-51. The monkey's facial lesions are almost cicatrized. There still remain one nodule on the left cheek and another, a secondary one, in the outer angle of the right eye.

15-10-51. Examination of feces: Negative for a.a.f. bacilli. The animal presents only one residual nodule on the left cheek and was returned to the Bioterium for resting and fattening and later utilization for other purposes.

December, 1954 — About 50 months after the experiments, a reexamination of the smears of the nasal mucus of rhesus 2, the skin of the cheek of rhesus 4, passage of the infection from rhesus 2 and the *inoculum* (culture "E"), stained by Z-N respectively on August 10, 1949, May 25 and July 7, 1950, were inalterated, showing acid-fast bacilli isolated, in bundles, intra or extracelulares. Also the sections of the lesions, stained by H-E were inalterated.

RHESUS N.º 3. Male, four months old. 13-4-50. *1st Inoculation*: With 2 c.c. of suspension of the "Emilia" culture, in Loewenstein medium, from 1-4-50: 12 days old. One half of the suspension was injected into the eyebrows and the other half into the malar regions, as always sub-cutaneously.

17-4-50. Nodular inflammation at the points of inoculation.

21-4-50. 8th day after the inoculation: more intensive inflammation, redcoloured and simulating a lepromatous leprosy L3.

24-4-50. 11th day after inoculation: as the monkey was roped in order to be photographed, three facial tumours burst open. The pus was collected with a pipette and inoculated, *in natura*, into 3 tubes with Loewenstein medium. Another portion of that pus, after treatment, was sown into 5 tubes of Loewenstein. The smears obtained from this material, stained by the Ziehl-Neelsen method, resembled the smears of a leproma emulsion. The feces revealed some a.a.f. bacilli. The nasal mucus, feces and pus smears, examined on the 25th by Dr. Laerte de Andrade, resulted positive to fluoroscopy.

25-4-50. 12th day after inoculation: The monkey was decapitated by Dr. Murillo Fontes, for conservation of the head in the pathology museum. Fragments of the tumor and viscera and lymph nodes were sent to Dr. Magarinos Torres for the respective histopathologic examination. The pus smears revealed an abundance of a.a.f. bacilli, while those of skin and lymph nodes were poor.

P.C. from 28-4-50. Rhesus N° 3. Nature and origin of the tissue: P.C. 16.429. Facial skin fragment, comprising a large tumour; inguinal and axilar lymph nodes, and testicles. P.C. 16.430: liver, spleen, kidney and lung. Observation: the Rhesus was inoculated, with an emulsion obtained from a culture of the leproma Emilia, on 13-4-50. Results of the anatomo-pathologic examination: "Skin fragment (comprising the lesion referred to in the above information). An acute purulent-haemorrhagic inflammatory process can be noticed, associated to destruction of the epidermis (ulceration). Presence of a.a.f. bacilli, in the inflammatory exsudate. The examination of the viscera reveals hiperhaemia of liver and kidneys, while the spleen retains its normal structure.

*Resumé:* The animal presents an acute haemorrhagic-purulent process in the skin lesion, associated to the presence of a.a.f. bacilli. There is no leproma-like granuloma. Absence of inflammatory lesion in the examined viscera. Manguinhos, May 25th, 1950. s/ Dr. Jorge P. Guimarães."

29-4-50. The pus taken from the tumours was submitted to a soda treatment, as well as the suspension of the skin triturate, and were sown into 12 tubes with Loewenstein medium, one with potato and another with glycerin broth. The smears were found ++, as well as the fluoroscopy of the pus, as verified by Dr. Laerte. When the smears were re-examined 15 days later (on the 11th of May) they were still fluorescent. On May 11th some of the tubes with Loewenstein medium showed germination of yellow colonies. This retro-culture was later on inoculated into Rhesus N° 2. (14-8-51).

28-5-50. *Necropsy:* Extirpation of a skin fragment from the frontal lesion of the head which had been preserved during 30 days in Kayserling solution and sent to the Pathologic Anatomy Section.

P.C. 16.480, from 30-5-50. Facial skin fragment of Rhesus N° 3. Results of the anatomo-pathologic examination: "The material comprises an epidermis that does not show any noteworthy lesions. In the deep portion of the derma there is an inflammatory process, which seems to have been caught by the biopsy in only one its margins. In this zone attention was called by the existence of great mononuclear cells, with vacuolated cytoplasm. The reticule interposed between the vacuoles is stained blue by hematoxylin. In this extensive inflammatory area in the deep portion of the epidermis there was noticed peri-vascular infiltration (lymphocytes and macrophagi) in the sub-papillar plexus. The presence a.a.f. bacilli was observed.

*Resumé:* An extensive inflammatory process could be noticed in the derma, at the borders of which there were numerous vacuolated macrophages, with a morphology resembling that of the leprosy cell. — Manguinhos, June 7th, 1950. — Dr. Jorge P. Guimarães."

On the 15th of July, 1954, after about 51 months that the material (head) of Rhesus N° 3 having been preserved in Kayserling solution, two fragments were cut by me from the borders of two facial lesions and their smears revealed an abundance of a.a.f. bacilli. This material was sent to the Pathologic Anatomy Section, for study.

P.C. 19.156, from 15-7-54. Facial and forehead skin of a Rhesus monkey inoculated with leprosy by Dr. Souza-Araujo. Observation: the material was preserved, for a long time, in a Kayserling solution.

Results: "The skin sections show a well-preserved histologic structure, and the tissues are excellently stained by the hematoxylin eosin. In the sub-cutaneous cellular tissue there is a large badly-defined abscess, with leucocytes in a state of desintegration and



necrosed tissues. Presence of a.a.f. bacilli in the sections by the Ziehl method. — Rio, October 1st, 1954. Dr. Eitel Duarte."

RHESUS N.º 4, Male, one year old. Weight 4 kgs.

13-4-50. *Ist Inoculation*: with 3 c.c. of an emulsion from two nodules of Rhesus N.º 2, which had been inoculated on March 22nd, with the «Chaves I» strain, and biopsied to day. This emulsion presented but few bacilli. *Ist passage*.

17-5-50. Apparently, there is no reaction.

20-4-50. To this date, nothing has been noticed. The animal was transferred from the bioterium to the laboratory. From the 1st until the 12th of May nothing could be perceived or felt by palpation.

12-5-50. *2nd Inoculation*: 2 cc. of an emulsion from the "Chaves I" retroculture, obtained from the leproma of Rhesus N.º 2, which had been biopsied on 13-4, were subcutaneously injected — 1 cc into the forehead, in two different places, and 1 cc into the cheeks.

13-5-50. Tumefaction at the four points of inoculation. The animal is yawning repeatedly, which had not been noticed before; it seems sad and has no appetite.

23-5-50. 12th day after inoculation: two nodules on the eyebrows, one being ulcerated, and another, much larger, on each cheek. Pus had been collected from the right malar region and two smears were prepared; Dr. Laerte observed positive fluoroscopy, both in isolated bacilli and in globi. The other smear, stained by the Ziehl-Neelsen revealed fields with 3 cells with globi. Examination of feces by Z-N +. Nasal mucus ++.

Some pus was sown *in natura* into 3 tubes with Loewenstein medium and some was treated with soda and smeared into 5 tubes of the same medium. See photo from May 23rd N.º 19 plate 4.

25-5-50. *Ist Biopsy*. By means of general anaesthesia, after an injection into the left safena vein with 3,5 cc of a solution of 4,0 morphine, 80,0 chloral hydrate and 400,0g of distilled water. The animal slept profoundly and Dr. Murillo Fontes extirpated the two large facial tumours of the monkey, for bacteriology and inoculations. (See photo n. 20). Smear of this pus ++++. Smear of one biopsied tumour ++++. The blood from the wound, the pus, and one fragment from the tumour were treated with 10% soda, after which the blood was sown into 3 tubes with Loewenstein, medium, 6 tubes were inoculated with the pus and 6 with the tumour triturate. The two biopsied tumours were sent to Dr. Torres, for histopathologic examination.

P.C. N.º 16.475, from 25-5-50: Skin fragment of Rhesus N.º 4, inoculated with an emulsion from the "Chaves" culture, on May 12th.

Results from the anatomo-pathologic examination: "The fragments comprise the epidermis, which does not show any noteworthy modifications. In the deeper portion of the derma, there is an extensive inflammatory process, with regular distribution of blood vessels (small arteries and capillaries), without indication of a recent formation. The cells of the inflammatory exsudate are predominantly mononuclears. In some portions there is an association of lymphocytes and polymorphonuclear cells and also, in other regions, there is a predominance of polymorphonuclear cells (fibrinouspurulent inflammation), occasionally associated to infiltration of hematias (purulent haemorrhagic inflammation). Absence of giant cells and of caseation necrosis. Positive research for acid-alcohol fast bacilli.

Resumé: We have observed an inflammatory process with peculiar characteristics, due to its constitution by cells in their majority macrophage and to its tendency towards suppuration and haemorrhage in circumscribed areas. The histologic configuration does not strictly correspond to that of the leprosy granulome as observed in man. — Manguinhos, June 7th 1950. — Dr. Jorge P. Guimarães."

After the animal came out of the anaesthesia, it tore off and ate the dressings of the wounds.

1-6-50. *2nd Biopsy*: The forehead nodule was sent Dr. Jorge. The pus smear of the lesion was found +. The wounds resulting from the 1st Biopsy were dressed. The animal frequently removes and eats the crusts of the lesions. Germination was found in the 3 tubes with Loewenstein medium inoculated with pus *in natura* on May 23rd, as well as in the other 3 sown with pus treated with soda (in these germination is poor). The animal still shows large facial ulcerations.

10-6-50. 15th day after the biopsy: two secondary nodules appeared on the cheek, forehead and right nostril, lentil-sized and leproma-like. The ulcers are slow to cicatrize. The animal eats all he can get off the ulcers.

14-6-50. A nodulation continues to grow on the right eyebrow.

20-6-50. The ulcers are almost cicatrized.

22-6-50. The secondary nodules remain stationary.

10-8-50. All lesions went back. Smooth cicatrization; skin with normal appearance, lymph-nodes could not be felt. Examination of nasal mucus: + + +. See fig. 5, plate 1.

10-8-50. *3rd Inoculation*: with 1,5 cc of the emulsion from the monkey's own retroculture, from the biopsy effected on May 25th, which were injected into the cheeks and root of the nose.

11-8-50. The animal seems to be suffering: it refuses all food, including some guava sweets, of which it uses to be very fond.

12-8-50. Diffuse erythema all over the cheek. General conditions seem to be improved. This inflammation persisted for 2 weeks, with ocular suppuration during several days; ulceration on the right cheek and left eyebrow.

1-9-50. The left eyebrow nodule has ulcerated. Pus examination +. A secondary nodule has shown up on the right eyebrow. Results from the bacilloscopy of the right cheek +, and from nasal mucus +. *1st Bleeding*: 5 cc for Dr. Botafogo.

30-9-50. The monkey is completely cured from lesions and biopsies.

26-10-50. *4th Inoculation*: Injection of 2 cc of the emulsion of the "CI" culture obtained from Rhesus N.º 5 (passage from Ns. 2 and 4), from August 11th 1950, into the cheeks only. It presents a secondary hazelnutsized nodule, of lepromatous aspect, 4 cm above the left eye.

27-10-50. General state rather weakened. Intense erythema all over the face.

1-11-50. *3rd Biopsy*: Forehead (secondary) and left cheek nodules. Facial pus + with «CI» aspect. Blood from the biopsy + +.

P.C. N.º 16.783, from 1-11-50. Skin fragment of Rhesus N.º 4. Results from the anatomo-pathologic examination: the examined material comprises two fragments:

*1st fragment*: There are no noteworthy alterations in the epidermis. Profoundly seated into the derma, there is a large nodule consisting of spindle-shaped cells (epithelioid cells?) and lymphocytes, associated to polymorphonuclear leucocytes. The central part of the nodule shows necrosis and haemorrhage.

*2nd fragment*: No noteworthy alterations of the epidermis could be perceived. In the whole extension of the derma one can notice nodular infiltrations with more or less clear limits, the histology of which resembles that of the nodule described above. They are formed by mononuclear cells, with vacuolated cytoplasm, spindle-shaped cell, lymphocytes, and polymorphonuclear leucocytes. Congestion and edema of the derma could furthermore be observed. Positive results in the research for a.a.f.bacilli.

*Note* — The histologic configuration presents points of contact with the leprotic reaction, lepromatous type, as described in human material. (Revision of the preceding result (10-11-50) under the orientation of Dr. Torres) — Rio, December 8th 1950. — *Dr. Jorge P. Guimarães.*"

20-12-50. Examination: perfect cicatrization of the biopsies; some nodulations persist on forehead. *5th Inoculation*: 2 cc of the emulsion of the "Jesus" retroculture (CI) (from 24-10 *in natura*), 0,5 cc of which into the root of the nose and 1,5 cc. into the malar regions. The monkey is very thin and presents alopecia on the back and dorsum.

21-12-50. Very dejected; it does not eat, not even sweet cookies, about which it is *crazy*. The whole face is reddened, without nodulation: intense and diffuse erythema.

22-12-50. The general state remains bad. Face still reddened; beginnings of nodulation.

23-12-50. Still in a state of great suffering and does not care about food.

26-12-50. 3 large nodules can be seen on forehead and cheeks, the center of one of which is suppurating. General state improved.

5-1-51. Three large nodules persist, 1 at the root of the nose and 2 on the cheeks, these last already ulcerated. General health conditions good. 9-1-51. The same conditions persist.



16-1-51. Pus examination +, another smear ++ and bundles of a.a.f. bacilli with the same morphology as that of the "CII" culture. Two tubes with Loewenstein medium were inoculated with the pus *in natura*.

The monkey was transferred to the general bioterium, because it was very thin.

4-4-51. The monkey was returned to the laboratory, very hairy and healthy.

25-4-51. It was re-examined and found to be radically cured: 125 days after the 5th inoculation.

6th Inoculation: with 1.5 cc of the emulsion of its own retroculture (CI), which had been sown on 25-10-50, in equal portions into eyebrows and cheeks.

26-4-51. Moderate reaction. On the 28th nodulation began to form.

30-4-51. Erysipelas all over the face; purulent inflammation in the right eye.

7-5-51. The four inoculated points have ulcerated. The erysipellous aspect continues.

9-5-51. Suppurating face; pus +, sown onto Loewenstein. A bleeding was made for Dr. Julio Muniz studies. 4th Biopsy: right eyebrow nodule, for Dr. Jorge.

P.C. N.º 17.051, from 10-5-51: Right eyebrow nodule of Rhesus N.º 4, inoculated on 25-4-51 with an emulsion of its own culture "CI". Results of the anatomo-pathologic examination: "The sections show necrose areas, deeply seated in the hypoderma, at the center of which it is possible to notice blood vessels. These areas are very near to each other, and are surrounded by polymorphonuclear leucocytes. More to the periphery, one sees large mononuclear cells (macrophages), lymphocytes and plasmatic cells, mingled with the polymorphonuclear ones. Research for a.a.f. bacilli resulted negative. — Rio, May 29th 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães."

23-5-51. 5th Biopsy: left eyebrow and secondary nostril nodules, for bacteriology. Nodule and nasal mucus smears: negatives.

P.C. 17.081/P.C. 17.082, from 23-5-51: fragment of the left eyebrow nodule and fragment of nostril of Rhesus N.º 4, inoculated with its own culture ("Chaves I" retroculture) on April 25th.

Results of the anatomo-pathologic examination: 17.081 — The sections reveal, in the derma and hypoderma, an inflammatory cellular infiltration, with a predominance of large mononuclear cells (macrophages), frequently of vacuolated cytoplasm, and lymphocytes; it is also possible to see an abundance of polymorphonuclear leucocytes. Also haemorrhages and plasmatic cells. No a.a.f. bacilli were found.

17.082. In the derma and hypoderma there was noticed an inflammatory cellular infiltration, comprising large mononuclear cells (macrophages), lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes, as well as plasmatic cells. In some points of the fragment it is possible to observe haemorrhages. Occasionally, eosinophile leucocytes are found. No a.a.f. bacilli were seen. — Rio, June 6th, 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães.

This Rhesus was transferred to the General Bioterium, where it was matched to its laboratory companion, «Sofia», and died one year later.

RHESUS N.º 5 — Young female, very fierce.

25-5-50. 1st Inoculation: with 2 cc of the emulsion of the tumour of Rhesus N.º 4, which had been produced by the inoculation of the «Chaves I» strain, biopsied on this date, 0.5 cc into each cheek and on each eyebrow.

Bacilloscopy of the suspension: + + +.

26-5-50. The first examination of the monkey was effected, with Dr. Arthur Marques: we noticed some slight excrescences.

10-6-50. Apparently nothing important can be noticed. The animal is becoming tamer.

14-6-50. 20th day after the inoculation: nodules are forming on the left cheek and right eyebrow.

20-6-50. The right eyebrow lesion was biopsied, and its smear, stained by Z-N revealed fragmented a.a.f. bacilli. Fluoroscopy: +. Sowings: +.

2nd Inoculation: 2 cc of the emulsion of the retroculture of the pus of Rhesus N.º 4, inoculated with the original retroculture from May 23rd of Rhesus N.º 2, into eyebrows and cheeks. The fluoroscopy of this emulsion was positive.

21-6-50. No remarkable reactions.

23-6-50. Nodules begin to appear on the left eyebrow and malar regions.

26-6-50. The monkey was photographed. 28-6-50. The nodules became slightly less pronounced. A pus smear of same revealed the presence of a.a.f. bacilli and globi. After a soda treatment, it was sown into 10 tubes of Loewenstein.

30-6-50. A new examination was effected, again with Dr. Arthur Marques.

5-7-50. The animal's face was photographed again.

8-7-50. In several of the tubes with Loewenstein medium there appeared yellow colonies.

11-8-50. A careful examination of the animal did not reveal any hypertrophied lymph nodes or cutaneous lesions; the facial nodules have almost disappeared.

3rd Inoculation: 1.5 cc of a suspension of its own culture from June 28th (passages from Rhesus N.º 4), as always in the skin of the face. The *inoculum* examination was found to be strongly positive for granulous a.a.f. bacilli.

12-8-50. The animal presents acute nodules at the points of inoculations. Some nasal mucus was collected, stained by Ziehl-Neelsen method, and found positive. Fluoroscopy: +.

1-9-50. The animal presents general cyanose of the face, with decreasing nodules, one of them large and compact, on the right eyebrow. The animal was bled, 5 cc being obtained for Dr. Botafogo Gonçalves studies.

30-9-50. The animal is apparently cured.

26-10-50. 4th Inoculation: 2 cc of the suspension in saline solution of its own retroculture ("CI"), original from the 2nd inoculation. Culture from 11-8-50: equal quantities into cheeks and eyebrows.

27-10-50. Acute nodules at the four inoculated points.

30-10-50. The animal was photographed. The right cheek pus smear, stained by the Ziehl-Neelsen method, was ++. This pus was sown, *in natura*, into 3 tubes of Loewenstein medium.

3-11-50. The lesions progressed very much, but the monkey is lively.

7-11-50. Again the lesions were photographed. Pus was collected from the lesions and its bacilloscopy showed bacilli identical to those of the "CI" culture. This pus was sown and by the 30th of November germination started.

8-11-50. Two nodules from the eyebrows were biopsied, presenting the aspect of human lepromas; they were sent to Dr. Jorge Guimarães, for examination:

P.C. N.º 16.973, from 8-11-50: skin fragment of Rhesus N.º 5, reinoculated on 26-10-50. Results of the anatomo-pathologic examination: "The sections show an epidermis without alteration. In the derma, there is an inflammatory granulome, consisting of a large nodule composed by mononuclear cells and vacuolated cytoplasm, spindle-shaped cells and lymphocytes. Intense infiltration by polymorphonuclear leucocytes, many of them with caryorrhesis, and the central zone of the nodule, which corresponds to the border of the section, presents necrose and haemorrhage. The research for a.a.f. bacilli resulted negative. Rio, December 11th, 1950. — Dr. Jorge P. Guimarães."

12-12-50. The culture in the tube inoculated on Nov. 7th presents punctiform yellow germination, all over the surface of the Loewenstein medium.

20-12-50. Small nodulations remain on the brow.

5th Inoculation: 0,8 cc of the suspension of the "L" culture of patient N.º 16, from Mirueira, Recife (from 13-10-50). This culture was obtained from a lesion which had been produced in a lepromin reaction sear (where from the designation "L"), in the patient's left arm, and into whose right thigh I had inoculated the "Emilia" culture, alive.

21-12-50. Intense local reaction; one large nodule appeared on the face. General health conditions are satisfactory.

23-12-50. Local reaction has become more intense, the nodules are larger and general health conditions remain good.

26-12-50. A large pustulous nodule is noticed on each cheek. Bacilloscopy of feces: ++, as also the fluoroscopy.

5-1-51. Two large nodules on malar regions, the one on the right-side being already ulcerated. The forehead lesions are cicatrizing.

14-2-51. Very small nodules remain on the forehead, and a larger one on the right cheek.

26-2-51. The right cheek nodule was biopsied, and the monkey was removed to the general bioterium.



4-4-51. The monkey was returned to the laboratory, in good health conditions, and with cicatrized lesions.

25-4-51. General examination of the monkey: the facial skin is atrophied and cyanotic and alopecia was observed all round the face.

6th Inoculation: 1.5 cc of the suspension of the "Chaves I" culture (retroculture from Maria Domingas), from 4-1-51, into cheeks and eyebrows.

26-4-51. Not very intense local reaction. By the 28th the nodulation was more pronounced.

3-5-51. The monkey was photographed, front and profile with the best success. Pus was collected from one nodule, and its bacilloscopy was positive. Such pus *in natura* was sown into 3 tubes with Loewenstein medium and 1 with glycerin broth.

4-5-51. The right cheek nodule was biopsied for bacteriology.

9-5-51. Extirpation of left cheek and eyebrow and secondary nodules was effected, whose smears were + + +, on account of which they were sent to Dr. M. Torres. On that same day, the animal was bled and 5 cc of blood were obtained for Dr. Muniz.

P.C. N.º 17.052, from 10-5-51. Fragments of the left cheek nodule of Rhesus N.º 5, Chiquita, inoculated on 25-4 with a "Maria Domingas" culture (retroculture from the Chaves I strain). Results of the anatomo-pathologic examination: "The fragments show, in some points, interruption of continuity of the epidermis (ulceration). In the derma and hypodermis, there is inflammatory cellular infiltration, formed by large mononuclear cells (macrophages) and polymorphonuclear leucocytes. In some parts these last are predominant, forming micro-abscesses. The vessels of this region are moderately dilated and congested. There can still be noticed some small haemorrhage foci. Presence of a few a.a.f. bacilli. Rio, May 30th 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães."

P.C. N.º 17.053, from 10-5-51. Secondary nodule from Chiquita Rhesus, inoculated on April 25th with a «Maria Domingas» culture. Results of the anatomo-pathologic examination: "At a point there is interruption of the continuity of the epidermis (ulceration). In the derma and hypodermis there is inflammatory cellular infiltration, consisting of large mononuclear cells (macrophages) and polymorphonuclear leucocytes of which the first are in the majority. There may still be noticed lymphocytes and plasmatic cells. Acid alcohol fast bacilli and granulations were noticed. Rio, May 30th, 1951. Dr. Jorge P. Guimarães."

22-5-51. Several secondary nodules can be perceived on the right cheek. I showed the monkey to Drs. Genésio Pacheco, Gobert Costa and Laerte de Andrade. Afterwards, these nodules were extirpated and sent to Dr. Jorge Guimarães, for histopathology.

P.C. N.º 17.070 and P.C. N.º 17.071, from 23-5-51. Material from Rhesus N.º 5 (Chiquita), inoculated with a "Maria Domingas" strain on 25-4-51.

P.C. N.º 17.070. Skin fragment from the point of inoculation. Results of the examination: "The sections show that the epidermis is ulcerated at a point. In the derma, there is an inflammatory infiltration, consisting of large mononuclear cells (macrophages), frequently with vacuolated cytoplasm, lymphocytes and polymorphonuclears. These do occasionally form micro-abscesses. Deeply situated in the hypodermis, there was found a haemorrhage area. No a.a.f. bacilli were found.

P.C. N.º 17.071. Skin fragment (secondary nodule). "The sections present an epidermis without alterations. In the derma and hypodermis there are cellular infiltrations more or less well-circumscribed, consisting, predominantly, of large mononuclear cells (macrophages), and frequently with vacuolated cytoplasm, while it is still possible to notice lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes. In the derma the infiltrations are placed, generally, next to pilous folliculi and sebaceous glands. Eosinophile leucocytes and giant cells are seen occasionally. No a.a.f. bacilli were found. — Rio, June 1st, 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães."

14-8-51. After a rest of around 3 months, in the General Bioterium, the monkey was brought back to the laboratory, presenting only residual lesions on the forehead and malar regions.

7th Inoculation: 1.5 cc. of the suspension of the same "Maria Domingas" retroculture, from 4-1-51 (originated from a lactose broth from 1-8-50), which were injected into the forehead and malar regions, in equal quantities. 15-8-51. Intense local reaction, with nodulation at the three points of inoculation.

16-8-51. The nodules are the size of corn-grains.

17-8-51. The nodules have become more condensed.

21-8-51. The nodules are the size of a medium olive, and are suppurating.

24-8-51. The three nodules continue suppurating.

28-8-51. The forehead and right cheek nodules were extirpated. The pus obtained on this occasion, which was found positive for a.a.f. bacilli, was sown, *in natura*, into 2 tubes of Loewenstein medium. The skin was sent to the Pathologic Anatomy Section for examination.

P.C. N.º 17.352, from 29-8-51. Skin fragment of Rhesus N.º 5 (Chiquita), inoculated on August 14th with the "Maria Domingas" strain. Results of the anatomico-pathologic examination:

"Presence, in the derma and hypodermis, of discontinued inflammatory cellular infiltration, and also of a great number of polymorphonuclear leucocytes, which are more abundant in the deeper portions of the derma and in the hypodermis; next to the leucocytes, there are large mononuclear cells, with varying forms and abundant cytoplasm (spindle-shaped cells) and gigantic cells of the Langhans type. Epidermis without any alterations. Absence of a.a.f. bacilli in the cuts that were examined. — Rio, September 11th, 1951. — *Dra. Rita Alves de Almeida Cardoso.*"

1-9-51. Cicatrization of the wounds resulting from the biopsies was very quick, because we used roset coffee powder as haemostatic. The monkey presents two small secondary nodules in the outer angle of the right eye.

11-9-51. These nodules persist. 19-9-51. The aspects is better. The bacilloscopy of the feces of the animal resulted negative, and the Rhesus was returned to the General Bioterium to be used for other purposes.

RHESUS N.º 6 (Adult female).

5-11-51. The monkey was inoculated with 1.5 cc of an emulsion of the "Maria Domingas" strain retroculture grown on Loewenstein medium of 2-6-51, 0.5 cc of which were injected subcutaneously into the forehead and equal portions on each cheek and right groin, having in view the formation of nodules to make Lepromin.

6-11-51. The animal presents acute nodules at the three points of facial inoculation. Its general condition seems to be good.

13-11-51. The three facial nodules are larger and hardened and the one on the forehead shows a central pustule.

14-11-51. 10th day after inoculation. Photos were taken of each side of the face and afterwards the three nodules, which were also photographed, were extirpated. The smears of these nodules, stained by Ziehl-Neelsen, were strongly positive: isolated a.a.f. bacilli, in extra- and intra-cellular globi and masses. Giantic, granulated and vacuolated (g.g.v.) bacilli. From the pustulous forehead nodule some pus was sown, *in natura*, into 2 tubes with Loewenstein medium, which germinated in due course. One tumour was sent to Dr. Rita Cardoso for histopathology and with the rest there were produced 20 cc of Lepromin for human use.

P.C. 17.537, 14-11-51. Rhesus N.º 6. Fragment of facial tumour. The animal was inoculated with "Maria Domingas" strain on 5.11. Results of the anatomico-pathologic examination: "Extensively purulent and acute inflammatory process, associated to voluminous mononuclear cells containing an extraordinary quantity of a.a.f. bacilli. The same germs are also found in the cytoplasm of polymorphonuclear leucocytes. Rio, January 23rd, 1954. Dr. Rita A. A. Cardoso."

15-11-51. A pus collection was effected from the biopsied wounds, the smears of which, stained by Ziehl-Neelsen and "Fontes", were found positive. After a treatment with 10% soda, the sediment of this pus was sown into 4 tubes with Loewenstein medium, 1 with glycerin broth and 1 with potato, in all of which more or less extensive germination took place, similar to the original culture, both from this pus as from the tumour emulsion treated with soda on 17-11-51.

24-12-51. The biopsied wounds are healing and the monkey presents one secondary nodulation, of about 1,5 cm. on the right brow.

4-1-52. 62nd after inoculation. The facial scars are almost completely healed. I extirpated the forehead residual nodule, the smear of which, stained by Z-N, was found negative. This material was sent to the Pathologic Anatomy Section.



P.C. 17.608, 4-1-52. Rhesus N.º 6. Skin biopsy. The animal has been inoculated with "Maria Domingas" strain, 60 days ago. Results of the anatomo-pathologic examination: "In the hematoxylin-eosin stained sections, in a circumscribed point, there is effraction of the epidermis, with an accumulation of polymorphonuclear leucocytes. Next to this region (point of inoculation?), there is necrosis of the derma, associated to intense infiltration by polymorphonuclear leucocytes. Surrounding this zone, there were observed proliferation of fibrocytes and blood vessels. In isolate foci are seen large mononuclear cells, with abundance of cytoplasm, very frequently vacuolated, besides lymphocytes and polymorphonuclear leucocytes. Absence of a.a.f. bacilli in the sections stained by the Ziehl-Neelsen method. Rio, January 23rd, 1952. Dr. Rita A. A. Cardoso."

10-1-52. The monkey was transferred on this date to the General Bioterium for fattening and utilization for other purposes.

RHESUS N.º 7. Female, weighing 5 kg, n.º 5.030, sent us by Dr. Henrique Penna.

23-4-52. The monkey was inoculated with 2 cc of a suspension of the "Jesus" strain (a retro-culture of the "Chaves II" strain), grown in Loewenstein medium, of 1-2-52; 0.5 cc were injected into the forehead, and equal portions into the malar regions and right-side nipple, all of them subcutaneously. The skin covering the chest was found to be very hairy. Four hours after the inoculation, the animal looked very downcast, with intense swelling at the points of inoculation. 48 hours later, the 3 facial inoculation points presented acute reddened nodules, about the size of a corn grain.

3-5-52. Definite nodulation on the three facial spots, with tumours the size of which varies between that of a grain of maize and a bean; erythematous and infiltrated face. The animal was shown today to Prof. Dr. Mario Malfatti, from Buenos Aires.

7-5-52. After examination and palpation of the lesions the animal was photographed. The forehead and malar nodules are more or less the size of hazel-nuts. The erythema has become less intense and the nodules are of hard consistency. As to the chest, the right nipple lesion consists of a hard pasting, with a diameter of about 2cm.

7-5-52. One half of the forehead and right malar nodules respectively was extirpated by me for histopathologic and bacteriologic studies. The smears of this material, stained by the Ziehl-Neelsen method, revealed gigantic and granulated a.a.f. bacilli. Suspensions of the two tumours were inoculated into murines. The soda-treated emulsion was inoculated into 5 tubes with Loewenstein medium and in one glycerin broth.

P.C. 17.815, 7-5-52. Rhesus N.º 7. Fragment of a right-side cheek tumour. The animal had been inoculated with the "Jesus" strain, a sub-strain of "Chaves II", on 23-4-52. Results of the anatomo-pathologic examination: "Intense infiltration of derma and hypoderma by lymphocytes, plasmatic and gigantic cells, and by a majority of large mononuclear cells with vacuolated cytoplasm, many of which containing long, vacuolated, and granulated acid-alcohol fast bacilli. The epidermis shows no important alterations. Rio, May 28th, 1952 — Dr. Rita A. A. Cardoso."

10-5-52. The left-side cheek tumour is larger and is formed by two reddened hazelnut-sized nodules. The wounds which resulted from the two biopsies are covered with crusts.

15-5-52. The two large left-side facial nodules and the one on the chest, all of which had not been biopsied, are supurating, which pus was collected and sown *in natura*, in Loewenstein medium presenting definite germination on June 5th in 3 tubes, with aspect similar to that of the original "Chaves II" strain.

17-2-54. The culture obtained from the above biopsies is very good and has been transplanted.

CEBUS FATUELLUS N.º 1 — Male, bald, N.º 29.905 from the Rockefeller Laboratory. It was inoculated on October 26, 1950 with 1cc of a suspension in saline solution of the "Chaves I" strain, retroculture from Rhesus N.º 4, passage from Rhesus N.º 2, an original from 25-5-50. It was inoculated, in equal parts, into the forehead and malar regions. This monkey has dark and hairy skin, as a result of which, observation is rather difficult.

20-12-50. There begins to appear a capillary growth on the head. One nodule may be observed in the forehead and complete cicatrization at the facial inoculation points.

5-1-51. The animal was reinoculated, in the same points as before, with the same culture referred to above.

8-1-51. Examination of feces: positive for a.a.f.bacilli. On the right side of the forehead there can be observed a nodule about the size of a small olive.

25-1-51. Biopsy of the frontal nodule, presenting a macroscopic lepromatic aspect, surrounded by alopecia. One half of the tumour and a fragment of the chest skin (alopecic zone) were sent to the Pathologic Anatomy Laboratory for study. The smears of the nodule stained by Z-N are rich in a.a.f.bacilli and in intra- and extra-cellular globi. Uncountable number of cells with globi. In the smears the bacilli present the g.g.v. type of the "Chaves I" culture.

P.C. 16.905, 27-1-51. Male cebus. Frontal tumour and skin fragment of chest alopecic zona. The animal was inoculated on 26-10-50, and re-inoculated on 5-1-51 with the "Chaves I" Rhesus culture.

Results of the anatomo-pathologic examination: "The sections show interruption of continuity of the epidermis (ulceration) at some points. The derma and hypoderma present intense inflammatory cellular infiltration, consisting predominantly of large mononuclear cells (macrophages) and polymorphonuclear leucocytes, these last, very frequently, in a peri-vascular distribution. The vessels of this region are dilated and congested and small hemorrhage foci may be seen. Abundance of a.a.f. bacilli, especially intra-cellular. Rio, May 30th, 1951. — Dr. Jorge P. Guimarães."

The tumour trituration, sown *in natura* ex 25, on 29 january, was contaminated and discarded.

13-2-51. The cebus was killed and its viscera were examined. Nothing abnormal was found.

CEBUS FATUELLUS N.º 2 — Female, N.º 29.907 from the Rockefeller Laboratory. As the other one, it was sent us by Dr. Henrique Penna.

26-10-50. The monkey was inoculated with 1 cc of a suspension of the "Chaves I" strain, passage from Rhesus N. 2 and Rhesus N. 4, from 25-5-50. into the malar regions; black and hairy skin.

20-12-50. To this no signs of sickness were observed.

5-1-51. The animal was re-inoculated with the same culture, on the forehead and malar regions, as always sub-cutaneously.

8-1-51. Feces examination: positive for a.a.f.bacilli.

14-4-51. The animal was killed, by means of chloroform injection into the lungs.

*Necropsy:* There were cut fragments from forehead skin, face, axillar, crural, and inguinal and sub-maxillar lymph nodes; fragments of lungs, liver, spleen, pancreas, left kidney and left testicle, all of which were negative for a.a.f.bacilli, at the 110th day after inoculation.