

Verificação, em condições naturais, da infecção de mais três Hematófagos (Anophelineos, Flebótomos e Simulídeos) em leprosos (*)

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Nota preliminar, com 14 figuras no texto)

Sr. Presidente:

Em aditamento à minha comunicação de 15 de julho último, venho trazer à Academia novos fatos, que reputo de alta importância, sobre a infecção de mais três hematófagos, em leprosos.

No mês passado voltei à Colônia Santa Fé (Três Corações, Minas) afim de prosseguir nos meus estudos. Acompanharam-me nessa missão, designados pelo diretor do Instituto Oswaldo Cruz, o Dr. PENNA DE AZEVEDO, anatomopatologista, o Dr. OLIVEIRA CASTRO, entomologista, e o Dr. VICTOR CALDARERA, diretor do Leprosário Nacional do Paraguay, que está fazendo estágio no meu laboratório de Manguinhos.

Por sugestão minha, o Dr. PENNA DE AZEVEDO iniciou o estudo das modificações histopatológicas das lesões leprosas infiltradas com esteres de chaulmoogra, pelo método filipino (*Plancha*), durante 3, 6, 9 e 12 meses, biopsando mais de 50 enfermos de leprose, em várias fases evolutivas (L1, L2, L3 e tuberculoide). Esse estudo tem considerável valor prático. O plano de pesquisas do Dr. OLIVEIRA CASTRO visava apenas a ecologia culicidiana da região, mas êle iniciou ali com o Dr. JOSÉ MARIANO, diretor daquela Colônia, interessantes experiências sobre a transmissão da lepra pelos mosquitos.

Nos dois primeiros dias apliquei, com a colaboração do Dr. MARIANO e do enfermeiro MARIO C. LÁRA, em 100 doentes e 20 comunicantes que se achavam no pavilhão de observação, cinco antígenos (leprolinas) que preparei com algumas das culturas puras de bacilos a.a.r. que isolei de lepra humana, conjuntamente com a lepromina preparada pelo Dr. MARIANO (método MITSUDA-HAYASHI). Este estudo visa a obtenção dum antígeno standardizado, de *efeito constante*, para substituir a lepromina, cujo teor em bacilos é variável.

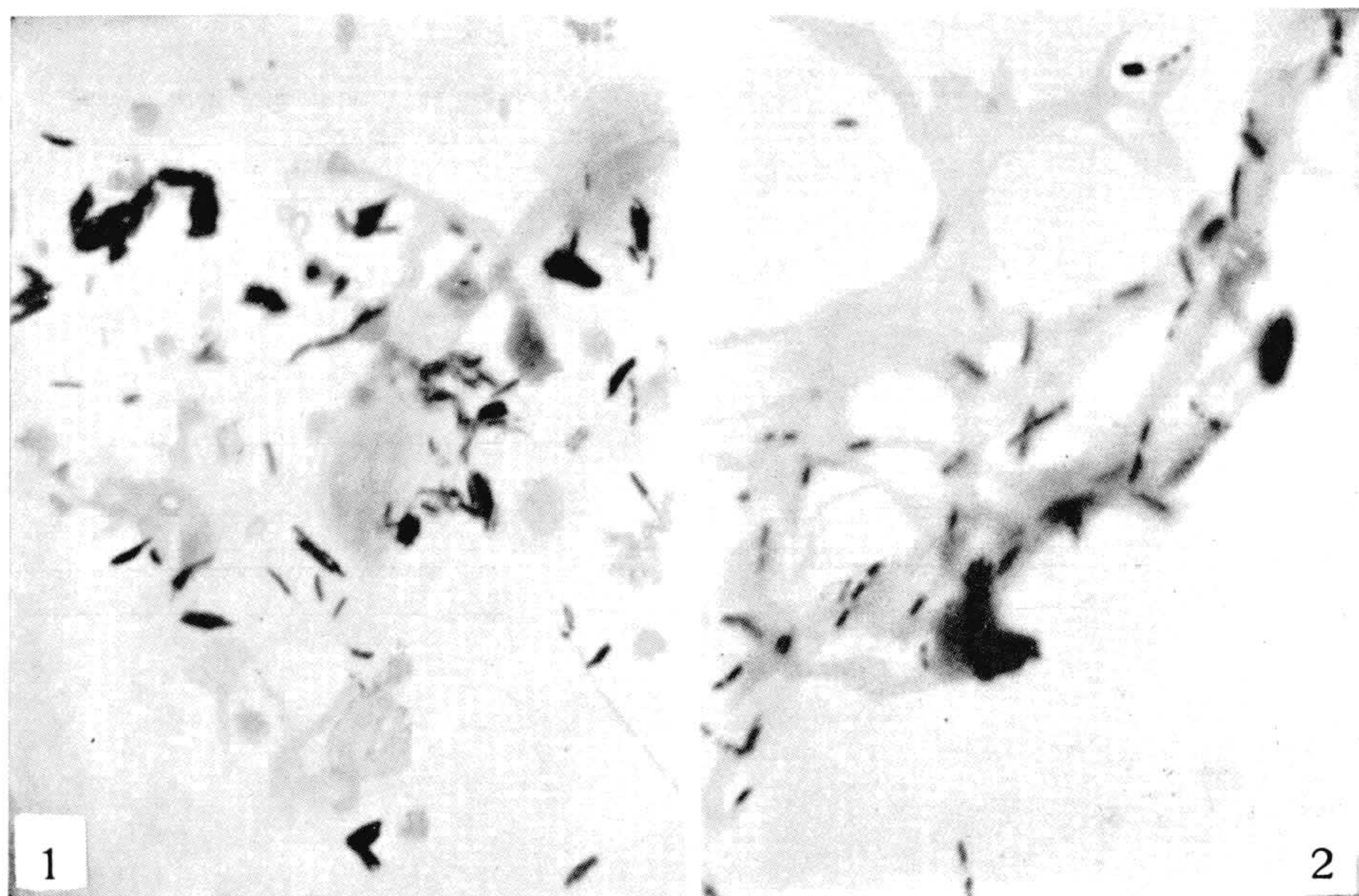
(*) Comunicação à Academia Nacional de Medicina em 9 de setembro de 1943. Entregue para publicação em 16 de setembro e dado à publicidade em outubro de 1943.

Nesse interim fiz outras verificações que merecem ser referidas: a primeira foi a confirmação do achado de bacilos a.a.r. em exemplares de *Phthirius pubis* capturados a 19-8 no leproso P. Bertolete; e a segunda também confirmação, por duas vezes, de bacilos a.a.r. em carrapatos encontrados num doente que chegava à Colônia para se internar, e noutra examinado no Dispensário de Lepra de Três Corações. Este caso é muito interessante porque o diretor do Dispensário, Dr. AMADOR VICTOR DA SILVA, declarou que encontrou os ixódidas em "flagrante delito" de parasitismo espontâneo num doente (João Jacinto) que examinava pela primeira vez e que classificou de "N1". Tratava-se de três ninfas de *Amblyomma cajennense*, vivas e cheias de sangue, que triturei e semeei em LOEWENSTEIN e com o resto do triturado fiz três esfregaços. De antemão declarei aos colegas presentes que sendo o doente um caso "N1", o exame microscópico desses esfregaços devia ser negativo, mas se fôsse positivo aquele médico teria de modificar o seu diagnóstico, pois se trataria dum lepromatoso. E foi isto o que ocorreu: o exame foi fortemente positivo, o doente foi encaminhado à Colônia e verificou-se tratar-se dum caso "L2". Vê-se, assim, que um simples exame dum carrapato, retirado dum leproso, pode auxiliar, mesmo à distância, a classificação clínica do caso em aprêço.

Verificação de novos hematófagos infectados em leprosos.

Na manhã de 19-8 partí para a beira do rio do Peixe com uma turma de 10 leprosos (todos L3), comandada pelo guarda OTTO FERREIRA. Eram eles :

J. O. Santos, preto, 52 anos; Romeu Silva, preto, 12 anos, (o chamariz de mosquitos das experiências de março); A. G. Pereira, preto, 26 anos; J. Ivo S., preto, 40 anos; P. Ernestino, preto, 23 anos; M. Reis, branco, 42 anos; F. Lopes, branco, 40 anos; D. Marcelino, preto, 30 anos; G. Marcolino, preto 22 anos; e Astolfo Assis, com 44 anos. O fim da excursão foi capturar os mosquitos que sugassem esses doentes. Sentámo-nos à beira do rio no mesmo local onde, a 27 de março, fizemos rica caçada de três espécies de *Psorophora*, além de outros culicídeos banais. Fazia sol e não ventava. A noite anterior tinha sido bastante fria e poucos dias antes havia geado em toda a região. Permanecemos ali, parados, uma hora e meia sem que aparecesse sequer um mosquito! À tarde, com os Drs. MARIANO E CASTRO, e a mesma turma de doentes, atravessei o rio e entrei na borda dum mata que fica a 1.500 metros do leprosário. Depois dum hora de franco insucesso, surgiu uma onda de anofelinas, das quais conseguimos, o Dr. CASTRO e eu, capturar algumas dezenas, das que sugaram nos enfermos.



Figs. 1, 2 e 3 — Vários campos dum esfregaço da emulsão do triturado de três ninfas de *Amblyomma cajennense*, capturadas pelo Dr. Amador Victor da Silva, no leproso J. J., no Dispensário de Lepra de Três Corações (Minas), em 21-8-43. Trata-se dum caso de parasitismo espontâneo, seguido de forte infecção dos ixódidas.

Microfotos de M. Cesar.

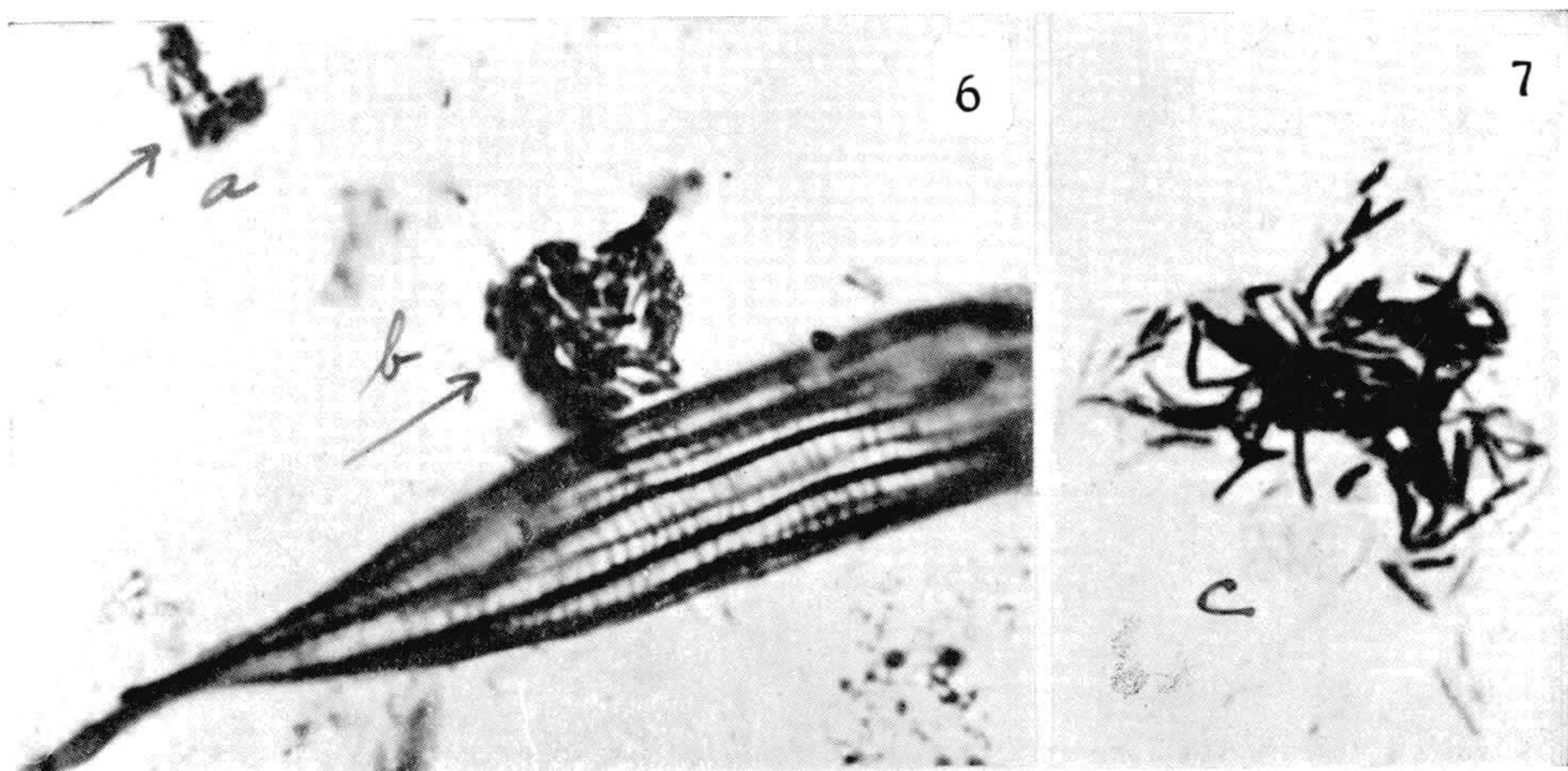


Fig. 4 — Os dez leprosos (todos L3) selecionados para a infecção, em condições naturais, de mosquitos, com o fim de capturá-los para cultura do bacilo de Hansen e trabalhos experimentais. Eles permaneceram, com o autor, das 9 às 10 e 1/2 h. da manhã de 19 de agosto, espalhados à margem do rio do Peixe, sem que aparecesse sequer um mosquito. No mesmo local, e às mesmas horas, em fins de março de 1943, o autor fez abundante caçada, em leprosos, de três espécies de *Psorophora* e outros culicídeos.

Fig. 5 — Os mesmos doentes da fig. 4, com o entomologista Dr. Oliveira Castro e o guarda Otto, à borda duma mata existente à margem duma lagôa tributária do rio do Peixe. Nessa mata, à hora crepuscular, foram capturados, nesses doentes, as primeiras anofelinas e os primeiros flebotomos e simuliídeos (borrachudos) infectados com o bacilo da lepra.

Fotos Dr. Souza Araujo.

Antes de triturar as anofelinas com sangue, para exame microscópico e sementeiras, na manhã de 20 solicitei ao Dr. OLIVEIRA CASTRO a fineza de determiná-las, o que êle fez, verificando serem de duas espécies: *Anopheles albitarsis* e *A. tarsimaculatus*. Tomei um exemplar da primeira dessas espécies, tumefacto de sangue, dentre os capturados em João Ivo, e esmaqueio-o, sem qualquer tratamento prévio, sobre uma lâmina. Nesse esfregaço, corado pelo ZIEHL-NEESEN, encontrei uma massa de bacilos e uma globia junto a uma escama do mosquito (figuras 6 e 7). Foi essa a verificação n.º um de tal achado, pois não há, ao que eu saiba, referência na literatura leproológica, sobre resultado idêntico.



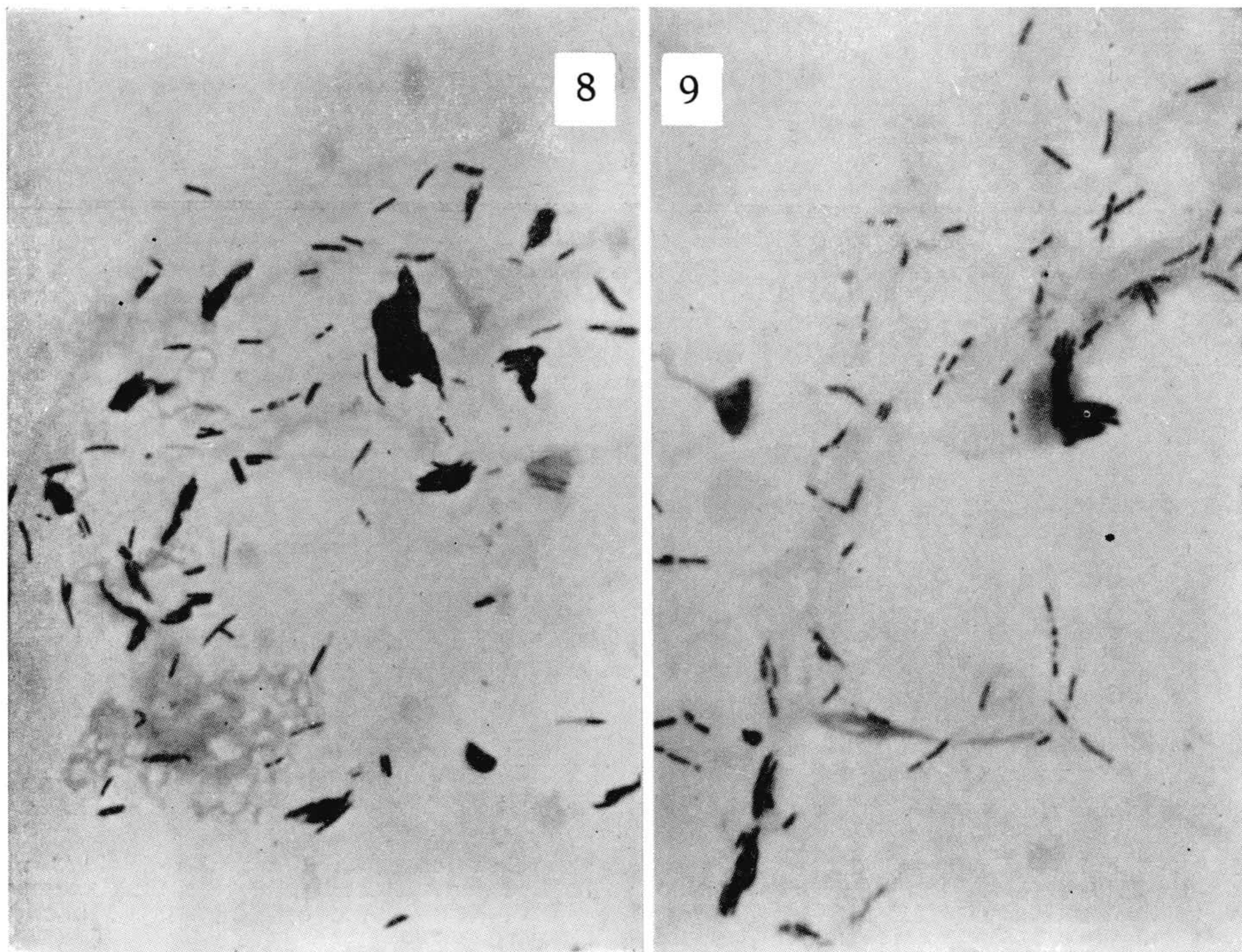
Figs. 6 e 7 — Esfregaço do triturado duma anofelina infectada à noitinha de 21/8 no doente J. Ivo (L3). Em a) se vê um feixe de bacilos a.a.r., em b), junto a uma escama vê-se uma globia deformada pela esfregação, e em c) uma massa considerável de bacilos a.a.r., na maioria homogêneos.

Microfotos de J. Pinto.

Tomei, então, mais cinco exemplares de anofelinas capturadas em M. Reis e noutros doentes, tratei-os pela soda cáustica a 10 % (método de PETROFF) e após duas lavagens com água destilada esteril, triturei-os em microtritador de vidro esmerilhado, e com a emulsão do triturado semeei vários tubos de meio de LOEWENSTEIN e caldo glicerinado. O esfregaço desse triturado também se mostrou rico em bacilos a.a.r. isolados, na sua maioria homogêneos, e algumas globias. A exibição desse preparado causou, por ser novidade, grande entusiasmo entre os colegas presentes.

Na tarde de 20 voltámos à borda da mata, junto de uma lagoa, subsidiária do rio do Peixe. Das 14 e meia às 17 horas apareceram apenas dois cúlices (*C. scapularis*), que capturámos em dois doentes. Por motivo desse

insucesso mudei de lugar, levando uma parte dos doentes para um pequeno bosque existente numa curva do rio do Peixe, no seu lado direito. Ali, das 18 horas em diante, auxiliado por meio duma lanterna elétrica, capturei vários exemplares de anofelinas que sugaram nos doentes M. Reis, J. Ivo e P. Ernestino. Devo referir que as anofelinas terminavam muito depressa o seu repasto e muitas fugiam quando eu ia capturá-las e tão repletas de sangue



Figs. 8 e 9 — Dois campos dum esfregaço de várias anofelinas (*Anopheles albitarsis* e *A. tarsimaculatus*) infectadas à notinha de 21/8, em plena natureza, no doente Manuel Reis (L3). São abundantes os bacilos a.a.r. isolados (homogêneos e em cocotricas) e em feixes de vários tamanhos. O sedimento dessa emulsão foi semeado em meios de *Loewenstein* e glicerizados.

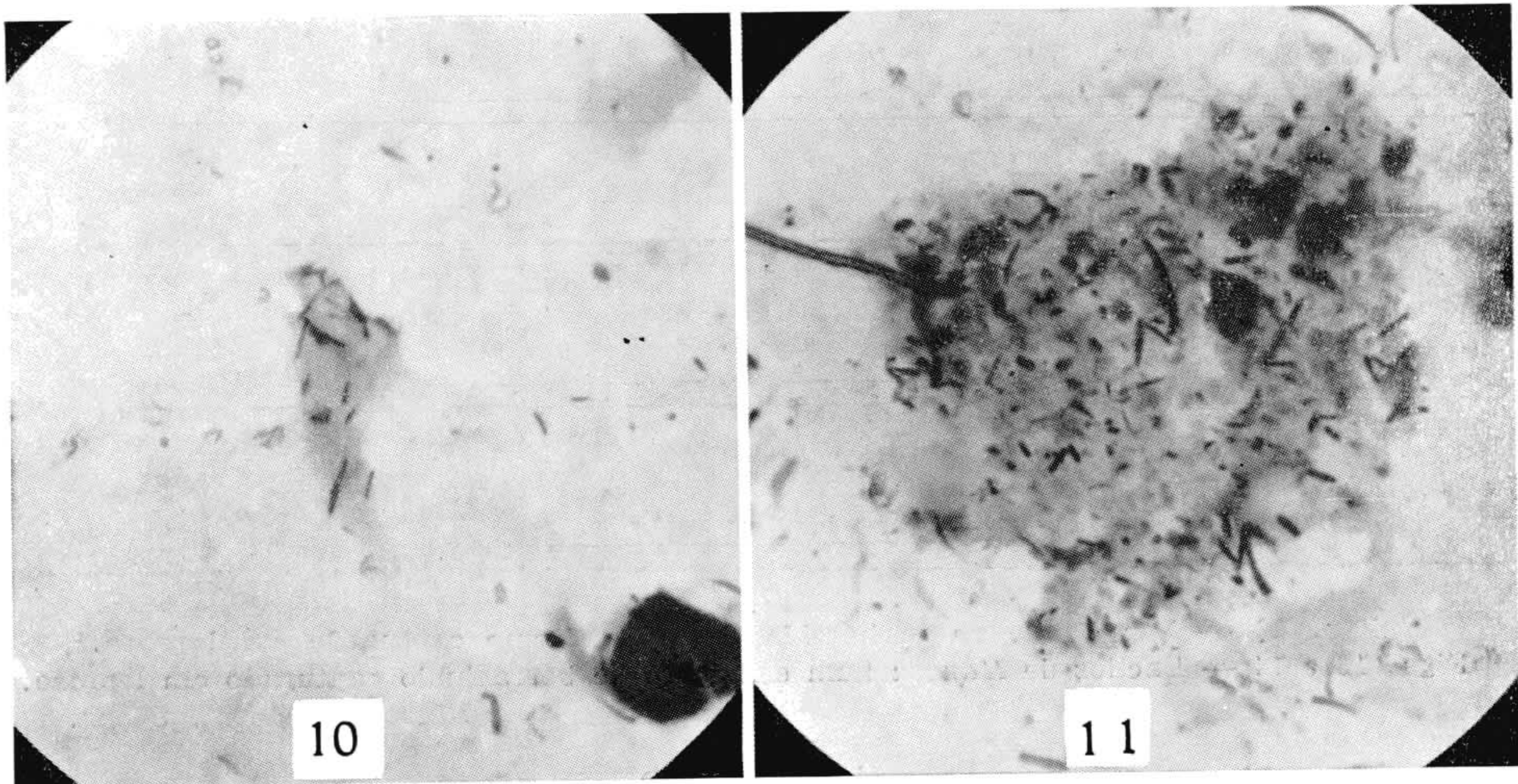
Microfotos de M. César.

que mal podiam voar. Além das anofelinas, capturei três flebótomos e um borrachudo. O Dr. CASTRO também capturou, no seu grupo de doentes, algumas anofelinas e raros cúlices. O Dr. MARIANO capturou um borrachudo além de outros raros mosquitos.

Na manhã de 21 tratei pela soda e triturei quatro lotes de anofelinas capturadas nos seguintes doentes: cinco em M. Reis, seis em P. Ernestino, quatro em J. Ivo e nove em D. Marcolino. As emulsões desses triturados, em água destilada estéril, foram semeadas em meio de LOEWENSTEIN e outros.

Os esfregaços dêsses quatro triturados foram positivos para bacilos a. a. r. e alguns deles têm globias ou massas de bacilos, semelhantes às que encontrei nas *Psorophoras*, em março último.

Em seguida retirei dos tubos de ensaio com os nomes de M. Reis, P. Ernestino e J. Ivo os três flebótomos capturados na véspera (todos já mortos), os quais entreguei ao Dr. OLIVEIRA CASTRO para determinar. Êle fixou dois para melhor examinar ao chegar ao Rio e dissecou um, o que se mostrava mais repleto de sangue. Êste líquido é perfeitamente visível, em vermelho vivo, através a pele do abdomen do inseto. Os três esfregaços feitos numa só lâmina e corados pelo ZIEHL-NEELSEN revelaram bacilos a. a. r. indistinguíveis do de HANSEN. O Dr. CASTRO encontrou o primeiro na lanceta



Figs. 10 e 11 — Esfregaços de emulsão de um grande lote de anofelinas.
Microfotos de M. César.

da proboscida, logo outro na sua parte mediana e eu encontrei uma globia na hipofaringe — parede inferior do tubo central por onde é aspirado o sangue. Dessa lâmina só resta a microfotografia n. 12, pois o Dr. SIMÕES a quebrou, acidentalmente, quando a focalizava para outras fotografias, no Hospital Evandro Chagas. Posteriormente o Dr. OLIVEIRA CASTRO pôde reconstituir essa preparação da qual mandou confeccionar interessante desenho tendo encontrado mais alguns bacilos além dos acima referidos. Num segundo exemplar do mesmo lote de três, o Dr. CASTRO encontrou outros raros bacilos. As suas verificações ainda estão em progresso, sobretudo as que se referem às dissecações das anofelinas para localização dos bacilos nos seus organismos, assunto de um artigo que êle está elaborando. Parece-me ter sido esta também a primeira vez que se encontraram bacilos da lepra em flebótomos.

No mesmo dia 21 examinei os borrachudos, em cujos esfregaços encontrei alguns bacilos, não muito raros. Há cerca de oito anos um doente de lepra, procedente do Salto Grande do Paranapanema (S. Paulo), me garantiu ter adquirido a doença por picada de borrachudos, insetos muito abundantes naquela região, e tendo êle um irmão mais velho enfermo, o qual teria sido o foco.

Na tarde de 21, das 18 horas em diante, estávamos de novo, com os doentes, à borda da mata. Nessa ocasião a caçada foi mais pobre.

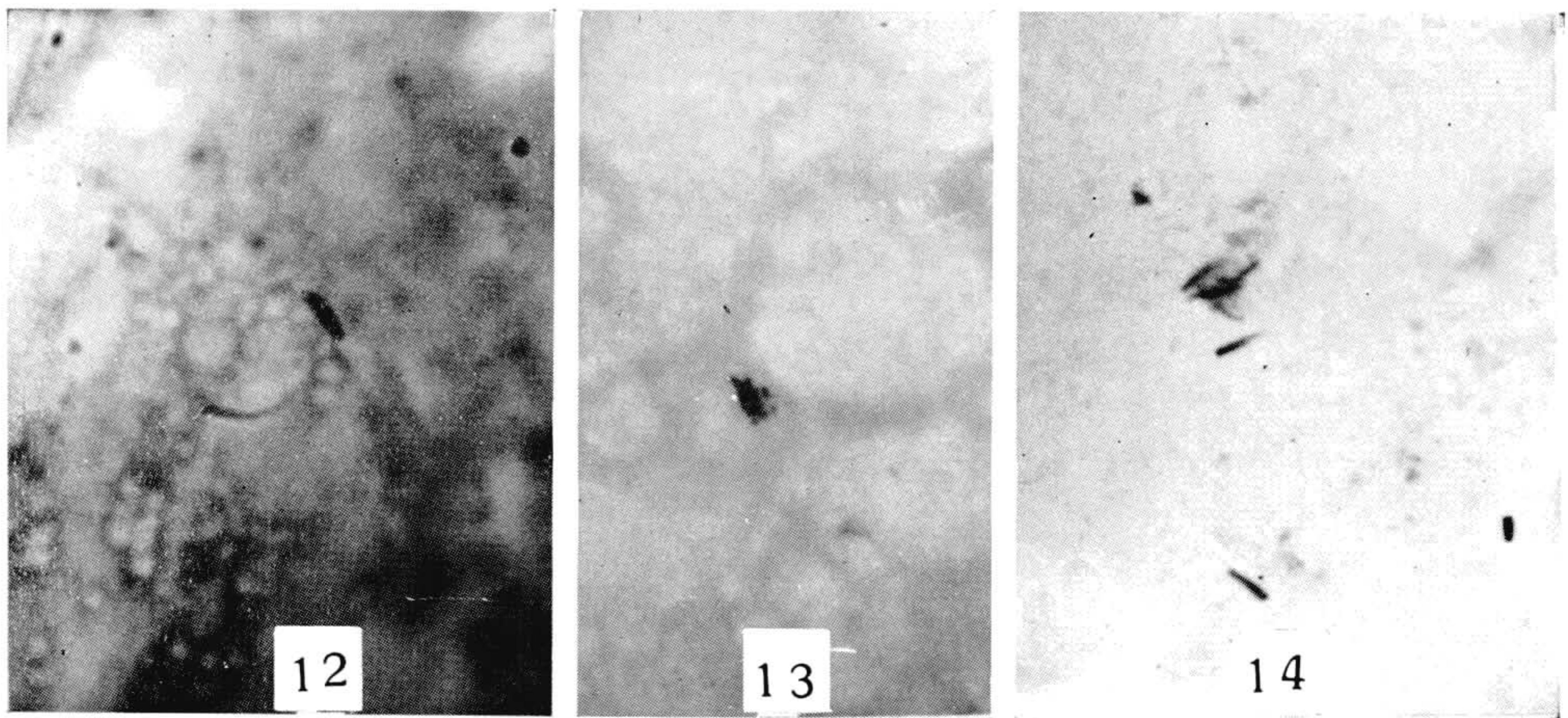


Fig. 12 — Um bacilo na proboscida dum Flebótomo capturado em leproso.
Figs. 13 e 14 — Bacilos de *Hansen* num esfregaço de borrachudo capturado em leproso.
Microfotos de *M. César*.

Capturei, apenas: um flebótomo em M. Reis, duas anofelinas e um flebótomo em D. Marcolino, dois cúlices e um flebótomo em G. Pereira, cinco anofelinas e um culex em F. Lopes e três anofelinas em Astolfo.

O Dr. CASTRO e o Dr. MARIANO levaram uma turma de doentes para outro lado do rio, tendo o primeiro capturado, além de anofelinas, também um flebótomo.

Na manhã de 22 (domingo) lavei os três flebótomos que capturei na véspera, em sôro fisiológico estéril e triturei com um pouquinho de caldo glicerinado na falta de água destilada estéril, semeando a emulsão assim obtida em meio de LOEWENSTEIN e caldo glicerinado. Triturei, também, e semeei um lote de dez anofelinas apanhadas em quatro doentes e na manhã de 23 tratei pela soda e triturei mais três anofelinas e dois cúlices (*C. scapularis*), restantes da caçada de 21, semeando os seus triturados nos três meios acima

referidos. Exceto uma série de sementes, que se contaminou durante a viagem, todas as demais continuam na estufa, a 37° C. e a sua observação deverá durar de três a quatro meses.

Verificada, 12 horas após o repasto, a riqueza de bacilos a.a.r. nos sedimentos dos mosquitos que sugaram leproso lepromatosos, em plena natureza, os Drs. OLIVEIRA CASTRO E MARIANO resolveram, com os meus aplausos, fazer tentativa de transmissão da infecção leprótica experimentalmente. Eles começaram por selecionar quatro doentes L3 e os levaram à mata, à hora crepuscular e os mosquitos neles capturados colocaram, logo em seguida, sobre leproso considerado como "negativos". Os "doentes-cobaias", como os chamou o Dr. MARIANO, eram seis e as experiências foram repetidas três dias seguidos. No fim de 72 horas, dois desses seis doentes apresentavam, nos pontos das picadas dos insetos infectantes, nódulos reacionários com borda eritematosa. O suco e a linfa cutâneos colhidos nesses nódulos de um dos doentes (Sebastião) revelaram vários bacilos. Encontrei três campos a 12 bacilos cada um. Achei o resultado bom demais para ser verdadeiro e então propuz-me a fazer um rigoroso exame clínico nos doentes que serviam para a experiência. No que deu resultado tão animador encontrei leprides no dorso, com bordas eritematosas, que classifiquei como lesões ativas, o que ficou provado com o meu exame da linfa, colhida nessas bordas. Este achado anulou a primeira experiência positiva de infecção pelo mosquito. Para evitar essa causa de erro sugeri ao Dr. MARIANO selecionar 10 doentes realmente negativos aos exames de rotina (muco nasal, pele, gânglio e linfa cutânea) para com eles fazer novas tentativas de infecção, ou re-infecção leprótica pelos mosquitos. Esta experiência vai ser iniciada logo que a temperatura seja mais propícia à proliferação dos culicídeos, e talvez ela venha esclarecer tão grande incógnita.

CONCLUSÕES

1. Duas espécies de anofelinas (*Anopheles albitarsis* e *A. tarsimaculatus*) sugaram, em condições naturais, no crepúsculo culicídeo (CARLOS CHAGAS), leproso lepromatoso especialmente selecionados para esse fim, infectando-se fortemente pelos bacilos de HANSEN.

2. Em dois flebotomos (*Flebotomus intermedius*) que sugaram os leproso e foram dissecados pelo Dr. OLIVEIRA CASTRO, encontraram-se bacilos ácido-álcool resistentes na proboscida e no estômago.

3. Em esfregaços de dois exemplares de borrachudos (*Simulium*, provavelmente *pertinax*), capturados em leproso, foram encontrados alguns bacilos de HANSEN.

4. Confirmou-se a verificação feita na Colônia Santa Fé, em março de 1943, do achado de bacilos a.a.r. em *Phthirius pubis* retirados de leproso acamado.

5. Foi, também, confirmada a infecção natural, em leprosos, de ninfas de *Amblyomma cajennense*.

—:—:—

VERIFICATION, IN NATURAL CONDITIONS, OF INFECTION OF MORE THAN THREE HEMATOPHAGI (*Anophelinae*, *Flebotomus* and *Simuliidae*) IN LEPERS.

Summary and Conclusions.

The A. went last August to the State of Minas Gerais to continue his studies on transmission of leprosy by insects. He selected ten lepers (all L3 cases) for his experiments. It happened in the middle of August, a few days after freezing temperature. Practically there were no day mosquitoes, even near a river where in March there were very many.

Bringing the patients to a wood, near the Peixe River (Fish River), at the dawn they were attacked by very many *Anopheles*, some *Flebotomus*, a few *Simulium* and very rare *Culex scapularis*. All these insects became infected, in different degrees, by biting such patients.

CONCLUSIONS

1. Two species of *Anopheles* (*A. albitarsis* and *A. tarsimaculatus*) became strongly infected by Hansen bacilli.

2. By dissection done by Dr. Oliveira Castro were found lepra bacilli in various points of the proboscis of two *Flebotomus* (*F. intermedius*) and in their stomachs.

3. By smearing were found lepra bacilli in two specimens of *Simulium* sp. (probably *pertinax*).

4. It was confirmed also the verification done last March, at the same Leper Colony, that *Phthirius pubis* can be also a carrier of lepra bacillus.

5. There was confirmed also natural infection of nymphs of *Amblyomma cajennense* in lepers.

Dr. Oliveira Castro is dissecting the *Anopheles* to locate the bacilli in their organisms and he started, with the cooperation of the Director of Colônia Santa Fé, Dr. José Mariano, attempts to re-infect a group of negative-nerve cases of leprosy with infected mosquitoes.

Manguinhos, Rio de Janeiro, September 16, 1943.