

Culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de hematófagos infectados em leprosos. Evidências de se tratar do bacilo de Hansen (*)

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com uma estampa colorida e 40 figuras em negro no texto)

Introdução

Depois de muitos anos de pesquisas bacteriológicas da lepra, iniciadas neste Instituto em comêço de 1928, consegui, afinal, uma cultura de bacilo permanentemente ácido-álcool resistente isolado de lepra humana, a amostra "José", descrita em 1942 nestas Memórias (Tomo 37, pág. 29). Nesse mesmo trabalho, em adendo, descrevi uma retrocultura obtida de cobaia inoculada com essa cultura original, a qual tomou o N. 1a, na minha coleção. Repetindo as inoculações dessa cultura "José" (N. 1) em animais de laboratório, obtive uma segunda retrocultura, dum rato do lote 49, inoculado a 21-10-42, na axila direita com 1 cc. de emulsão duma amostra da cultura "José", de dois meses, em LOEWENSTEIN. A 23-2-43, 94.º dia da inoculação, morreu um dos ratos dêsse Lote 49 apresentando hipertrofia dos gânglios inguinais e axilares, cujos exames foram positivos para bacilos a.a.r. A emulsão dêsses gânglios foi semeada em sete tubos de LOEWENSTEIN, que se contaminaram. No mesmo dia 23-2-43 sacrifiquei o outro rato do Lote 49, encontrando na sua axila direita três bôlsas de pus, interessando a musculatura torácica. O esfregaço dêsse pus parecia uma emulsão de cultura pura de bacilos a.a.r. pleomórficos. Semeei êsse pus em seis tubos de LOEWENSTEIN, além doutros meios comuns, e em 5 daqueles germinaram colônias amarelas, circulares, umbilicadas, cujo exame microscópico, feito a 4-3-43,

(*) O essencial dêsse trabalho foi comunicado à Academia Nacional de Medicina no dia 18 de novembro de 1943.

* Recebido para publicação a 14 de janeiro e dado à publicidade em fevereiro de 1944.

revelou estarem puras. Três dêsses 5 tubos originais foram conservados intactos até hoje (13/1/44): as colônias têm o aspecto sêco, são umbilicadas, algumas maiores são cerebriformes, côr de ouro.

No caldo glicerinado esta cultura lb produz véu idêntico às Ns. 1 e 1a. Semeadura dêsse véu em agar glicerinado produziu, em seis meses, uma germinação abundante, cobrindo tôda a superfície do meio, sem o fermentar, mostrando uma camada finamente granulosa sobreposta de outra de grânulos maiores, como se vê na figura 6. No fundo do tubo o micróbio germinou sob a forma de tênue camada amarela subindo um centímetro pela parede do tubo. Macroscópica e microscópicamente as três culturas: 1, 1a, e lb são iguais.

Na Colônia Santa Fé (Minas) colhi material, reiteradamente, de dois casos pustulosos idênticos ao daqui (José) que me deu as culturas acima. Um dêsses dois casos era Vita M., moça branca, da qual colhi pus de lesões fechadas, riquíssimo em bacilos de HANSEN, e semeei em cinco séries de tubos (na sua maioria de LOEWENSTEIN), em épocas diferentes, espaçadas até de seis meses, com resultado *absolutamente negativo!* O outro caso, G. Prudencio, homem preto, me forneceu pus de várias lesões fechadas, material êsse também riquíssimo em bacilos, que semeei no ato da colheita e posteriormente. Da coleta de 23-8-43 emulsionei o pus em sôro fisiológico estéril, até 6-9 quando semeei essa emulsão, em LOEWENSTEIN e caldo glicerinado. Após 23 dias de incubação, os tubos de meio de ôvo, asparagina e verde de malaquita estavam estéreis e um tubo de caldo glicerinado apresentava um véu creme, cobrindo o meio, que permanecia límpido. O exame microscópico dêsse véu revelou germinação de bacilos a.a.r. em condições de pureza, mas as suas repicagens permanecem até hoje estéreis.

Depois de muitos anos de insucesso semeando muco nasal de leprosos, tive, afinal, evidências de germinação do bacilo de HANSEN de dois casos. O 1.º, Rubens R. C., homem mestiço de 40 anos, caso L3-N2 com muco nasal de fabulosa riqueza bacilar. No dia 3 de junho de 1943 colhi com alça de platina flambada reiteradas amostras de muco, que fui semeando em vários tubos. Após 14 dias de incubação, um tubo de caldo glicerinado apresentava um véu amarelado, cujo esfregaço foi positivo para bacilos a.a.r., em estado de pureza. O exame do depósito do tubo revelou contaminação por germe cianófilo. Um tubo de LOEWENSTEIN apresentava uma colônia amarela, de meio centímetro de diâmetro, cujo esfregaço foi positivo para bacilos a.a.r. Outras colônias de côr pardacenta provaram ser contaminação. No dia 21-6 (18 dias de incubação) três tubos de LOEWENSTEIN apresentavam germinação sob a forma duma colônia amarela, umbilicada, em

cada tubo, na parte superior do meio. O exame microscópico da maior dessas colônias revelou muitos bacilos a.a.r. entre bactérias cianófilas, as que frequentemente abundam em material dessa natureza e em pouco tempo dominam a cultura, destruindo os bacilos a.a.r.

Tôdas as repicagens dessas colônias se contaminaram. O outro caso, Mário M., homem de 50 anos, caso L3 com ulceração no septo nasal e muco rico em bacilos. A semeadura dêste material também me forneceu evidência de multiplicação do bacilo de HANSEN sob a forma de véu, sôbre caldo glicerinado, mas a sua passagem para outros meios fracassou. Dum 3.º caso, Angelo L., também homem adulto com lepra L3 e muco nasal muito rico em bacilos, colhi êste material com cureta e fui emulsionando-o nágua destilada estéril, à qual adicionei ácido sulfúrico a 5%, deixando atuar durante mais de meia hora, depois centrifugando e lavando o sedimento duas vêzes em água destilada estéril, sempre seguidas as lavagens de novas centrifugações. O sedimento assim obtido semeiei nos meios apropriados, que continuam na estufa.

Fato impressionante é o resultado negativo, até esta data, das repetidas semeaduras de linfa subcutânea de leprosos. Neste material predominam os cocoides ou cocobacilos a. a. r. em estado de pureza e por que não germinam? Só uma vez (caso L. Bassini) tive evidência de multiplicação do germe. O determinismo do isolamento e cultura em meios artificiais do bacilo de HANSEN ainda não está descoberto. Insistirei nas semeaduras de linfas.

Resultados das semeaduras de hematófagos

Técnica. Regra geral costume mergulhar os hematófagos retirados de leprosos o mais cedo possível em solutos de soda cáustica a 10 % ou de ácido sulfúrico a 5%, em tubos de hemólise esterilizados, nos quais solutos permanecem pelo menos durante 30 minutos, lavando-os em seguida duas a três vêzes com água destilada esterilizada. Rápida trituração do parasito em microtritador esmerilhado, com um pouquinho de água destilada como hemolisante. Conforme os casos, semeio êsse triturado *in natura* ou após centrifugações e lavagens. Em se tratando de hematófagos alados, antes de mergulhá-los naqueles solutos, corto-lhes as asas, pernas, antenas e cabeça para que sua desinfecção externa seja mais perfeita.

1 — Culturas obtidas de *Amblyomma cajennense*

A primeira cultura de bacilo a. a. r. que obtive de *A. cajennense* vem descrita nas Memórias (Tomo 37, pág. 101). Era procedente da Co-

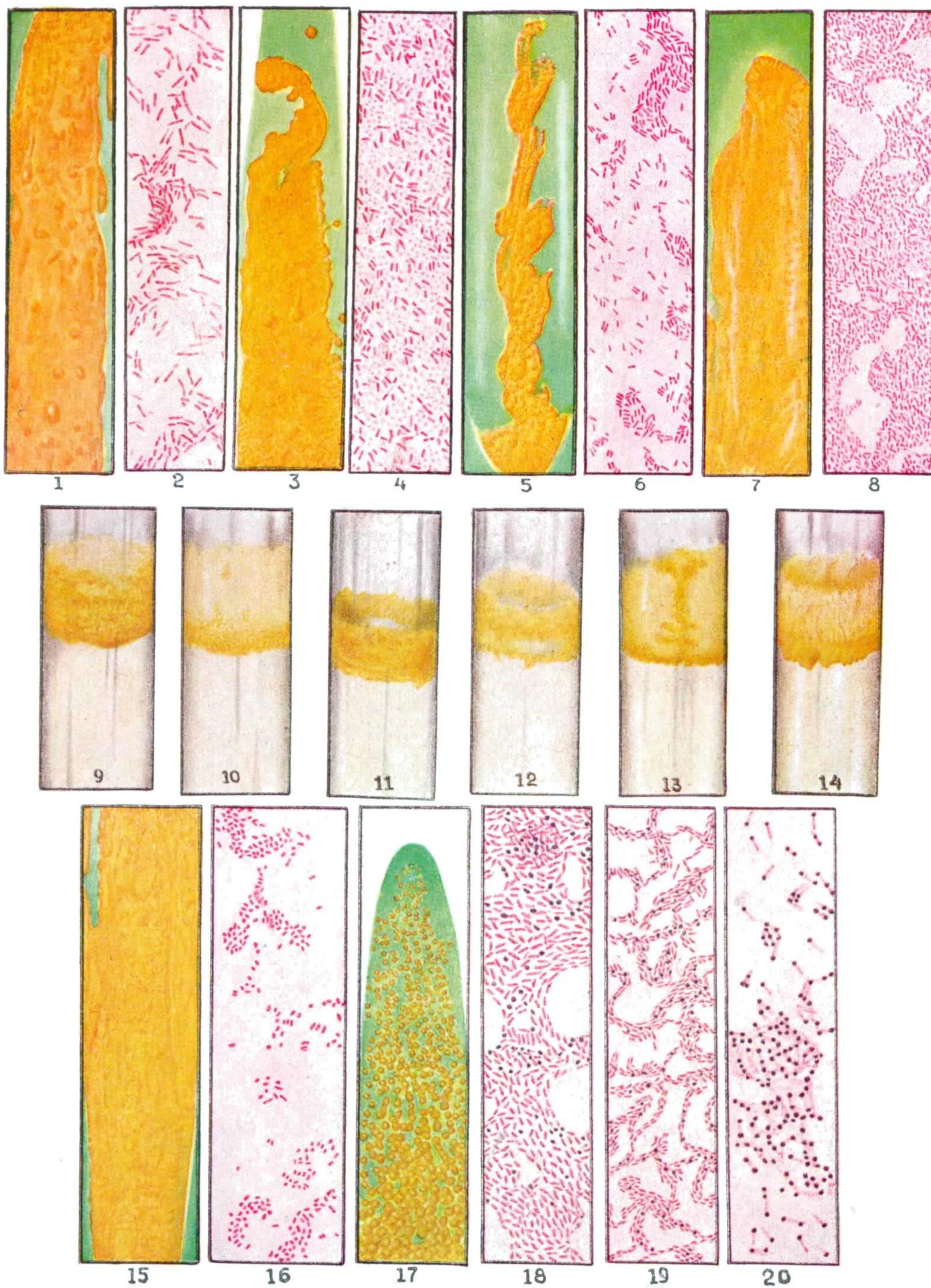
lônia Santa Isabel (Minas), mostrou-se nítida, de aspecto verrucoso e cor branco-pérola, após 62 dias de incubação. Essa cultura, de caracteres microscópicos duma constância notável, morreu na 20ª geração (12-8-1943).

Sob o título de "Nótulas sobre as Culturas" de carrapatos publiquei nestas Memórias (Tomo 37, pág. 418), de setembro de 1942, ligeiros informes sobre as culturas que hoje têm os números 2, 3, 4 e 5 da minha coleção e que ainda sobrevivem e continuam sendo objeto de estudos.

ESTAMPA 1

Bacilos ácido-álcool resistentes isolados de Hematófagos

- Figuras 1 e 2 — Aspectos macro e microscópico da Cultura N. 2 (amostra "Alcebiades"), isolada de *Amblyomma cajennense*. Meio de Loewenstein com verde de malaquita.
- Figuras 3 e 4 — Aspectos macro e microscópico da Cultura N. 3 (amostra "Teixeira"), isolada de *Amblyomma cajennense*. Meio de Loewenstein. As culturas acima são as mais cromogênicas de toda a série.
- Figuras 5 e 6 — Aspectos macro e microscópico da Cultura N. 4 (amostra "Ramtun"), isolada de *Boophilus microplus*. Meio de Loewenstein. Esta cultura é de cor de ouro e a mais pegajosa de todas.
- Figuras 7 e 8 — Aspectos macro e microscópico da Cultura N. 5 (amostra "Rudan"), isolada de *Boophilus microplus*. Meio de Loewenstein.
- Figuras 9 a 14 — Véus sobre caldo glicerinado a 5%, respectivamente das Culturas Ns. 1 (amostra "José") e 1a (amostra "José", retrocultura de cobaia) e Ns. 2, 3, 4 e 5, correspondentes às figuras 1, 3, 5 e 7.
- Figuras 15 e 16 — Aspectos macro e microscópico da Cultura N. 6 (amostra "José Carlos"), isolada de larvas de *Triatoma infestans*. Esta cultura permanece como cocobacilo após a passagem em vários meios.
- Figura 17 — Aspecto macroscópico da Cultura N. 7 (amostra "Chagas"), isolada de larvas de *Triatoma infestans*. 2.ª geração de 10 dias, após tratamento da cultura original pelo ácido sulfúrico a 5%.
- Figura 18 — Aspecto microscópico da Cultura N. 7, original, após 33 dias de incubação. Além dos granulos metacromáticos característicos da espécie havia, na cultura original, colônias pardacentas de bactérias cianófilas. O tratamento pelo ácido sulfúrico eliminou a contaminação e deu-lhe maior exuberância.
- Figura 19 — Aspecto microscópico da cultura do desenho 17, purificada pelo ácido sulfúrico (método de Loewenstein).
- Figura 20 — Aspecto microscópico dessa mesma cultura, esfregaço corado pelo Dr. Oliveira Castro (método Fontes modificado) para demonstração das várias formas do bacilo, desde o em clava e alfinete até o haltere e cocótrice.



R. Honorio e A. Pugas, del.

Souza Araujo — Cultura do bacilo da lepra

Cultura N. 2 (Amostra "Alcebiades") — Esta cultura foi obtida em três de nove tubos de meio de LOEWENSTEIN semeados em 8-6-42 com sedimento duma fêmea de *A. cajennense* que sugou, durante 42 horas, sobre lesão lepromatosa do peito de Alcebiades P., internado no Leprosário São Roque, do Paraná. A germinação, sob a forma de pequenas colônias arredondadas e de côr alaranjada, se mostrou no 21.º dia de incubação, a 37°C.

O intervalo que medeou a retirada do ixódida da pele do doente e a sua semeadura foi de 4 dias. A passagem dessa cultura N. 2 para os meios glicerinados — agar, batata e caldo — alterou a sua pigmentação, tornando-a mais intensa, chegando, na batata, a assumir a côr de cenoura.

Como algumas amostras dessas quatro culturas de carrapatos mostraram entre os bacilos a.a.r. elementos cianófilos, suspeitos de contaminação, resolvi submetê-las a um tratamento pelo método de LOEWENSTEIN.

Emulsão das culturas em soluto a 5% de ácido sulfúrico, no qual permaneciam durante 30 minutos; centrifugação; tratamento do sedimento pelo soluto a 3% de ácido acético, 15 minutos; centrifugação; duas lavagens com água destilada esterilizada seguidas de novas centrifugações. O sedimento final foi, então, semeado no LOEWENSETIN e nos meios glicerinados. Essa prova teve lugar no dia 2 de setembro de 1942 e a 21 do mesmo mês o Dr. MALCOLM H. SOULE, Professor de Bacteriologia da Universidade de Michigan, examinou esfregaços de tôdas essas culturas, achou-as muito interessantes e sugeriu-me que, se precisasse repetir o tratamento purificador, usasse soluto a 4% de ácido sulfúrico e não a 5%, mas a sua impressão é de que não seria mais necessário.

No dia 8 de outubro, cinco semanas depois daquele tratamento pelos dois ácidos, a cultura N. 2 em batata glicerinada apresentava exuberante germinação sobre metade da superfície do meio, de aspecto uniforme, luzidio, úmido e de côr salmão. Na superfície da água glicerinada havia um anel de cultura circundando a extremidade da batata. A água não se turvou nem apresentava depósito.

Cultura N. 3 (Amostra "Teixeira") — Uma fêmea de *A. cajennense* trazida por mim de Caêê, norte do Paraná, foi aplicada sobre lesão lepromatosa do abdome de J. Teixeira, teve o seu repasto interrompido 42 horas após por motivo do meu regresso ao Rio, onde, 4 dias depois, foi triturada e semeada em 9 tubos de LOEWENSTEIN. Isto teve lugar a 8 de junho e a 11 de julho (33 dias de incubação a 37° C.) um dos tubos apresentava sete colônias circulares, umbilicadas e de côr alaranjada. No dia 18 de julho verifiquei que eram de bacilos a.a.r. e estavam puras, tendo-as repicado. Como êsse tubo de germinação original foi quebrado pelo fotógrafo J. Pinto, todos

os estudos posteriores com esta cultura foram realizados com amostras da sua segunda geração e das subseqüentes.

Sem razão muito aparente, esta cultura foi também submetida (2-9-42) à ação dos ácidos sulfúrico (5 %) e acético (3%) e após repetidas lavagens e centrifugações foi o seu sedimento semeado nos meios usuais para germes a.a.r. Como de regra, a cultura se tornou mais exuberante. Nunca produziu, porém, no caldo glicerinado, quantidade satisfatória de véu para o fabrico de antígeno, tendo conseguido (7-8-43) apenas 208 ampolas de Leprolina N. 3, que está em experiência alhures.

2 — Culturas obtidas de *Boophilus microplus*

Cultura N. 4 (Amostra "Ramtun") — Com exemplares adultos de *B. microplus* capturados em gado vaccum do Leprosário S. Roque (Paraná), parasitamos experimentalmente o leproso F. Ramtun. Dois dêsses ixódidas sugaram-no durante 7 dias e foram por nós retirados a 2-6-42 e quatro dias após triturados e o seu sedimento semeado em 8 tubos de LOEWENSTEIN. No 52.º dia de incubação (28-7-42) um dêsses tubos apresentava um início de germinação. No dia 10 de agosto essa cultura apresentava o aspecto duma colônia circular, do tamanho duma lentilha e cromogênica. Examinada nesse dia mostrou-se pura e constituída de bacilos a.a.r. A repicagem espalhou a cultura no tubo original que, dez dias após, passou a apresentar-se sob a forma duma camada delgada, côm de ouro e com margens subindo as paredes do tubo. Desde o início esta cultura se mostrou bastante pegajosa, característico que nunca perdeu. Passada para os meios glicerinados só uma vez formou véu no caldo glicerinado. Inoculado em animais de laboratório deu origem a uma retrocultura de cobaia, que não sobreviveu por muito tempo.

Fig. 1 — Mostrando a Cultura "José" de 25 dias, em meio de Loewenstein, e em 2 (1a) e 3 (1b) as retroculturas de cobaia e rato, tôdas indistinguíveis entre si pela forma, aspecto e côm de gema de ovo.

Figs. 4, 5 e 6 — Representam as mesmas culturas "José" 1, 1a e 1b em agar glicerinado a 5 %. A aparente diferença de forma é devida à diferença de idade entre elas.

Fig. 7 — Aspecto *sui generis* (Actinomyces) da cultura 1b, retrocultura de rato, original, em meio de Loewenstein, tomando nas gerações seguintes a forma granulosa que se vê na fig. 3.

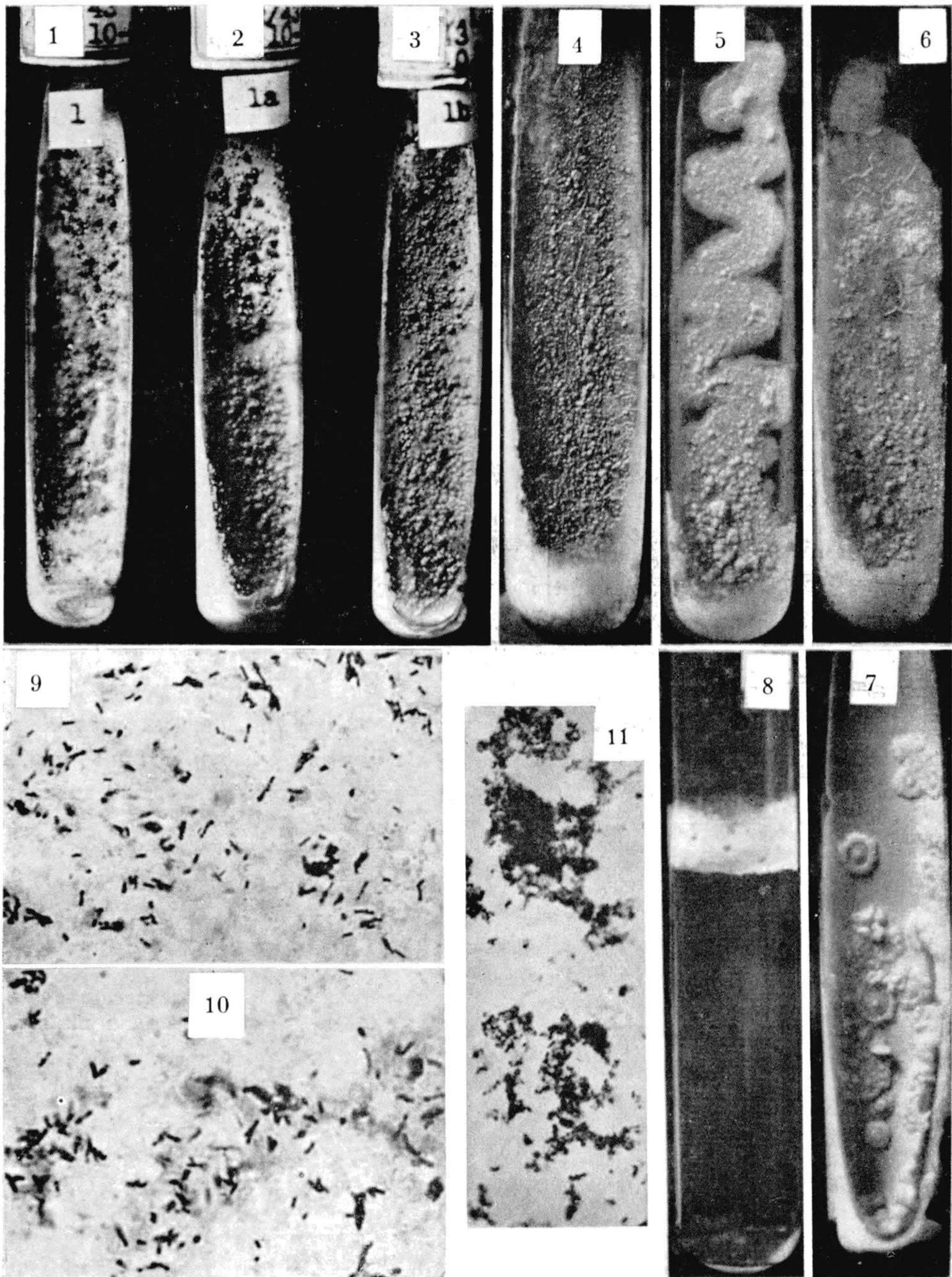
Fig. 8 — Aspecto do véu formado pela cultura "José" em caldo glicerinado a 5 %, sem pigmentar nem turvar o meio. As retroculturas 1a e 1b produzem véus iguais a êsse.

Figs. 9 e 10 — Aspectos microscópicos dos esfregaços da cultura "José" em meio de Loewenstein e do véu do caldo glicerinado.

Fig. 11 — Aspecto cocoide da retrocultura 1b (de rato) original, semelhante à amostra primitiva da cultura "José".

Fotos de J. Pinto.

Culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de lepra humana.



Cultura N.º 1 (amostra "José") isolada diretamente de pus de lesão fechada, do menino José F., de 7 anos de idade. A mesma cultura foi obtida duas vezes, em outubro e novembro de 1941.

Fotos J. Pinto.

Cultura N. 5 (Amostra "RUDAN") — No dia 17 de julho de 1942 semei em 15 tubos de LOEWENSTEIN sedimento dum *Boophilus microplus* que o Dr. RUY NORONHA MIRANDA fez sugar no leproso P. Rudan, internado no Leprosário São Roque (Paraná). No 19.º dia de incubação (5-8) um desses tubos apresentava uma cultura sob a forma de delgada camada dum amarelo côm de gema de ovo, de aspecto úmido e luzidio. No dia 10 de agosto verifiquei que essa cultura estava pura e era de bacilos a.a.r. pleomórficos. Repiquei-a nessa ocasião.

A 20 de agosto (34.º dia de incubação) a cultura original se apresentava sob a forma duma delgada camada amarela brilhante, cobrindo toda a superfície do meio de LOEWENSTEIN, camada essa superposta por outra, elevada, constituída por colônias circulares que se fundiam, as quais eram de côm amarelo-alaranjada. A segunda geração desta cultura, com 10 dias de estufa, cobria dois terços da superfície do meio, sob a forma dum inducto amarelo-vivo, de aspecto luzidio e brilhante. No dia 2 de setembro tratei uma amostra dessa cultura pelos ácidos sulfúrico e acético, com resultado idêntico às outras.

Esta cultura N. 5 (Rudan) produziu, *ab initio*, véu sobre o caldo glicerinado em tubos e balões, com tal exuberância que com êle preparei várias partidas de antígeno (Leprolina S-A. 5), o qual está sendo aplicado *larga manu*, como teste cutâneo comparativamente com a Lepromina e também como agente terapêutico. Como teste cutâneo o Dr. JOSÉ MARIANO já publicou (Acta Médica, out.-dez. 1943) os resultados do seu emprêgo em 198 internados da Colônia Santa Fé e tem em elaboração trabalho muito mais completo sobre testes cutâneos feitos com as cinco leprolinas do meu fabrico e com a sua própria Lepromina.

Estudo destas culturas no estrangeiro

Desejando tornar as minhas culturas da lepra conhecidas e interessando-me sobretudo que com elas colegas estrangeiros façam estudos experimentais, no dia 15 de janeiro de 1943 remeti essas cinco culturas e mais a N. 1a (recobrada de cobaia inoculada com a cultura N. 1) às seguintes instituições dos Estados Unidos: *Louisiana State University*, New Orleans, ao Dr. GEORGE W. MCCOY, professor de Leprologia, e à *University of Michigan*, Ann Arbor, ao Dr. MALCOLM H. SOULE, professor de Bacteriologia. A ambos êsses ilustres professores e aos seus colaboradores solicitei fizessem estudos com as aludidas culturas e que sobre elas publicassem tudo quanto lhes parecesse certo. Na mesma ocasião remeti, também por via aérea, essas culturas à *American Type Culture Collection*, da *Georgetown University*

Medical School, de Washington, D. C., cujo Zelador, Dr. MARIO MOLLARI, M. D., escreveu-me a seguinte carta datada de 26 de janeiro de 1943:

"We have received the six "Leprosy Cultures" which you so kindly forwarded to us and I wish to express our appreciation for your cooperation in depositing them in the Collection.

We have entered these in the permanent collection and will maintain them, to the best of our ability, in both the viable and the frozen and dried state, and will enter them in the forthcoming edition of our catalogue. Etc."

Posteriormente remeti essas culturas ao Instituto de Leprologia "Lleras Acosta", de Bogotá (Colômbia), a pedido do seu diretor DR. JOSÉ IGNACIO CHALA e ao Instituto de Higiene da Universidade de São Paulo, a pedido do DR. JOSÉ MARIA GOMES. Espero que êsses colegas utilizem as minhas culturas para estudos experimentais, em pesquisas isoladas ou comparativamente com algumas das culturas clássicas de lepra, e que dêem publicidade aos resultados obtidos.

3 — Culturas obtidas de *Triatomídeos*

Nestas Memórias, de junho de 1943 (Tomo 38, pp. 457-462) dei as primeiras notícias sobre culturas de bacilos a.a.r. de *Triatomídeos* infectados em leprosos. Dessas três primeiras evidências de multiplicação dos bacilos dêsses hematófagos somente uma, a

Cultura N. 6 (Amostra "José Carlos"), sobreviveu. De larvas de *Triatoma infestans* criadas no meu laboratório de Manguinhos, e aplicadas por mim, (13-2-43) na presença dos Drs. SOUZA CAMPOS, SOUZA LIMA e JOIR FONTE, sobre lesão lepromatosa da coxa direita de José Carlos da G., obtive, por aspiração com pipetas capilares, conteúdo intestinal de três das sete que o sugaram e semeei, *in natura*, em vários tubos de LOEWENSTEIN. Apesar do exame direto do material dessas larvas ter sido negativo, após mês e meio de incubação, um tubo de LOEWENSTEIN mostrou indício de germinação que, no 56.º dia de incubação apresentou pequeninas colônias arredondadas e de côr amarela, em número de onze. O 1.º exame microscópico dessa cultura, feito a 8 de abril, revelou tratar-se de cocobacilos a.a.r. em estado de pureza. Repicagens dêsse dia foram examinados a 22-4 confirmando essa morfologia cocóide, fortemente a.a.r. A passagem dessa cultura pelos meios glicerizados produziu formas bacilares efêmeras, voltando à primitiva forma cocóide no LOEWENSTEIN, como se vê na figura 16 da

estampa colorida que ilustra êste trabalho. No caldo glicerinado êsse germe não produziu véu apesar de reiteradas tentativas. Por êste motivo e pela sua forma cocóide estive quase decidido a desprezar esta cultura, mas comparando-a com as microfotografias de linfas de outros casos de lepra lepromatosa e dum caso tuberculóide (figs. 36 e 37) me convenci que a sua morfologia é idêntica, senão igual. Há ainda outro argumento para continuar estudando esta cultura e não descartá-la como má: é a opinião de E. MARCHOUX, professor do Instituto Pasteur de Paris, o cientista europeu que tem maior experiência sôbre a etiopatologia comparada das lepras humana e murina que assevera, em erudito artigo de 1931, estar convencido de que há pelo menos seis variedades de bacilos na lepra humana e que pelo menos uma é proveniente do rato.

Pelo Prof. OLYMPIO DA FONSECA filho remeti uma amostra desta cultura N. 6 ao Dr. MALCOLM H. SOULE, professor de Bacteriologia da Universidade de Michigan, para estudo, o qual em carta de 2 de novembro de 1943 confirma a sua morfologia de "*coccobacillus*". Aqui no Rio, no dia 7 de janeiro de 1944 o Dr. SOULE reexaminou essa cultura, examinou e conversou com o doente que a forneceu, assim como examinou os doentes "José" e "Chagas", dos quais isolei as amostras N. 1 e N. 7. Neste doente Chagas o Dr. SOULE assistiu a aplicação de larvas de *T. infestans*, duas das quais se encheram e foram por mim tratadas pela soda, em Manguinhos, onde êle assistiu às sementeiras e viu esfregaços positivos de outra larva que na véspera sugara sôbre um leproma de Oliveira.

O que não me impressiona muito bem é o fato da raridade do isolamento de tais bacilos em contraste com a facilidade com que os barbeiros sugam os doentes.

Cultura N. 7 (Amostra "Chagas") — Com material do doente F. Chagas, homem branco de 62 anos, caso L3, recentemente chegado do Cea-

Fig. 12 — Aspecto microscópico da Cultura N.º 2 (amostra "Alcebiades"), em Loewenstein. Elementos pleomórficos.

Fig. 13 — Aspecto macroscópico da Cultura N.º 2 em agar glicerinado.

Figs. 14 e 15 — Aspectos macro e microscópicos da Cultura N.º 2 em batata glicerinada, de 10 dias. Não só a cultura se tornou mais exuberante como os germes apresentam-se como bacilos homogêneos grandes e fortemente ácido-álcool resistentes.

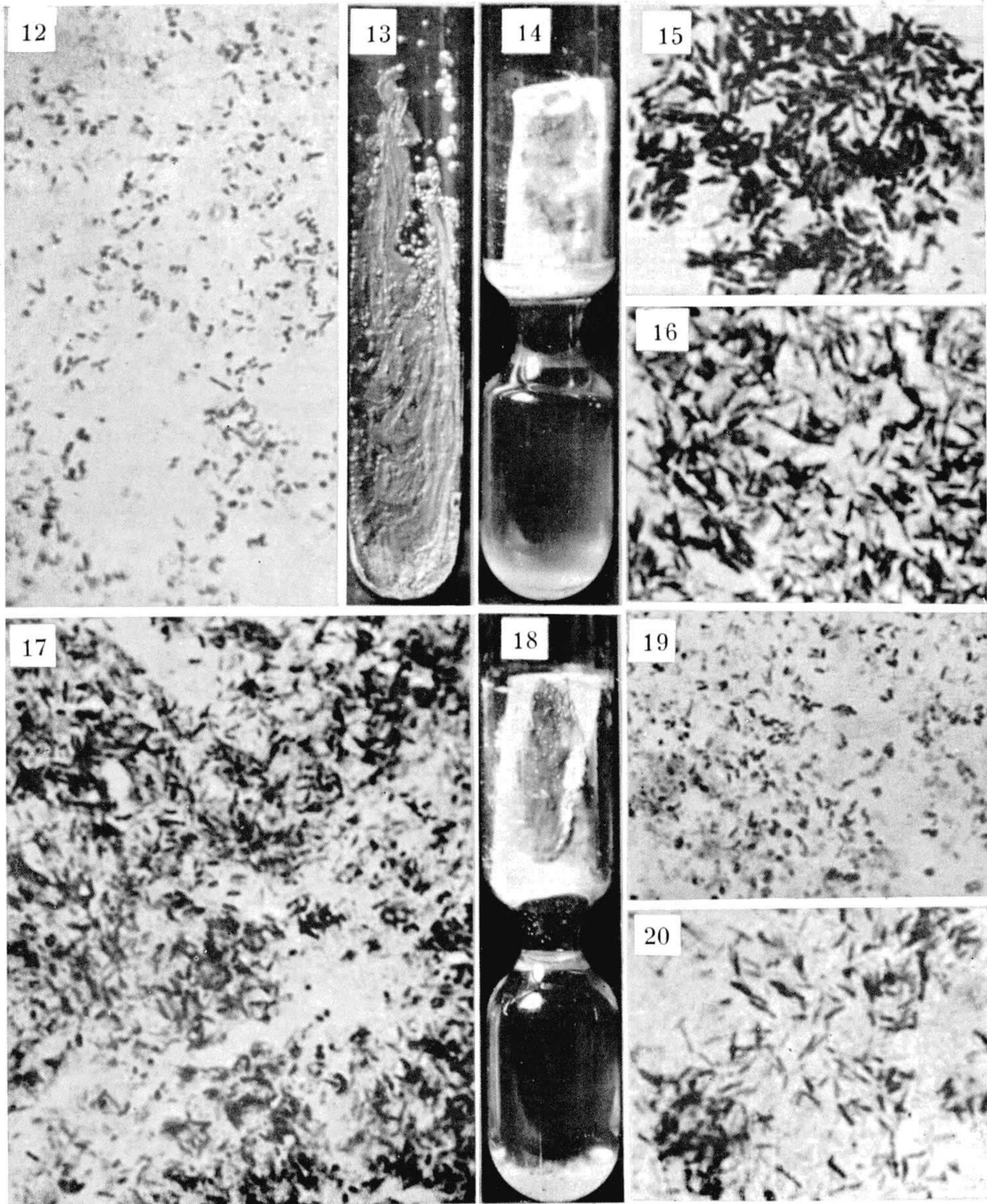
Fig. 16 — Aspecto microscópico do véu da mesma Cultura N.º 2.

Figs. 17 e 18 — Aspectos micro e macroscópico da Cultura N.º 3 (amostra "Teixeira"), em batata glicerinada.

Fig. 19 — Aspecto microscópico da Cultura N.º 3 em Loewenstein.

Fig. 20 — Aspecto microscópico do véu da Cultura N.º 3: bacilos grandes, homogêneos e fortemente ácido-álcool resistentes.

As microfotos 15, 16 e 20 são em maior aumento (entre 1.600 e 1.800 segundo *J. Pinto*).



Culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de *A. cajennense*.

Fotos *J. Pinto*.

rá, realizei as experiências 17.^a, 18.^a e 19.^a com barbeiros, antes de obter a cultura N. 7, que passo a descrever. No dia 14 de setembro de 1943 apliquei sobre placa lepromatosa do flanco esquerdo desse doente 5 ninfas e 5 larvas de *T. infestans* que me foram fornecidas pelo Dr. SIMÕES. Uma ninfa e três larvas sugaram-no até à repleção. 24 horas após tratei-as pela soda, em tubos individuais, triturei-as e o triturado de cada uma foi semeado em 10 tubos de meios diversos, na maioria de LOEWENSTEIN. No dia 4 de novembro (51.^o de incubação), um tubo de caldo glicerinado apresentava um véu branco que foi examinado pelo Dr. LUIS PRADO BARRIENTOS, professor de Parasitologia da Universidade San Andrés de La Paz, tendo verificado tratar-se de cultura de bacilos a.a.r. Os demais tubos continuaram estéreis. No dia 18-9 apliquei de novo nesse doente uma ninfa e 2 larvas daquele triatoma, de igual procedência. Todas três sugaram-no e 48 horas após (20-9) foram tratadas pela soda, trituradas e semeadas. Dos 7 tubos de LOEWENSTEIN semeados com o triturado da larva N. 1, dois apresentavam, no 33.^o dia de incubação (23-10-43) germinação em colônias amarelas características, que serão descritas abaixo. No dia 28-9-43 apliquei de novo na placa lepromatosa do flanco esquerdo de Chagas uma ninfa e uma larva de *T. infestans* que estavam famintas, as quais sugaram-no até à defecação, o que indica repleção. No dia 1 de outubro (74 horas após) aspirei com pipeta estirada o conteúdo intestinal da ninfa acima, que continha ainda bastante sangue, e semeei esse conteúdo ligeiramente diluído em água destilada, em 6 tubos de LOEWENSTEIN e um de caldo glicerinado. No 27.^o dia de incubação (28-10) o tubo de caldo apresentava tênue véu esbranquiçado, sem turbidez do meio. O esfregaço desse véu comprovou a multiplicação do bacilo de HANSEN. Semeado esse caldo noutros meios o resultado foi negativo.

A cultura que passou a ter o N. 7 foi obtida do seguinte modo: No 33.^o dia de incubação, dois tubos de LOEWENSTEIN semeados a 20-9-43 com triturado duma larva apresentava germinação: um deles tinha uma colônia

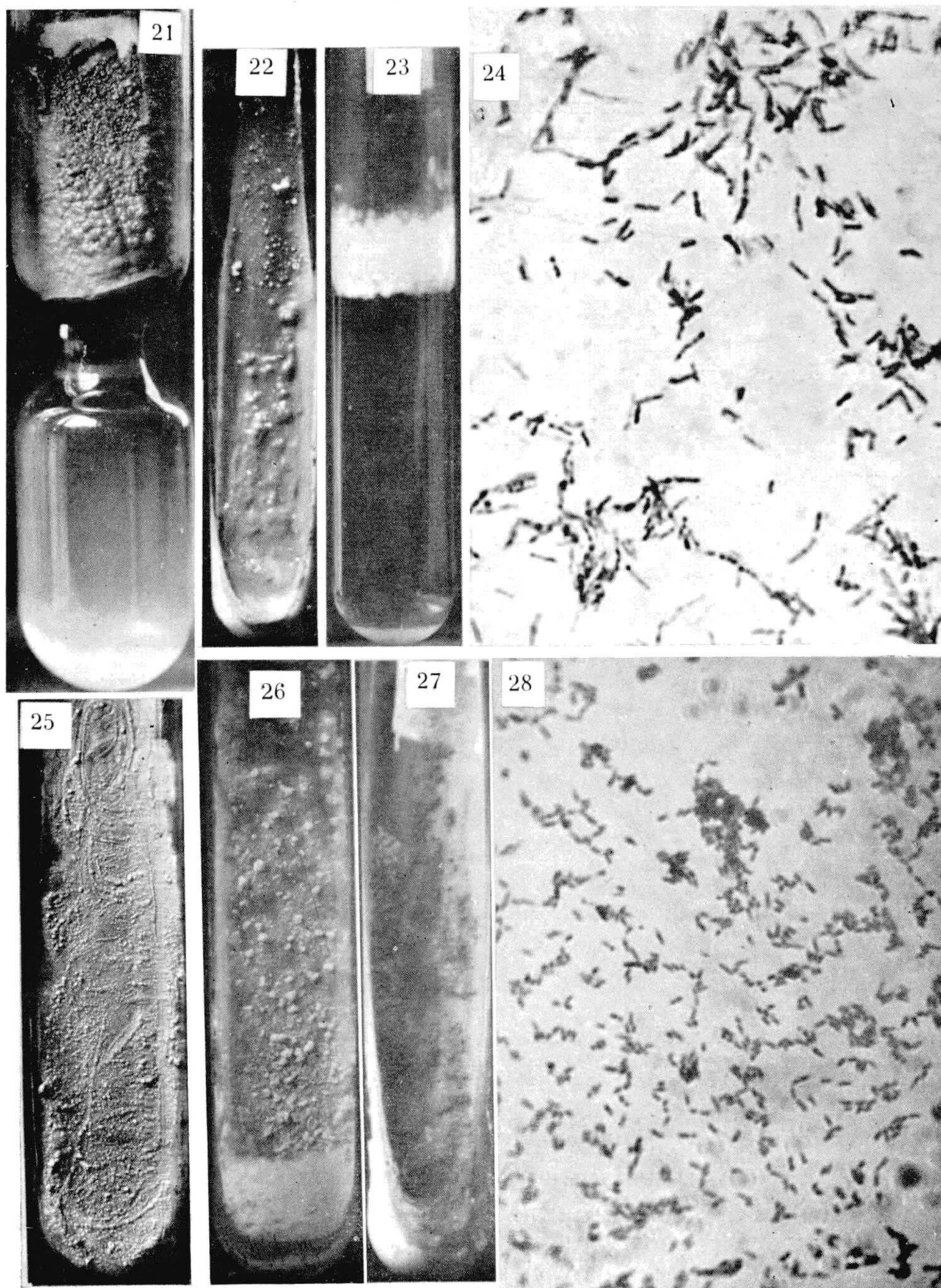
Figuras 21 e 22 — Aspectos macroscópicos da Cultura N.^o 4 (amostra "Ramtun") procedente de *Boophilus microplus* infectado no leproso F. Ramtun, do Paraná, em batata glicerinada e em meio de Loewenstein. Côr de ouro. Muito pegajosa.

Figuras 23 e 24 — Aspectos macro e microscópico da mesma Cultura N.^o 4 em caldo glicerinado, formando véu amarelo, sem turvar o meio, e esfregaço do referido véu, mostrando bacilos homogêneos e granuloses, todos a.a.r.

Figuras. 25 e 26 — Aspectos macroscópicos da Cultura N.^o 5 (amostra "Rudan"), isolada de *Boophilus microplus* infectado no leproso P. Rudan, do Paraná, em agar glicerinado. Com 2 1/2 meses apresenta delgada camada amarelo-ouro, finamente granulosa, cobrindo toda a superfície do meio. A mais granulosa tem 7 meses.

Figuras 27 e 28 — Aspectos macro e microscópico da mesma Cultura N.^o 5 em meio de Loewenstein: camada delgada, aspecto úmido, côr alaranjada; no esfregaço há elementos homogêneos e granuloses, todos a.a.r.

Fotos de J. Pinto.



Culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de *Boophilus microplus*.

amarela, verrucosa, no fundo do meio, cujo esfregaço revelou bacilos a.a.r. em estado de pureza; outra colônia idêntica, menor, no meio duma grande colônia branco-pardacenta de contaminação: a mesma bactéria cianófila frequentemente encontrada nas sementeiras de material leproso e que em pouco tempo domina a cultura do germe ácido-resistente. A 1.^a colônia foi por mim pescada e repicada no mesmo dia 23 de outubro em 3 tubos de LOEWENSTEIN, 2 de agar glicerinado e 1 de caldo glicerinado. No dia 25, 48 horas após, o Prof. BARRIENTOS examinou a cultura original que apresentava massas de bacilos a.a.r. em extensos campos de bactéria cianófila. As repicagens do dia 23 apresentavam o seguinte aspecto: Nos 3 tubos de LOEWENSTEIN ligeira camada amarelada, no centro do meio, cujo esfregaço dum tubo aparentava estar pura. Os meios glicerinados nada apresentavam de interesse. O 2.^o tubo da cultura original apresentava, a 25-10, uma colônia amarela que pesquei e coloquei sobre agar glicerinado donde fui retirando sementeira para novos meios. O esfregaço dessa colônia não diferia do da anterior (1.^o tubo): bacilos a.a.r. com aspecto de pureza. O exame doutra colônia menor, existente no meio duma colônia maior e de cor pardacenta, revelou agrupamentos arredondados de bacilos a.a.r. e outros somente de grânulos a.a.r. sobre extenso fundo azul, de bactérias de contaminação, que parecem destruir, progressivamente, os germes a.a.r. O esfregaço dum tubo da segunda geração revelou maior contaminação pela mesma bactéria.

Purificação da Cultura N. 7 pelo ácido sulfúrico e pela soda.

No dia 28-10-43 tomei dois tubos da 2.^a geração desta cultura em LOEWENSTEIN e adicionei em cada um três cc de soluto a 5 % de ácido sulfúrico, emulsionando as culturas nesse soluto, deitando os tubos para que o ácido agisse sobre as culturas durante 30 minutos, após o que passei cada

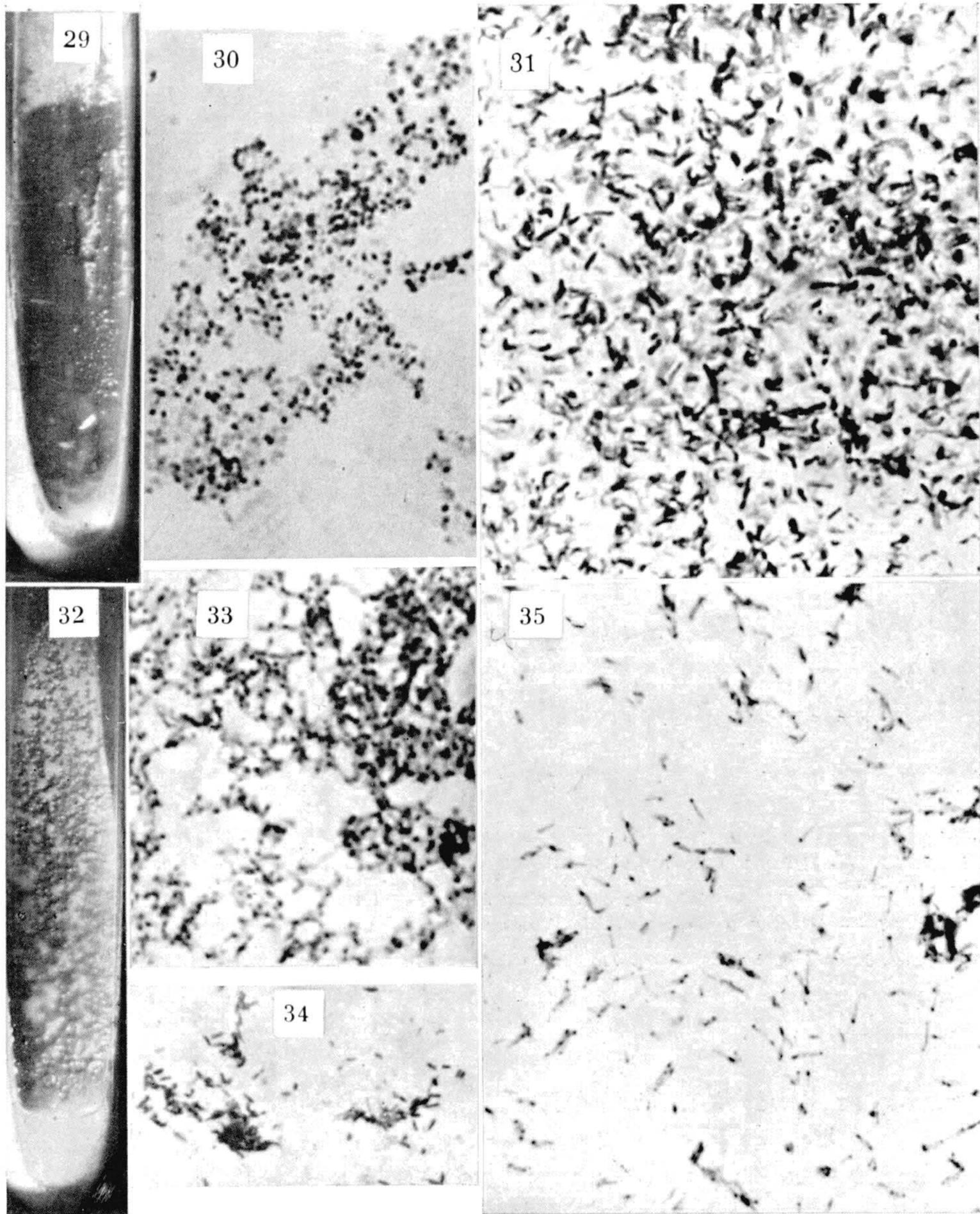
Figs. 29 e 30 — Aspecto macro e microscópico da Cultura N.º 6 (amostra "José Carlos"), isolada de *T. infestans* alimentado em lesão ativa do leproso J. Carlos da G. Tubo original. Cor de gema de ovo. O esfregaço mostra uma cultura pura *ab initio*, de elementos cocoides a.a.r.

Fig. 31 — Aspecto microscópico da mesma Cultura N.º 6 adaptada em agar glicerinado. O esfregaço mostra a predominância de elementos bacilares.

Figs. 32 e 33 — Aspectos macro e microscópicos da Cultura N.º 7 (amostra "Chagas") isolada de *T. infestans* alimentado em lesão ativa do leproso F. Chagas A., 2.^a geração em Loewenstein. Cor amarela. Os elementos microscópicos afetam a forma cocóide. Na fig. 34 afetam a forma bacilar após o tratamento da cultura original pelo ácido sulfúrico a 5 %.

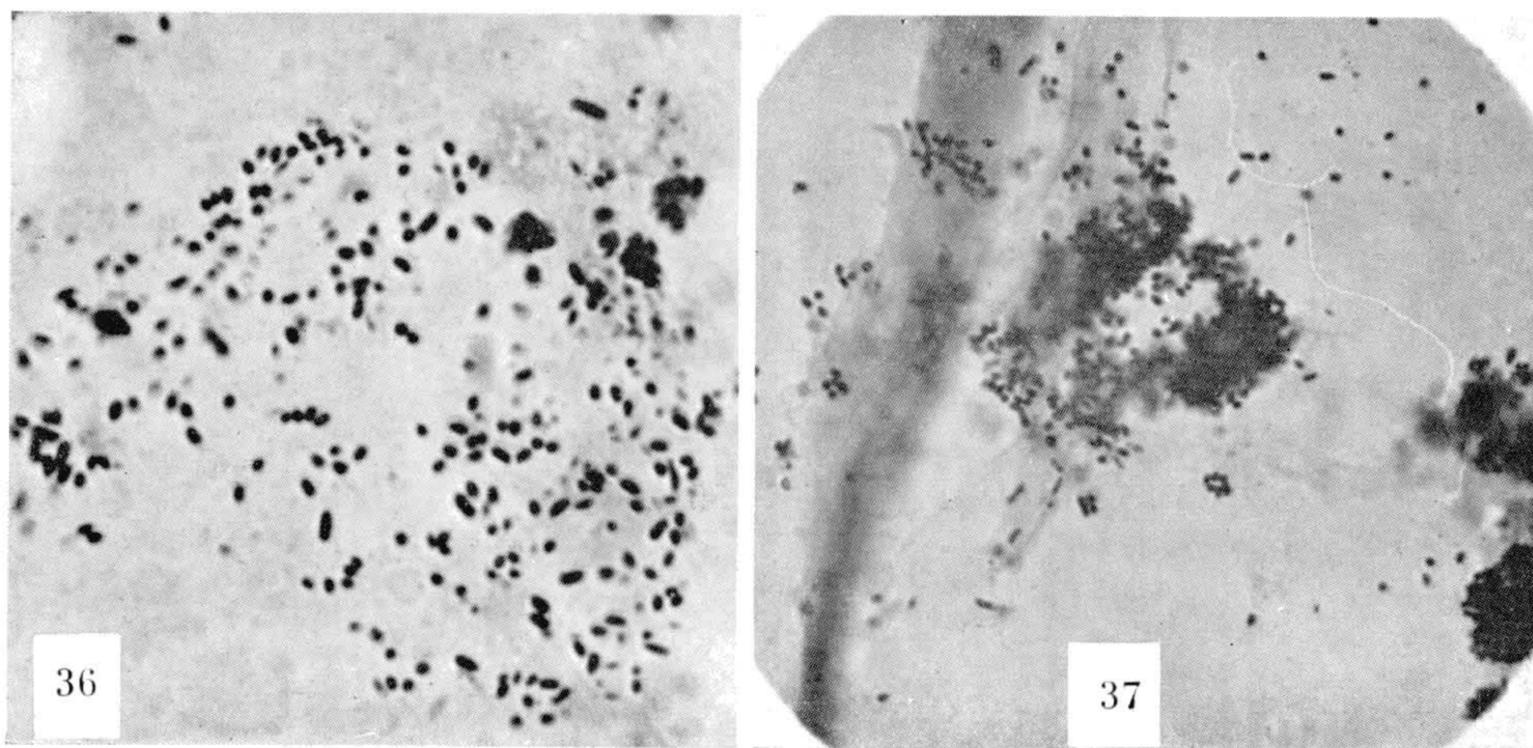
Fig. 35 — Esfregaço da cultura de 3.^a geração corado pelo método Fontes modificado por Oliveira Castro: os bacilos a.a. e acetona resistentes afetam as variadas formas granulares. Esta figura se superpõe à de Neisser, do bacilo de Hansen, publicada em 1881, na qual se vêem os bacilos granulosos bipolares (haltêres), unipolares, afetando a forma de alfinetes, com um grande nódulo no centro ou em cocóides, com 4 e 5 grânulos metacromáticos uniformemente espalhados no bacilo.

Fotos de J. Pinto.



Culturas de bacilos ácido-álcool resistentes isolados de *Triatoma infestans*.

emulsão para um tubo de centrifugação ao qual adicionei 5 cc de água destilada esterilizada e centrifuguei durante 20 minutos. Os sedimentos desses dois centrifugados foram lavados duas vezes em água destilada e novamente centrifugados e por fim semeados, separadamente, em meio de LOEWENSTEIN (4 tubos), agar glicerinado e caldo glicerinado. Êsses tubos foram levados á estufa a 37° C juntamente com os dois tubos sementeiras, nos quais ainda restava um pouco das emulsões das culturas em ácido sulfúrico. O esfregaço do centrifugado acima com bacilos a. a. r. com



Fotos de J. Pinto.

Figura 36 — Esfregaço de linfa subcutânea dum caso (L.B.) lepromatosa, no período de eclosão. Na microfotografia são vistos raros bacilos curtos, a maioria dos elementos são cocóides ou cocobacilos ácido-álcool resistentes.

Figura 37 — Esfregaço de linfa subcutânea duma mácula acrômica da região lombar de L. Pereira, caso de lepra tuberculóide. Na microfoto predominam os cocóides ou cocobacilos e mórulas ácido-álcool resistentes. Linfas de dois casos de tipos clínicos considerados extremos por alguns autores (lepra lepromatosa e lepra tuberculóide) apresentam germes de idêntica morfologia e iguais aos da Cultura N.º 6 (Amostra José Carlos), isolada de larvas de *Triatoma infestans* alimentadas em lesão lepromatosa; comparar com a fig. 30.

granulações violeta (V. fig. 19, Estampa 1) mostra que o ácido não afetou a estrutura bacilar. No dia 4 de novembro (6º dia da semeadura) os 4 tubos de LOEWENSTEIN semeados com os centrifugados de 28-10 apresentavam exuberante germinação cobrindo toda a superfície do meio, com uma camada de colônias amarelas, confluentes, redondas como cabeças de alfinetes. (V. fig. 18, Estampa 1). O esfregaço de uma destas colônias corado pelo ZIEHL-NEELSEN revelou pureza de bacilos a. a. r. e outro corado pelo método FONTES, modificado por OLIVEIRA CASTRO (Fig. 20, Estampa 1) mostra que os bacilos são ácido-álcool-acetona resistentes e são todos gra-

nulosos. Os meios glicerinados pareciam estéreis. Os dois tubos sementeiras, devido à presença do ácido sulfúrico, não mostraram mais nenhum indício de germinação.

No mesmo dia 28-10 adicionei soluto a 10 % de soda cáustica num tubo de LOEWENSTEIN com a cultura de segunda geração e a sua emulsão sofreu igual tratamento ao descrito acima. O centrifugado desta cultura foi semeado em dois tubos de LOEWENSTEIN que, a 4 de novembro (6º dia) apresentavam cerca de 20 pequenas colônias arredondadas, salientes, amarelas e espalhadas pela superfície do meio. A sua exuberância é conside-

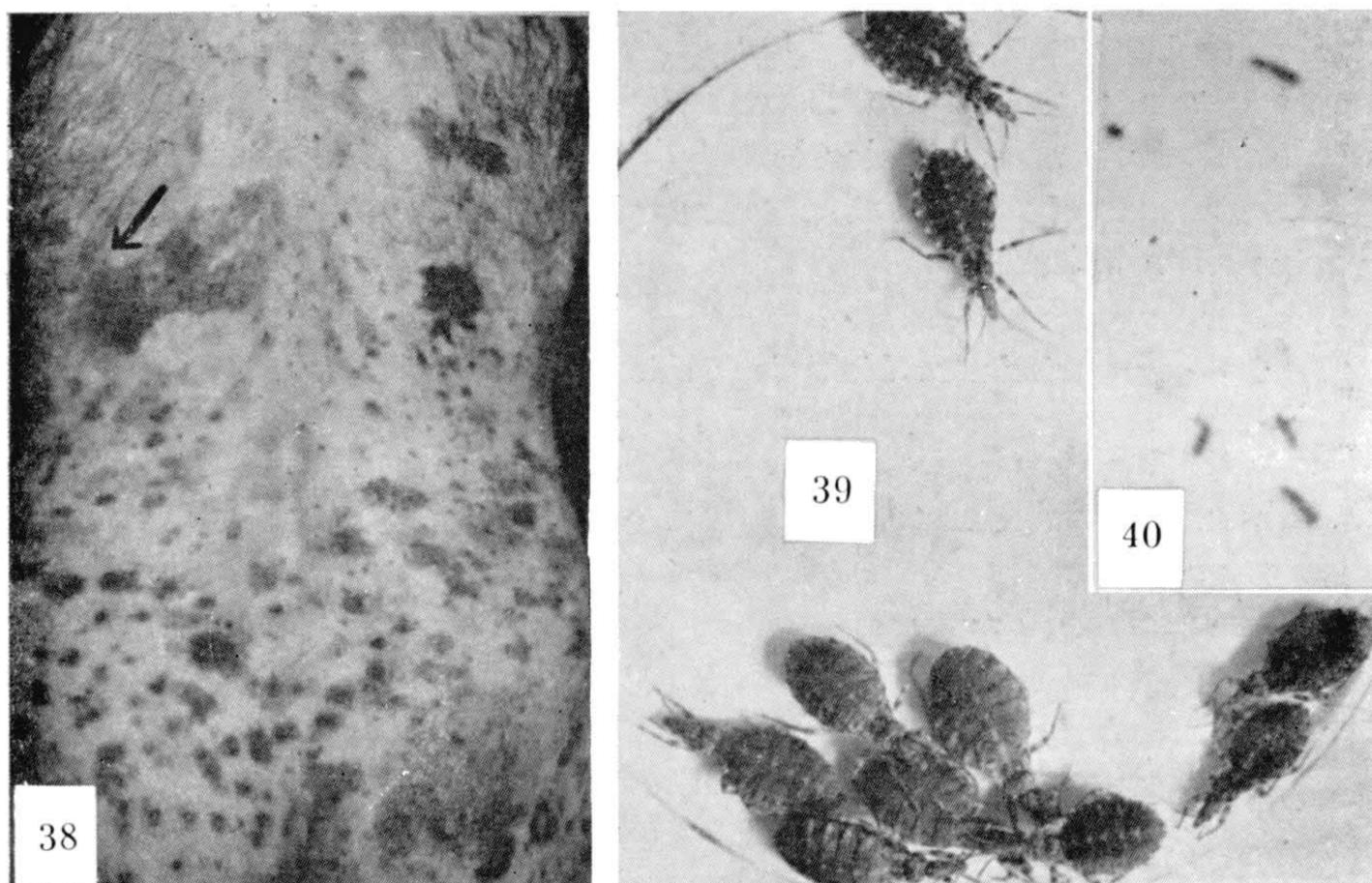


Figura 38 — A flecha indica uma lesão lepromatosa de F. Chagas onde se infectaram as larvas de *T. infestans* das quais isolei a Cultura N.º 7 (amostra Chagas) de bacilos ácido-álcool resistentes.

Figura 39 — Das 10 larvas (4.ª fase) de *T. infestans* colocadas sobre o dorso de F. Chagas, nove sugaram-no até à repleção e se infectaram.

Figura 40 — A microfotografia 40 representa um esfregaço de triturado de larva desse lote, com quatro bacilos a.a.r. Estes elementos eram abundantes, porém muito espalhados, não tendo sido possível obter um campo mais rico.

Fotos de J. Pinto.

ravelmente menor (1/10) em relação às sementeiras dos centrifugados tratados pelo ácido sulfúrico. O esfregaço desse centrifugado mostra número menor de bacilos a.a.r. e estes mesmos com aspectos de carcomidos ou vacuolizados. Parece que a soda degradou os bacilos.

Em conclusão, tanto o ácido sulfúrico como a soda se mostraram bactericidas para os germes de contaminação sem afetar a vitalidade dos ba-

cilos a. a. r. Esta Cultura Nº 7 está germinando satisfatoriamente nos meios glicerinados (agar e batata) sem formar, por enquanto, véu no caldo glicerinado.

Estas três culturas de bacilos a. a. r. indistinguíveis do de HANSEN obtidas de lesões lepromatosas de um mesmo doente, em ocasiões diferentes e por meio dum hematófago, me convenceram que se trata realmente do bacilo da lepra e não de qualquer outro simbiótico ou de contaminação ambiente.

No dia 7 de janeiro de 1944 fiz uma demonstração para o Prof. SOULE aplicando larvas de *T. infestans* nas lesões da região sacra direita do paciente Chagas, tendo duas delas sugado (Experiência 31^a). Ainda na presença do Dr. SOULE tratei, em Manguinhos, essas larvas pela soda, triturei e semeei o seu triturado em LOEWENSTEIN, etc. Estas sementeiras estão na estufa. Dada a melhora das lesões do paciente, em consequência do tratamento, com redução de bacilos na sua linfa, é improvável que desta vez se consiga nova cultura.

4 — *Propriedades biológicas das culturas de lepra.*

Por artifícios de técnica o Dr. OLIVEIRA CASTRO, meu ilustre colega do I. O. Cruz, provou que tôdas as sete culturas descritas neste artigo são ácido-álcool-acetona resistentes e que todos êsses bacilos isolados de material leproso são granuloso, e cujas granulações metacromáticas afetam as formas e disposições tão bem descritas em 1881 por A. NEISSER no bacilo de HANSEN, e posteriormente foram confirmadas por LUTZ, UNNA, MEIROWSKY e PALDROCK. Quanto às outras propriedades biológicas descritas a seguir, essas culturas diferem entre si, até certo grau, não se justificando porque algumas delas não produzem véus nos meios líquidos adequados. Quanto à parte experimental, referente às inoculações em animais de laboratório, só mais tarde poderei esclarecer certas incógnitas.

Verificação da motilidade dos bacilos

Num só dia (12 de novembro de 1943) preparei emulsões, em água destilada esterilizada, de mínimas porções de bacilos, retiradas com alça de platina, das sete culturas originais e das duas retro-culturas, examinando-as em gôtas pendentes sob lamínulas colocadas sôbre lâminas escavadas.

A verificação foi feita de uma em uma, progressivamente na sua serialização, usando emulsões tão frescas quanto possível. A lâmina escavada foi colocada sôbre uma platina aquecedora, com termómetro, adaptada no dispositivo *charriot* e o exame feito com grande aumento.

Da cultura N. 1 e retroculturas 1a e 1b usei germinações de 42 dias, em meio de LOEWENSTEIN; da cultura N. 2 usei amostras de 27 dias em batata glicerinada, e 130 dias, em caldo glicerinado (esta não emulsionada nágua); da cultura N. 3, amostra de 27 dias, em batata glicerinada; da cultura N. 4, germinação de 42 dias em meio de LOEWENSTEIN; da cultura N. 5, amostra de 90 dias, em agar glicerinado; da cultura N. 6, amostra de 64 dias, em meio de LOEWENSTEIN, e da cultura N. 7, segunda geração de 15 dias, também em meio de LOEWENSTEIN. Tôdas as dez amostras de emulsões foram examinadas ao microscópio primeiramente à temperatura do laboratório e depois entre 30.º e 40.º C., mediante progressivo aquecimento da platina.

À temperatura ambiente tôdas as emulsões mostraram um movimento browniano pouco intenso, que ia aumentando ràpidamente a partir de 35.º até 40.º C. A partir dos 40.º C. os movimentos de rotação, reviravolta e oscilação iam diminuindo, naturalmente pela dessecação da emulsão. Algumas amostras, sobretudo as culturas Ns. 1a e 5, deram-me a impressão de motilidade vital, — de translação, — tal a sua atividade. Após cuidadoso exame os Drs. A. GODOY e A. MACHADO concluíram pela negatividade.

Em conclusão, tôdas essas culturas, em diferentes meios e de várias idades, são idênticas, revelando apenas movimento browniano, mais ou menos intenso segundo a temperatura a que foram submetidas.

Conseguí fazer todos êsses exames num só dia e sob idênticas condições graças à valiosa colaboração do Professor LUIS PRADO BARRIENTOS (da Universidade San Andrès, de La Paz) e do Dr. VICTOR CALDARERA, do Paraguai, que na ocasião faziam estágio no meu laboratório e a quem apresento os meus agradecimentos por êsse e outros favores.

Produção de Pigmentos

A grande maioria dos bacilos ácido-álcool resistentes isolados de material de lepra humana tem a propriedade de produzir compostos corados, coloridos, conhecidos por pigmentos. De tôdas as culturas que obtive da lepra humana, semeando triturados de hematófagos infectados em leprosos, assim como a obtida diretamente semeando pus de lesão humana, fechada, sòmente uma, a isolada de *A. cajennense* da Colônia Santa Isabel, era creme; tôdas as demais são pigmentadas, cuja còr varia do amarelo-ouro até ao amarelo-laranja ou abóbora. As culturas 2 e 3 são as mais pigmentadas, tomando na batata glicerinada ou no LOEWENSTEIN, quando velhas, a còr de cenoura. Tais pigmentos permanecem confinados às células bacterianas, sem influenciar na còr ou limpidez do meio (caldo glicerinado), salvo ligeira exceção para a Cultura 3, que torna êsse meio ligeiramente pardacento, sem

turvá-lo. Originariamente tôdas as sete culturas aqui descritas foram obtidas no meio de LOEWENSTEIN e a sua pigmentação vai aumentando até certo ponto com a sucessão das suas gerações nesse meio. Transplantadas para meios glicerinados, tais como o agar, a batata e o caldo, tôdas elas, exceto as de Ns. 2 e 3, perdem um pouco na intensidade da sua côr.

Êsses pigmentos são insolúveis nágua; faltava verificar a ação do álcool absoluto, da acetona, do éter e do clorofórmio sôbre êles, provas que realizei recentemente. Para cada amostra das nove culturas examinadas preparei uma série de quatro tubos de hemólise, esterilizados, cada um com dois centímetros cúbicos do respectivo reagente, nesta ordem: álcool-absoluto, acetona, éter e clorofórmio. Em cada tubo coloquei uma alça da cultura a examinar, escolhendo a amostra mais pigmentada da coleção, sem levar em consideração a sua idade, e emulsionando-a o melhor possível.

A leitura foi feita três horas após, com os seguintes resultados:

A cultura 1 deu apenas no álcool absoluto uma tênue nuança amarelada; a cultura 1a teve o seu pigmento dissolvido no álcool, acetona e éter, que tomaram uma côr amarelada; a cultura 1b corou de amarelo um pouco mais vivo o éter e o clorofórmio; as culturas 2 e 3, as mais cromogênicas de tôdas, não alteraram os quatro reagentes; a cultura 4 corou de tenuíssimo amarelo os quatro reagentes, com mais intensidade a acetona e o clorofórmio; a cultura 5 corou uniformemente, de um amarelo claríssimo, todos os quatro reagentes; a cultura 6 corou apenas o éter, e finalmente a cultura 7 corou o álcool e o éter e turvou ligeiramente o clorofórmio. Por êstes resultados parece tratar-se de culturas diferentes, mas diferentes eram as suas idades e os meios em que tinham germinado. Numa prova mais rigorosa é necessário colocá-las em igualdade de condições.

A ação de Penicilina sôbre os bacilos ácido-álcool resistentes

Em recente conferência feita em Manguinhos por ARÊA LEÃO, sôbre a descoberta, fabrico e emprêgo terapêutico da *Penicilina*, êsse ilustre colega declarou que êste produto tem ação eletiva sôbre as bactérias GRAM positivas, além de outras. Essa afirmativa me levou a verificar se o aludido produto micológico tinha ação impediante sôbre a germinação de bacilos ácido-álcool resistentes isolados da lepra, com o fito de experimentá-lo na reação leprótica, que até hoje não tem um tratamento eficaz.

O químico HUMBERTO T. CARDOSO, colaborador do Dr. ARÊA LEÃO nos estudos da *Penicilina* no Instituto Oswaldo Cruz, teve a bondade de ceder-me cêrca de dez centímetros cúbicos dum soluto de *Penicilina* em sal

de bário, filtrado assépticamente e com o poder impediante de 1:80,000 em relação ao *Staphylococcus aureus*. Fiz atuar êsse soluto em cinco culturas de lepra, sendo duas da minha coleção original (Ns. 1 e 1a) e três da coleção internacional (KRAL, 260 e 365) nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 cc adicionadas em 10 cc de caldo glicerinado a 5%. Em cada tubo semeei uma alça de cultura, e para cada cultura utilizei uma série de quatro tubos, os três primeiros com a *Penicilina* nas doses acima referidas e o último como testemunha. Feitas as sementeiras, com a técnica habitual, foram as culturas colocadas na estufa a 37°C, onde permaneceram de 27 de novembro a 2 de dezembro últimos.

Os resultados foram os seguintes:

As culturas 1 e 1a germinaram igualmente em todos os quatro tubos, produzindo o véu amarelo característico, sem turvar o meio. As culturas KRAL e 260 germinaram em todos os quatro tubos das respectivas séries, formando véus e sem turvar o meio, sendo que a KRAL com notável exuberância. A série da cultura 365 (do *National Health Institute* de Washington) contaminou-se com *Aspergillus niger*, ficando pois prejudicada a prova. Por êstes resultados pode-se concluir que a *Penicilina* não é impediante e *ipso facto* não espero que seja bactericida para os bacilos da lepra no corpo humano.

Ação do Neurital sôbre as culturas de bacilos ácido-álcool resistentes.

O Dr. F. MONTEIRO, médico interno do Hospital-Colônia de Curupaity, recentemente chamou-me a atenção sôbre um novo medicamento, o *Neurital*, que, segundo êle (experiência em 73 pacientes) estava dando excelentes resultados no tratamento das neuralgias em leprosos. Enfermos retidos no leito há semanas, diz êle, por motivo de terríveis polineurites extremamente dolorosas, com duas injeções apenas dêsse produto ficaram "curados dêsses males". Antes que êle desse publicidade à sua nota preliminar sôbre o assunto, sugeri-lhe que reexaminasse (já haviam decorrido dois e mais meses) todos os seus 73 pacientes, para se assegurar se êles não haviam tido reincidências dos seus males.

A pedido do Sr. RAUL WERNECK ALVES, técnico do Laboratório Tonka, fabricante daquele produto, resolvi experimentá-lo pessoalmente nalguns doentes e remeti 400 ampolas do produto ao Dr. JOSÉ MARIANO, diretor da Colônia Santa Fé (Minas), para uma experiência em maior escala. O primeiro relatório dêste colega é animador, porém diz êle que o aludido produto é mais eficaz quando misturado ao sôro glicosado saturado e injetado

por via intravenosa. Dêsse modo estava beneficiando também os doentes com reação leprótica.

A respeito da ação da *Cumarina* sobre o sistema nervoso central o Professor FRANKLIN MOURA CAMPOS e colaboradores já publicaram alguns trabalhos experimentais, cujas conclusões autorizam a admitir-se a sua influência benéfica nas neuralgias leprosas.

À vista destes antecedentes resolvi verificar se o *Neurital* tinha ou não ação impediante sobre as culturas de bacilos isolados de material leproso. O *Neurital* é um soluto a 3 o/oo, em água destilada, dos ácidos cumáricos extraídos das Favas Tonca, que são as sementes dos frutos duma grande árvore amazônica, o Cumarú, ou *Dipteryx odorata* Willd. (*Leguminosae Papilionatae*) segundo se vê no *Arboretum amazonicum* (fig. 13) de J. HUBER, publicado pelo Museu Goeldi, do Pará.

Experiência pessoal.

Em tubos de ensaio com 10 cc de caldo glicerinado adicionei 0,5 e 1,0cc de *Neurital* e semeei nêles, em séries de três tubos, incluindo os testemunhas, para cada cultura, uma alça de sementeiras recentes das minhas culturas Ns. 1a, 2 e 5. Após sete dias de incubação a 37°C. verifiquei franca germinação normal em todos os tubos, com formação de véus, sem turvamento do meio. O *Neurital* não tem, portanto, ação impediante sobre êsses bacilos.

No dia 5-1-44, adicionei pequena quantidade de Cumarina puríssima sobre cada uma das quatro culturas desenvolvidas e deixei-as na estufa. A 13-1 pareciam "mortas". Foram feitas repicagens em caldo glicerinado.

Sobre a ação do ácido sulfúrico e da soda cáustica os informes atrás referidos são o bastante. O método de PETROFF (soluto a 10% de soda) para tratamento dos hematófagos não tem dado resultados muito encorajadores: o número de séries de semeaduras por êste método é muito grande a o de culturas obtidas muito pequeno.

ABSTRACT

Isolation and Cultures of acid-fast bacilli from Hematophagi infected in lepers. Evidences that the Hansen bacillus is in cause.

The A. summarises the history of his first culture of acidfast bacillus isolated directly from leprosy lesions (Sample José) and refers about two samples recovered from guinea pig and white rat inoculated with said culture.

Then the A. completes his previous descriptions of four cultures of acidfast bacilli isolated by him from ticks (*Amblyomma cajennense* and *Boophilus microplus*, two cultures from each species) infected experimentally in lepers.

The A. having found specimens of two species of *Triatomidae* (*Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*) naturally infected with HANSEN bacillus in huts habited by lepers in the State of Minas Gerais (Dec. 1942), started a series of experiments, using larvae and nymphs of *T. infestans* bred in laboratory at the Instituto Oswaldo Cruz, to infect in active cases of leprosy, in the city of Rio de Janeiro, could obtain two new samples of cultures of acid-fast bacilli (Ns. 6 and 7 of his set). In this paper the A. studies the biological properties of said cultures, proving that Penicilin has not effect upon them, like other substances.

The sulphuric and acetic acids were used to purify some of the cultures, with good results, the cultures becoming more rich and growing faster. Potassium hydroxide Sodium (10% solution) was also used with success to isolate and to purify the cultures, but it seems that it affects the bacilli in some way. In fluid glycerinated media the majority of such cultures produce velum suitable for the preparation of antigens for skin tests and for therapeutical use. At last the A. says that he is becoming convinced that the HANSEN bacillus is in cause, especially after three evidences of culturing the bacillus from one patient, in different opportunities.