

Infecção de ratos brancos com suco ganglionar de leproso, seguida do isolamento dum bacilo ácido-alcool resistente de órgãos do murideo, em meio de Loewenstein *

Nota prévia pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com 4 estampas)

INTRODUÇÃO

Depois de reiteradas tentativas infrutíferas de isolamento e cultivo, em meios artificiais, do bacilo de Hansen, semeando material de lesões cutâneas (emulsão de lepromas, suco cutâneo ou linfa), muco nasal ou sangue, resolvi fazer pesquisas com escarro e suco ganglionar de leproso.

Trabalhando até agora com 42 amostras de escarros de tais enfermos, já obtive, direta ou indiretamente, onze culturas de *Mycobacteria*, ns. 1, 5 (a n. 8 morreu), 17, 19, 21, 22, 24, 27, 29, 30 e 36) das quais dez com todos os característicos do *Mycobacterium tuberculosis hominis*, do tipo R, eugônico, e uma do tipo S (a n. 30), de cor amarela e aspecto úmido e lusidío, que acaba de ser inoculada em cobaias e ratos. Das primeiras amostras já tive tempo de obter quatro retroculturas por infecção dessas duas espécies de animais.

De mais de 15 amostras de sucos ganglionares de leproso semeadas em meios apropriados para bacilos ácido-álcool resistentes, de 1940 a 1941, só consegui uma cultura pura de bacilo desse grupo e essa mesma com os característicos da de Koch (n. 35).

Tendo Marchoux obtido, uma vez, uma cultura de bacilo a. a. r. semeando pus de abcesso dum rato branco inoculado com muco nasal de leproso, resolvi tentar idêntica experiência inoculando suco ganglionar rico em bacilos de Hansen.

* Recebido para publicação a 7 de agosto e dado à publicidade em novembro de 1941.

O resultado obtido foi duplamente interessante : consegui produzir nos murídeos uma *lepra visceral idêntica à do homem* e obtive uma cultura pura dum bacilo a.a.r. muito diferente das culturas dos bacilos das tuberculoses e também diferente das culturas cromogênicas ou não, obtidas de material de lepra humana ou murina.

São esses resultados, de suma importância, que passo a relatar nesta
NOTA PRÉVIA.

PROCEDÊNCIA DO MATERIAL INFECTANTE

Encaminhado pelo Diretor do Serviço Médico do Banco do Brasil examinei, no dia 20 de agosto de 1938, o Sr. G. V. A., branco, de 26 anos de idade, solteiro, de estatura mediana e constituição robusta, recentemente chegado do Estado de São Paulo, de onde é natural.

G. nega casos anteriores de lepra na sua família. Seu pai tinha morrido de pneumonia, 10 anos antes, e sua mãe, filha de pai alemão, é sadia. O paciente, que havia deixado o lar paterno há mais de 10 anos, tem cinco irmãos e seis irmãs, todos espalhados, não sabendo do estado de saúde atual dos mesmos.

G. tinha tido, há 5 meses (março de 1938), um exantema generalizado, com febre, que durou 23 dias e deixou infiltração nas orelhas e engorgitamento nos gânglios cervicais e inguino-crurais. Na ocasião do exame apresentava moderada infiltração nas orelhas, engrossamento do nariz (sofre de ozena há 12 anos), máculas eritematosas na fronte, regiões malares, peito e abdômen, duas placas verrucóides, de cor rubra, na região lombar esquerda, lepromas chatos (papulóides) na nadega esquerda, joelhos e faces posteriores das pernas, além de outras lesões de menor importância. Como sintoma culminante apresentava acentuada hipertrofia dos gânglios cervicais (escrofulose leprosa) e inguino-crurais. Classifiquei-o como um caso de lepra L2.

No correr dum mês lhe foram feitos os seguintes exames de laboratório:
Muco nasal: ++ e globias.

Suco cutâneo da perna, dorso e fronte : ++

Suco ganglionar do pescoço : ++

Reação de Rubino : negativa.

Reação de Witebsky : +++++

Reação de Rost-Mitsuda: negativa.

E posteriormente :

Índice de sedimentação das hemátias: 106 mm. Westergreen.

Reação de Wassermann : negativa.

Reação de Gaté-Papacostas: negativa.

No fim de 1938 agravando-se a sua escrofulose cervical mandei-o ao cirurgião Prof. Pedro Moura, que o operou com bom resultado. (Foto 1).

No correr de 1939 G. teve repetidas reações lepróticas, com exacerbação das lesões cutâneas e supuração de um ou outro gânglio inguino-crural, cujo pús continuava rico em bacilos e globias.

Em junho inoculei um rato com esse material, o qual, sacrificado cinco meses após, mostrou infecção ganglionar. Após uma forte reação leprótica, em fins de dezembro de 1939, os gânglios do paciente incharam-se consideravelmente e tornaram-se dolorosos.

No dia 11 de janeiro de 1940 puncionei esses gânglios, obtendo abundante pús, rico em bacilos de Hansen, o qual inoculei em três ratos brancos. Um mês depois, a 13 de fevereiro, fiz nova colheita de suco ganglionar e inoculei mais um rato.

Desde então passei a injetar Calmestrol (ester etílico de óleo de Chaulmoogra Bayer) nos gânglios do paciente e como as melhoras não se mostravam desconfiei duma associação da doença de Nicolas-Favre com a lepra, mas a reação de Frei, que lhe fiz com o Lygranum, ativo antígeno do Instituto Squibb, foi negativa. Pensando numa possível associação da tuberculose, examinei o seu escarro duas vezes, com resultado negativo, tendo ainda, em observação, cobaias inoculadas com esse material. Insistí nas injeções de Calmestrol nos gânglios hipertrofiados, tratando a inflamação consequente com raios Infra-Vermelho.

Ultimamente três exames microscópicos do suco desses gânglios deram resultados negativos, fato que me causou surpresa. Pelo lado da pele esse doente apresenta apenas lesões residuais, apesar de estar ainda eliminando bacilos pela mucosa nasal.

Uma biopsia recente, numa lesão residual da face anterior da coxa direita do paciente, mostrou a presença de leproma profundo, conforme o protocolo do exame histopatológico n. 9899, diante transcrito (fig. 2, Est. 1).

MARCHA DAS EXPERIÊNCIAS

Marchoux ensinou-me que o melhor meio de infectar ratos com lepra murina é fazer-lhes injeção de $\frac{1}{2}$ e 1 cm³ de emulsão de leproma Stefansky por via subcutânea, de preferência na axila. E somente depois de 6 meses a um ano é que aparecem os primeiros sintomas da doença.

Colhido suco ganglionar de G. a 30 de junho de 1939, e mostrando-se este material muito rico em bacilos de Hansen, emulsionei-o em 1 cm³ de soro

fisiológico e inoculei-o na axila direita dum rato branco, pelo método acima, deixando-o isolado numa gaiola metálica. Cinco meses após, a 30 de novembro, sacrifiquei esse rato, encontrando todos os seus gânglios axilares e inguinais hipertrofiados e ricos em bacilos a.a.r. com a morfologia do de Hansen. Nos esfregaços das vísceras não foram encontrados bacilos. Concluí que houve apenas infecção ganglionar, não tendo havido tempo para ela estender-se às vísceras.

No dia 11 de janeiro de 1940, puncionei de novo o paciente, em dois gânglios inguinais, tendo obtido cerca de 1 cm³ de pus, que emulsionei em 3 cm³ de soro fisiológico e inoculei, no dia seguinte, em três ratos brancos (lote 2, 1940), em doses iguais. A via utilizada foi a subcutânea, na axila direita. Durante todo o ano de 1940 esses animais foram examinados várias vezes. Cerca de 15 meses após (29 de abril 1941) morreu um deles, apresentando placas de alopecia no dorso e lesões bacilíferas no baço.

No dia 19 de junho morreu o 2.º rato (17 meses e 1 semana após a inoculação), também apresentando placas de alopecia no dorso. A autópsia revelou uma infecção generalizada: gânglios e vísceras todos muito ricos em bacilos a.a.r. Esses órgãos foram enviados ao Dr. C. Magarinos Torres para exame histopatológico, deixando um pedaço de fígado na geladeira para sementeiras. Cinco dias após, quando obtive o meio de Loewenstein, triturei esse fragmento de fígado em geral esterilizado, com soro fisiológico e semeei 6 tubos desse meio. No dia 3 de julho recebi o protocolo da Secção de Anatomia Patológica confirmando o que os esfregaços nos fizeram supor: *infecção generalizada do rato com produção de lesões lepromatosas nas vísceras*, como veremos adiante.

No dia 9 de julho 2 dos 6 tubos de Loewenstein semeados apresentavam germinação (15.º dia) dum cultura pura de bacilos a.a.r.

No dia 19 de julho sacrifiquei o 3.º e último rato do lote 2, 1940, exatamente 18 meses e 1 semana após a inoculação. Este murídeo apresentava 3 placas de alopecia: no dorso, raiz da cauda e anca esquerda. Necropsiado apresentava hipertrofia notável dos gânglios, cujos esfregaços pareciam uma cultura pura de bacilos de Hansen (fig. 14, est. 4). Os esfregaços das vísceras não revelaram bacilos, entretanto.

A emulsão dos gânglios, riquíssima em bacilos, foi semeada em meio de Loewenstein e inoculada em três ratos brancos (lote 18, 1941), pela mesma técnica acima descrita.

Será que estes animais resistirão também 18 meses, tempo necessário para a formação de lesões lepromatosas características?

DESCRIBÇÃO DAS LESÕES DO RATO

Habitado a necropsiar ratos infectados experimentalmente com o bacilo de Koch e o bacilo de Stefansky, ao examinar os ratos inoculados com suco ganglionar de leproso impressionou-me desde logo a ausência de nódulos caseosos ou tubérculos miliares, e de tumores axilares aderentes à pele e musculos, principais lesões macroscópicas daquelas infecções. Apenas os gânglios, sobretudo os axilares, chamaram a minha atenção pelo seu tamanho. Os esfregaços dos gânglios, pulmão, fígado e baço eram impressionantemente ricos em bacilos a.a.r., o que não acontece na tuberculose. Os esfregaços dos rins revelaram raros bacilos. Isto se compreende pela preferência do bacilo de Hansen pelo S.R.E.

O protocolo 9873 da Secção de Anatomia Patológica diz tudo :

“Diversos órgãos de Rato (lote 2, 1940), inoculado com suco ganglionar de leproso.

Observações: “Órgãos riquíssimos em bacilos ácido-álcool resistentes”. Resultado do exame anátomo-patológico: “Em preparações microscópicas de fígado, nódulos (figuras 5 e 7, est. 2), por vezes confluentes, bem circunscritos, constituídos por grandes células mononucleares, com citoplasma vacuolado, frequentemente na vizinhança de espaços porta, outras vezes em pleno lóbulo hepático. Não há necrose de caseificação.

“Em preparações microscópicas de pulmão aparece, junto ao tecido pulmonar, um volumoso nódulo formado (figs. 9 e 11, est. 3), unicamente, por grandes células mononucleares com citoplasma vacuolado, juxtapostas (figs. 10 e 12), aí não existindo necrose de caseificação”.

“Nos preparados microscópicos de baço aparecem nódulos (fig. 4, est. 1) semelhantes aos descritos no fígado, mais volumosos, e bem assim, extensas áreas de necrose”.

“Rim sem alterações do normal”.

(a) Dr. C. Magarinos Torres.

As lesões nodulares do fígado são semelhantes às descritas na lepra humana por Mac Callum como “miliary lepromata”. A figura 302, da página 627 do seu *Text book of Pathology*, tem a seguinte legenda:

“Focal accumulation of lepra cells in the liver”.

Essa figura é semelhante às nossas 5 e 7 da estampa 2.

Apresentados os cortes e esfregaços desse rato à Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro, em sua sessão de 25 de julho, para aceitar-se como lesões

típicas de lepra humana, — porque afastou-se desde logo a tuberculose e pensou-se numa nova forma de lepra (Dr. Torres), — reclamou-se uma biopsia no doente que forneceu o material da experiência, a qual foi feita por mim. As lesões encontradas em cortes duma lesão residual, dessas do tipo pastoso, existente na coxa direita do paciente, que figuram no protocolo 9899, coincidem inteiramente com as lesões descritas no material do rato infectado com o suco ganglionar do mesmo doente.

Protocolo 9899, de 29/7/41 da Secção de Anatomia Patológica :

Doente Sr. G. V. (Médico Dr. Souza Araujo). Biopsia da pele (coxa direita).

Diagnóstico clínico: Lepra.

Resultado do exame anátomo-patológico:

“Epiderme sem alterações dignas de nota. Extensas lesões no derma, constando de infiltrado celular formado por grandes células mononucleares com citoplasma vacuolado (células leprosas), macrófagos, linfócitos, células plasmáticas, células fusiformes e, ocasionalmente, células gigantes. Tal infiltrado (leproma) ocupa área de extensão mais ou menos considerável, sem necrose de caseificação, apresentando continuidade em manguitos perivasculares, tendo idêntica constituição histológica. Infiltrado semelhante é visto em torno de glândulas anexas da pele, bem como em torno e no interior de pequeno nervo cutâneo. (Figura 2, Estampa 1).

(a) Dr. C. Magarinos Torres

ASPECTO DA CULTURA OBTIDA DO RATO

Os órgãos do rato necropsiado a 19 de junho foram conservados na geladeira durante 5 dias, enquanto se preparava o meio de Loewenstein. Aliás pela experiência anterior ficou provado ser mais conveniente, para isolamento e cultura de bacilos a.a.r. de escarros, deixar o sedimento dos mesmos, após tratamento pelo método de Petroff, na geladeira durante 3 a 5 dias antes de semear.

No dia 24 de junho semeei com emulsão de fígado do rato acima seis tubos de Loewenstein. Quinze dias após (9/7) dois deles germinaram. A cultura, de cor amarelada, sob a forma de delgada e uniforme camada subindo até 2/3 da superfície do meio. O exame microscópico não só da borda superior dessa camada, como do fundo do tubo, revelou tratar-se duma cultura pura de bacilos a.a.r., elementos isolados, em feixes ou em massas. (Fig. 15, Est. 4).

Mostrada essa cultura ao Dr. Genesio Pacheco, ele a considerou diferente das de tuberculose e sugeriu-me a sua passagem em animais o mais breve possível (ratos e *Macacus rhesus*).

No dia 2 de agosto inoculei com ela 4 ratos brancos criados isentos de possíveis contaminações e gentilmente cedidos pelo Dr. A. Machado. No dia 5 o Sr. Raymundo Honorio desenhou a referida cultura de um tubo original. A 11 de agosto inoculei-a nas virilhas dum *Macacus rhesus* gentilmente cedido pelo Prof. A. Marques da Cunha.

Os tubos restantes das tres gerações dessa cultura permanecem na estufa, a 37° C. e dão-me a impressão de que ela está definhando.

Pela valiosa cooperação que me prestaram nestas pesquisas confesso-me muito grato ao Dr. Joir Fonte, meu assistente clínico, ao Dr. Magarinos Torres e Sr. M. Borchert.

CONCLUSÕES

1 — Ficou provado que o suco ganglionar de leproso é infectante para ratos brancos.

2 — Após uma incubação longa, variando entre 15 a 18 meses, os ratos inoculados com esse material apresentaram sintomas de lepra ganglionar ou lepra visceral típica.

3 — A sementeira, em meio de Loewenstein, de emulsão de órgãos dum rato infectado, deu origem a uma cultura pura de bacilo a.a.r. diferente da de tuberculose.

4 — Esta experiência merece ser repetida, em maior escala, havendo indício de que será o meio de se esclarecer um ponto obscuro da etiologia da lepra humana.

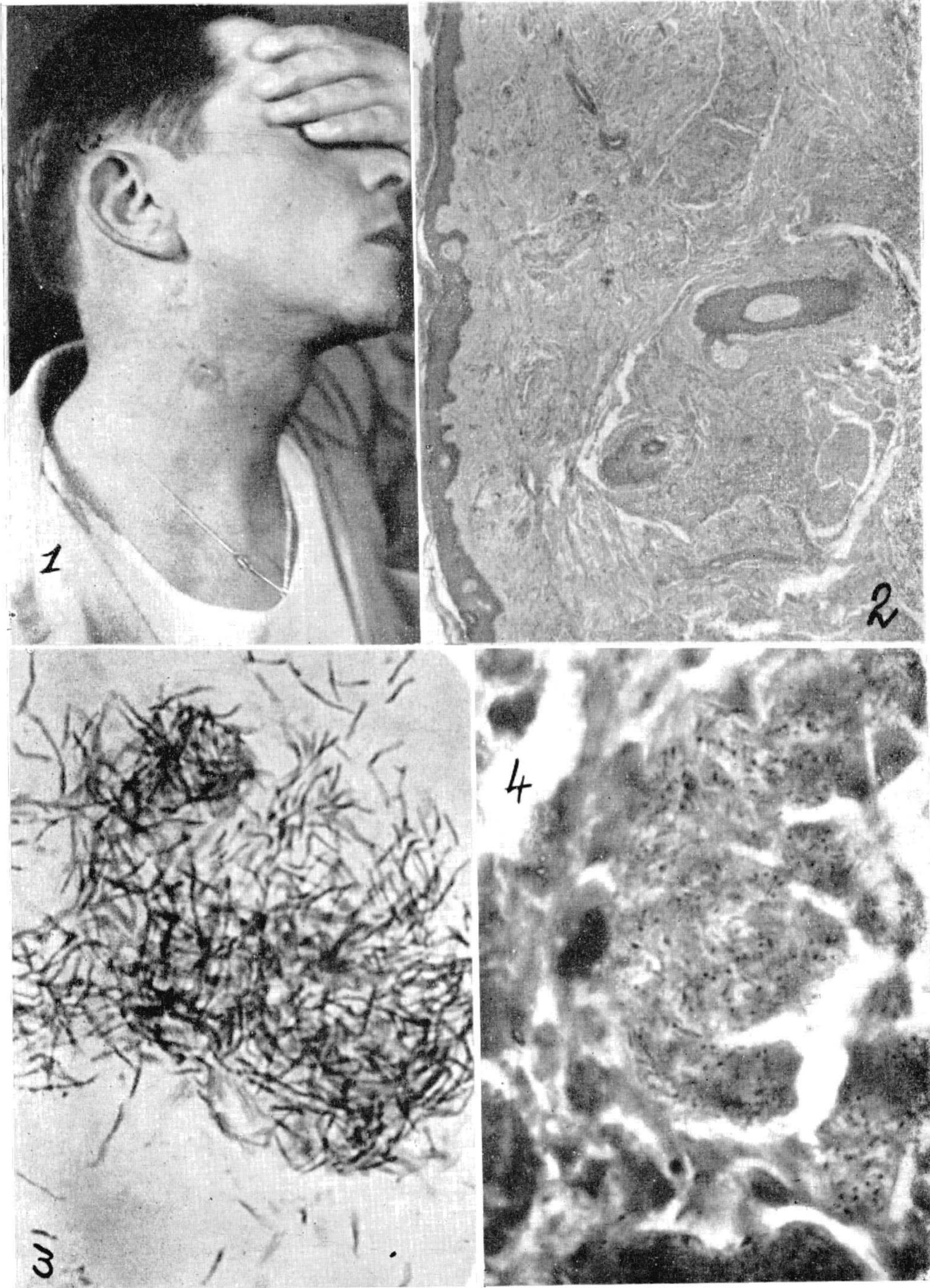
ESTAMPA 1

Fig. 1 — Retrato do doente G. V. (1941) que forneceu o succ ganglionar, mostrando as cicatrizes da escrofulose cervical.

Fig. 2 — Corte da lesão cutânea do leproso G. V. (julho 1941).

Fig. 3 — Esfregaço do baço do rato 2, lote 2, 1940, morto 17 meses e 1 semana após a inoculação do succ ganglionar, mostrando a enorme riqueza de bacilos a.a.r. (Ziehl. Imersão).

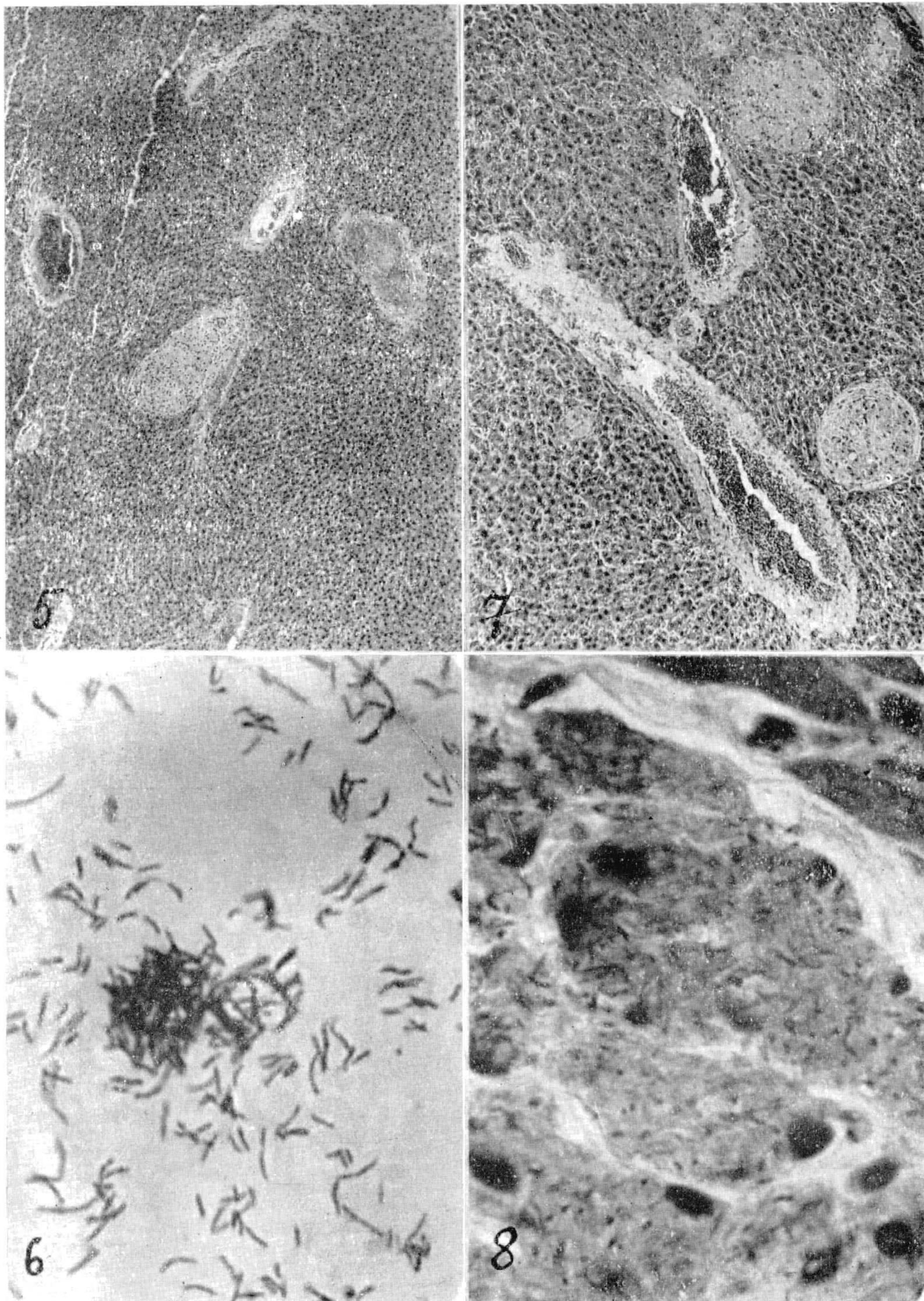
Fig. 4 — Corte do mesmo baço mostrando um nódulo, típico leproma (Ziehl. Imersão).



Souza-Araujo : Infecção de ratos com lepra

ESTAMPA 2

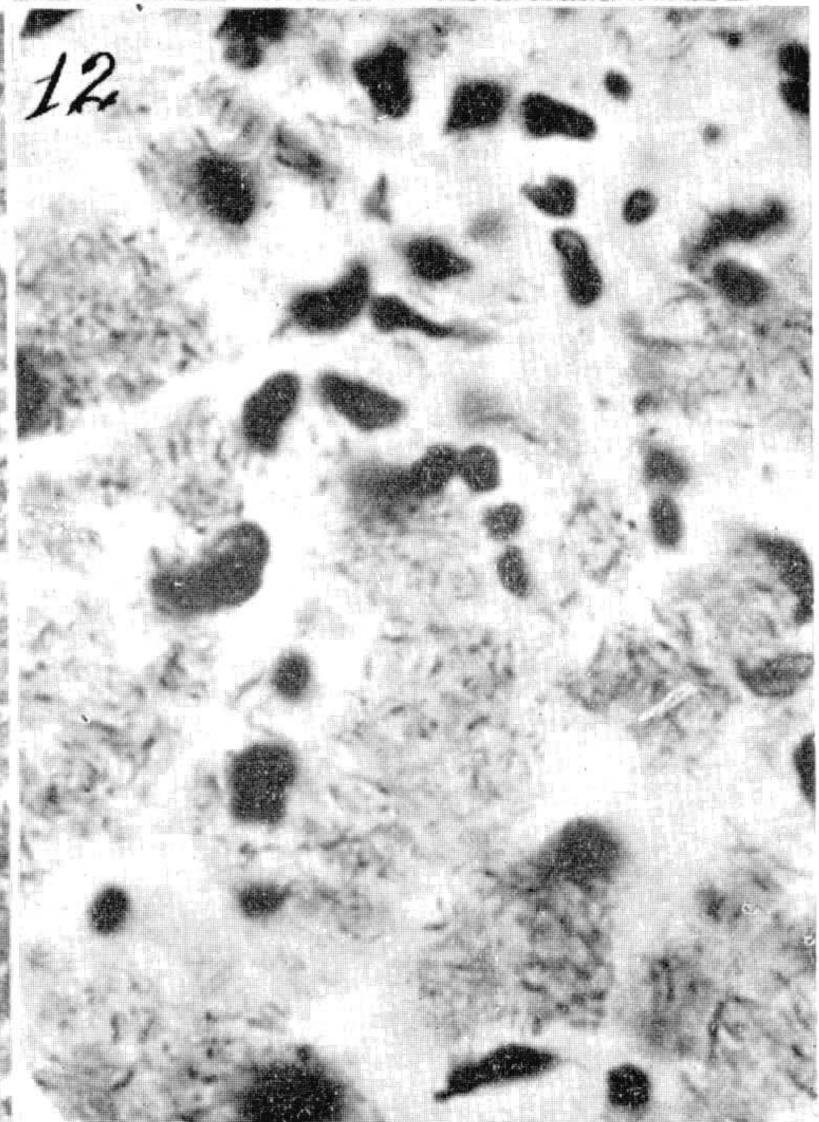
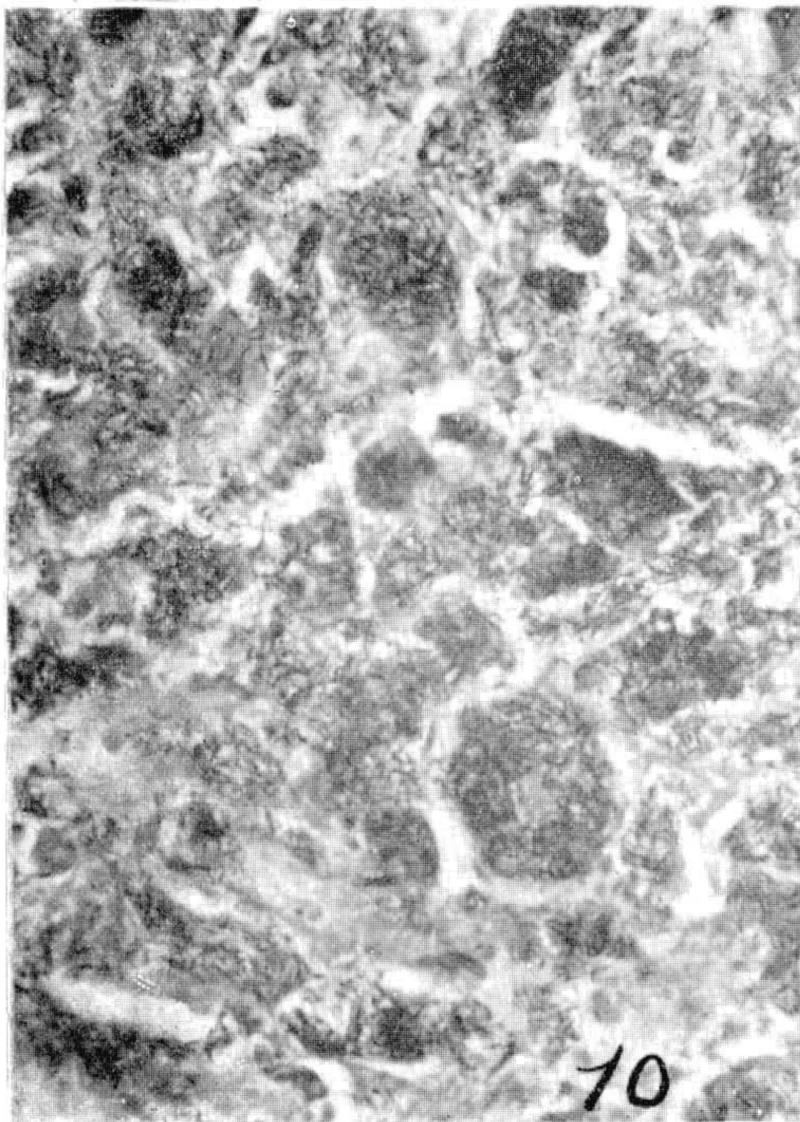
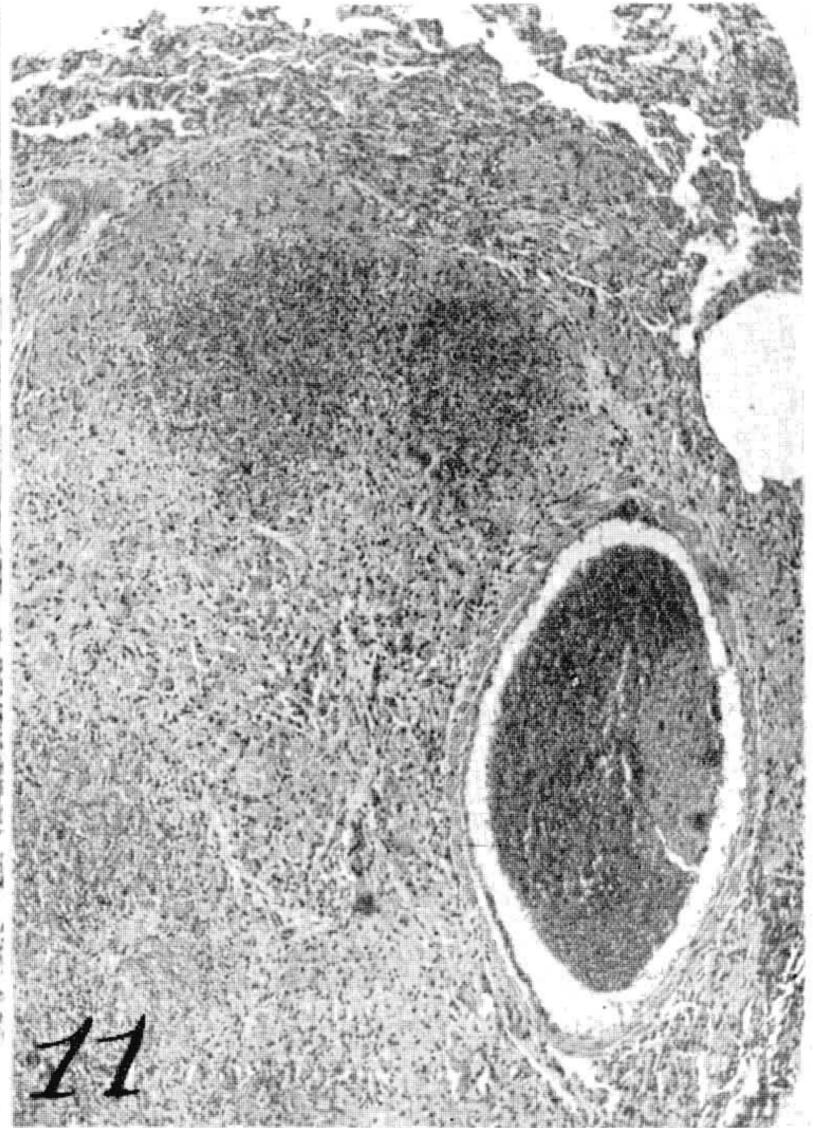
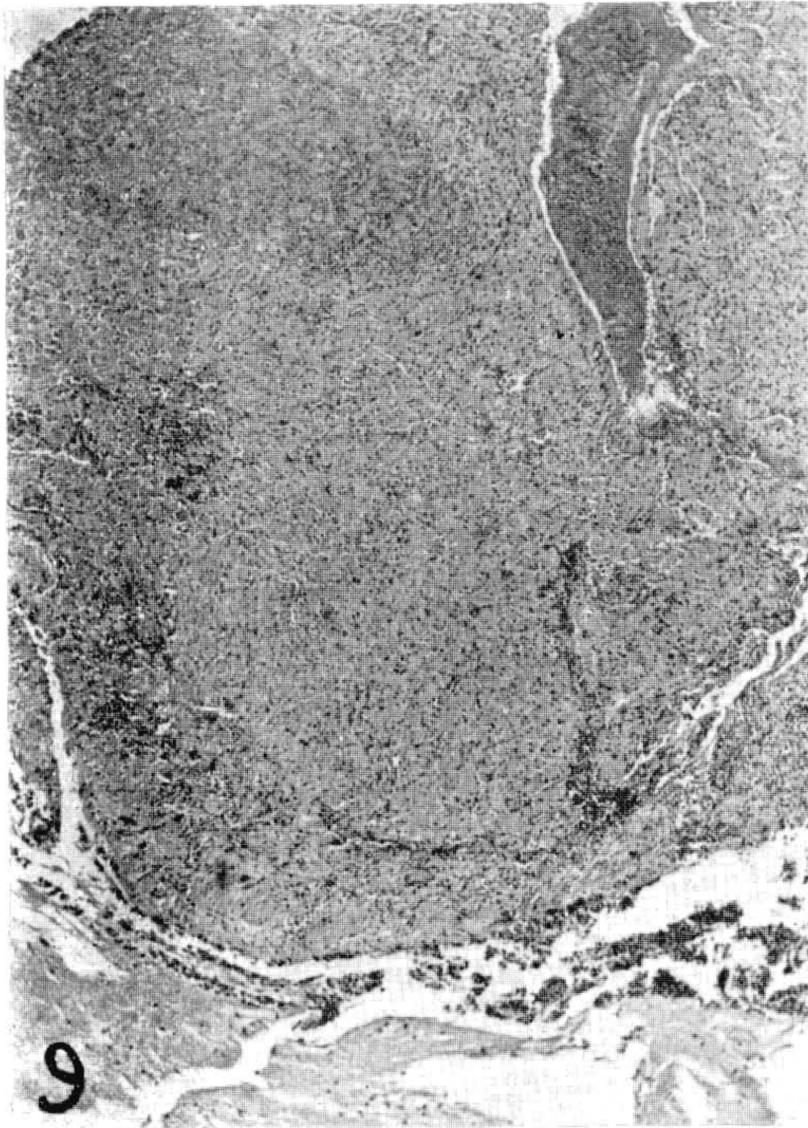
- Fig. 5 — Corte de fígado do rato mostrando nódulos bem circunscritos (lepromas) semelhantes à fig. 302, pág. 627 do Text Book of Pathology de Mc Callum, edição de 1922. (H. E. fraco aumento).
- Fig. 6 — Esfregaço do mesmo fígado mostrando massas de bacilos da lepra, homogêneos ou nodulosos. (Ziehl. Imersão).
- Fig. 7 — Outro corte do mesmo fígado, com maior aumento, mostrando nódulos de vários tamanhos e vasos. Cada um desses nódulos é um acúmulo de células leprosas típicas.
- Fig. 8 — Corte do mesmo fígado mostrando as células leprosas e massas de bacilos ou grânulos, no interior dum nódulo da fig. 7. (Ziehl. Imersão).



Souza-Araujo : Infecção de ratos com lepra

ESTAMPA 3

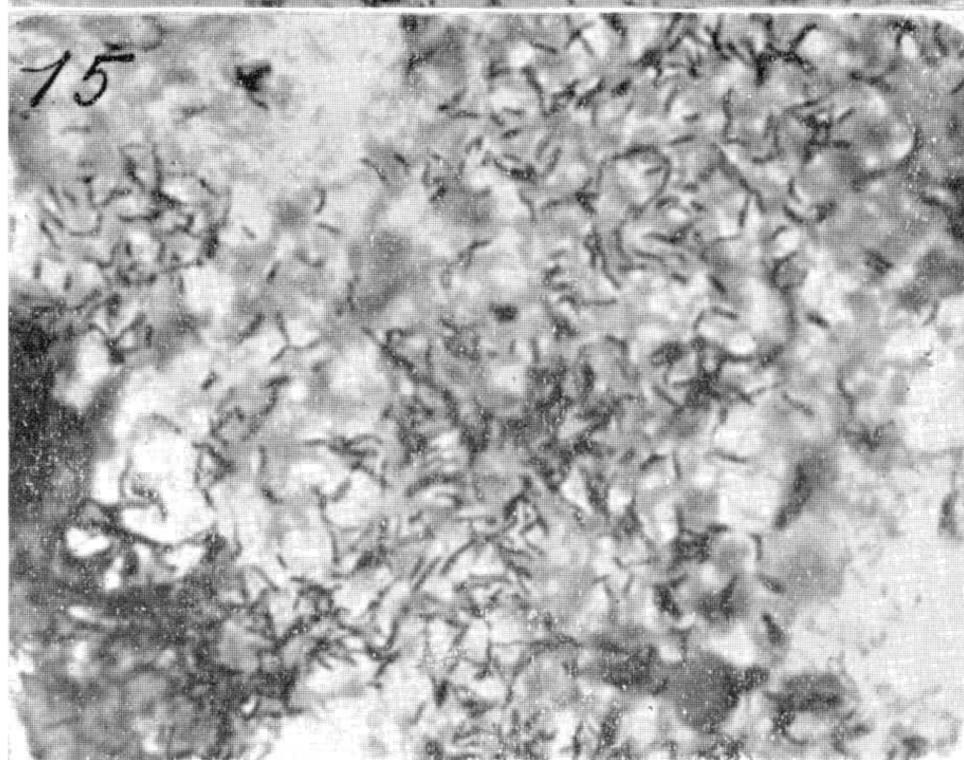
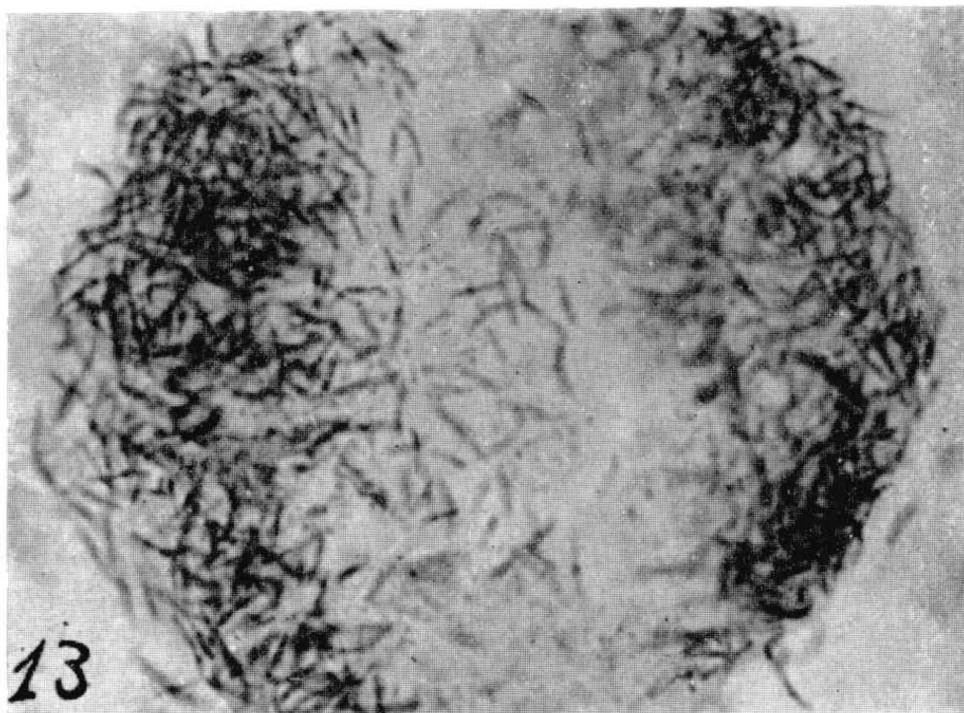
- Fig. 9 — Corte do pulmão do rato 2 mostrando um granuloma formado exclusivamente por células leprosas.
- Fig. 10 — Corte do mesmo pulmão corado pelo Ziehl-Neelsen mostrando a constituição desse granuloma, semelhante ao leproma humano. (Imersão).
- Fig. 11 — Outro corte do pulmão mostrando outro granuloma.
- Fig. 12 — Corte do pulmão mostrando o granuloma na vizinhança duma artéria: bacilos intra e extra-celulares. (Imersão).



Souza-Araujo : Infecção de ratos com lepra

ESTAMPA 4

- Fig. 13 — Esfregação do gânglio do rato 2. Massa gigante de bacilos da lepra. (Imersão).
- Fig. 14 — Esfregação da emulsão dos gânglios do rato 3, mesmo Lote 2, 1940, mostrando enorme riqueza de bacilos.
- Fig. 15 — Esfregação da cultura (15 dias) do bacilo a.a.r. isolado do fígado do rato 2 (Lote 2, 1940) em meio de Loewenstein. Esta cultura, que é diferente das de tuberculose, já foi inoculada em ratos brancos e **Macacus rhesus**.



Souza-Araujo: Infecção de ratos com lepra