

TRABALHOS ORIGINAES

Trabalho do Instituto de Higiene — Universidade de S. Paulo)

PESQUISAS SOBRE LEpra MURINA

FILTRABILIDADE DO BACILLO DE STEFANSKI

DR. J. M. GOMES

O material com que realizamos estas pesquisas foi-nos fornecido pelo Professor M. Ficker, a quem agradecemos.

Era um abcesso de lepra murina, conservado ha 5 dias em glicerina.

Depois de verificar a riqueza em germens, fizemos uma emulsão em solução physiologica, filtramos em duas folhas de papel e em filtro Zeiss, sob a pressão negativa de 300 a 350 millímetros de mercurio. pH da emulsão — 7,6. Duração da filtração no Zeiss — 20 cc em 4 minutos.

Pesquisa de bacillos no filtrado, após centrifugação — negativa para qualquer micro-organismo.

Cataphorese

Pilhas seccas. Corrente continua, 2,5 volts. Electrodo de fios de cobre, tudo de vidro em U, diametro de 6 millímetros, quantidade de liquido — 8 cc.

Colocado cada um dos electrodos nas aberturas do tubo, que estava cheio do filtrado, ligou-se a corrente.

Não houve concentração apparente de granulações em torno dos electrodos.

De 5 em 5 minutos, até meia hora, retiramos material de em torno os dois pólos, fixamos e coramos pelo Ziehl-Neelsen.

Não encontramos germens organizados. Apenas granulações pequeninas, amorphas, coradas em azul pallido. Poderiam ser granulações do corante, não obstante sua filtração, na hora. Verificado assim, por esses processos, que não havia no filtrado bacillos ou granulações acido-resistentes, tomamo-lo para inoculações.

Por sua vez, o material que se encontrava no filtro de papel, foi retirado numa placa de Petri, lavado em agua distilada, centrifugado, decantado, e, o deposito, constituido de bacilos acido resistentes, emulsionado em solução physiologica.

Separamos, então, dois lotes de ratos. Num dos lotes inoculamos no flanco direito, sob a pelle, 1 cc. de filtrado; no outro, 1 cc. de emulsão do bacillo lavado.

Num e noutro lote os ratos pesavam 80 e 125 grs.

Ratos inoculados com filtrado

1.º — No 14.º dia sacrificamos um rato de 125 grs. Macho. *Magrissimo*. Ganglios normaes.

Fizemos esfregaços dos ganglios inguinaes e axillares, direitos e esquerdos, para-vertebraes, ligado, baço, mucosa nasal e sangue do coração.

Nos ganglios encontramos — *bacillos e granulações acido-resistentes e granulações acido-sensíveis*.

No figado e baço — *granulações acido-sensíveis e acido-resistentes*.

Mucosa nasal — *bacillos acido-resistentes*.

Sangue do coração — não foi feito neste caso.

2.º — No 19.º dia, outro rato de 125 grs. Femea, prenhe. *Ma grissima*.

Ganglios — *bacillos e granulações acido-resistentes finissimas*.

Figado — *granulações acido-resistentes*. Baço — negativo. Mucosa nasal — *bacillos acido-resistentes*. Sangue negativo.

3.º — No 36.º dia, Rato de 80 grs. Macho. *Magro*. *Tenia hepatica*.

Ganglios — *grande riqueza de bacillos acido-resistentes*.

Figado, baço, mucosa nasal, sangue — *idem*.

4.º — No 50.º dia. Rato de 125 grs. *Gordo*. *Rhinite*.

Ganglios — *bacillos e granulações acido-resistentes*. Figado — *idem*. Baço — *granulações acido-resistentes*. Mucosa nasal e sangue *negativos*.

Os animaes restantes foram reservados para outras pesquisas.

x x x

Outro lote de ratos de 40 grs. Inoculação peritoneal de 1 cc: O material estava conservado ha 6 dias em glicerina.

A mesma technica da serie anterior.

5.º — No 18.º dia sacrificamos um delles.

Nos ganglios — *muitas granulações cyanophytas e acido-resistentes pequenissimas e alguns bacillos acido-resistentes*. Figado e baço — *negativos*. Mucosa nasal e sangue não foram pesquisados,

6.º — No 40.º dia. *Gordo*.

Todos os orgams *negativos*.

7.º — No 65.º dia. *Gordo*.

Ganglios — *numerosas granulações e vazios bacillos acido-resistentes*. Fígado e baço — *muitos bacillos e granulações acido-resistentes*.

8.º — No 90.º dia. *Magro*.

Ganglios, fígado, baço, mucosa nasal — *granulações cyanophilas e acido-resistentes*. Sangue do coração — *negativo!*

9.º — No 91.º dia.

Em alguns ganglios — *bacillos e granulações acido-resistentes*. Fígado — *idem*. Baço, mucosa nasal e sangue — *negativos*.

10.º — No 110 dia. *Magro*.

Não se encontrou bacillo algum. Apenas *uma ou outra granulação cyanophila* ou *acido-resistente*.

3.º *lote de ratos*.

Animaes de 100 grs. Inoculados subcutaneamente no flanco direito. Germens conservados na geladeira 11 dias em glicerina.

11.º — Ao 23.º dia morre um rato. *Cachetico*.

Ganglios — *varios bacillos cyanophilos e acido-resistentes e granulações acido-resistentes*. Fígado — *bacillos e granulações acido-resistentes*. Baço — *negativo*.

Não foi possível examinar outros órgãos, porque elle estava meio devorado pelos companheiros.

12.º — Ao 30º dia morre outro rato. *Magrissimo*.

Ganglios, fígado, baço e mucosa nasal — *bacillos e granulações acido-resistentes*.

13.º — No 102.º dia morre outro rato.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes* (num apenas); *granulações cyanophilas e acido-resistentes*. Fígado, baço, sangue — *negativos*. Mucosa nasal — *bacillos cyanophilos*.

14.º — No 118.º dia morre outro. *Pseudo-tuberculose*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes e granulações cyanophilas em todos*. Fígado e baço — *negativos*. Mucosa nasal — *bacillos cyanophilos*. Sangue — *negativo*.

15.º — No 136.º dia amanheceu morto um rato. *Pseudo-tuberculose*.

Todos os órgãos, *negativos*, seja para *bacillos ou granulações*.

16.º — No 142.º dia morre outro rato. *Pseudo-tuberculose*. Não se encontrou germen em parte alguma.

O filtrado desta experiencia deveria ser extremamente toxico, porque os animaes não se desenvolveram.

4.º Lote

Ratos de 110 grs., inoculados no tecido sub-cutaneo do flanco direito, com filtrado de material conservado em glicerina cerca de um mez (geladeira).

17.º — No 30.º dia sacrificou-se um rato.

Começo de prenhez. *Magra. Rhinite.*

Ganglios — *granulações acido-resistentes e cyanophilas.* Fígado e baço — idem. Mucosa nasal — *bacillos cyanophilos e granulações acido-resistentes.*

No ponto de inoculação formou-se pequeno abcesso, no qual se encontraram — *granulações acido-resistentes e cyanophilas.*

18.º — No 33.a dia. *Gordo.*

Ganglios — *bacilos e granulações acido-resistentes e cyanophilas.* Fígado, baço e sangue - *negativos.* Mucosa nasal — *granulações acido-resistentes.*

19.º — No 40.º dia. Encontrado morto.

Ganglios — *granulações cyanophilas.* Fígado *Bacillos acido resistentes.* Baço — *negativo.* Mucosa nasal — *granulações acido resistentes e cyanophilas e bacillos cyanophilos.*

QUADRO 1

N.º	Peso	Material conservado	Tempo de inoculação	Resultado
1	125 gr.	5 dias em glicerina	14 dias	+
2	125 gr.	5 " " "	19 "	+
3	80 gr.	5 " " "	36 "	+++
4	125 gr.	5 " " "	60 "	+
5	40 gr.	6 " " "	18 "	++
6	40 gr.	6 " " "	40 "	—
7	40 gr.	6 " " "	65 "	++
8	40 gr.	6 " " "	90 "	++
9	40 gr.	6 " " "	91 "	+
10	40 gr.	6 " " "	110 "	—
11	100 gr.	11 " " "	23 "	++
12	100 gr.	11 " " "	30 "	+
13	100 gr.	11 " " "	102 "	+
14	100 gr.	11 " " "	112 "	++
15	100 gr.	11 " " "	136 "	—
16	100 gr.	11 " " "	142 "	+
17	100 gr.	30 " " "	33 "	+
18	100 gr.	30 " " "	30 "	+
19	100 gr.	30 " " "	40 "	+

Signaes: Todos os órgãos infectados	+++
Mais da metade	++
Menos da metade	+
Negativos	—

Estes resultados só se referem a bacillos acido-resistentes.

Em resumo:

Em 19 ratos, 7 foram encontrados mortos, 7 estavam magros ou cacheticos e 5 regulares ou gordos.

Como se vê, poucos foram os ratos que se mantiveram em boas condições, não obstante bem alimentados com leite crû, trigoilho e aveia.

Bom estado geral nem sempre quer dizer infestação pouco elevada. Haja vista os ratos 4, 7, 9. Qualquer que seja o peso do animal, a disseminação do virus e sua evolução bacillar dá-se do mesmo modo, indo os germens localizar-se nos ganglios lymphaticos e órgãos abdominaes.

Sua persistencia, do mesmo modo, é varia, parecendo depender muito pouco da idade que tinha o animal, quando foi feita a inoculação. Mas, está muito ligada á virulencia do material. Orgãos septicos mantidos em glicerina, na geladeira, durante 30 dias, acham-se grandemente diminuidor em sua acção infectante.

O agravamento da infecção deu-se toda a vez que intercorreram causas extranhas (tenia hepatica, num caso, pseudo tuberculose em outros).

Auctores dizem que depois do 3.º mez de inoculação do filtrado do bacillo de Koch em animaes, já se não encontram mais microorganismos nos tecidos.

Com as variações da semente e do terreno, o facto é verdadeiro com o bacillo de Stefanski. Entretanto, o rato 14, quando se infectou com o virus da pseudo-tuberculose, ainda encerrava nos organs o micro-organismo de Stefanski, ao morrer, 112 dias após a inoculação do filtrado, apresentava generalização bacillar, facto indiscutivel de aggravação morbida.

Mas os ratos 15 e 16, mortos tambem de pseudo-tuberculose, respectivamente no 130.º e 142.º dias de inoculação do filtrado, já haviam destruido os micro-organismos, porque nenhum bacillo ou granulação foi visto no esfregaço dos órgãos.

Ratos inoculados com bacillos lavados.

1.º lote:

Ratos de 80 e 125 grs., inoculados sob a pèlle do flanco direito,

com 1cc. de emulsão de bacillos lavados, em solução physiologica. Material conservado 5 dias em glicerina, na geladeira.

1.° — No 14.° dia sacrificamos um rato de 80 grs. Femea. *Magrissima*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes em quasi todos, assim como no figado. Baço — negativo.*

Outros órgãos não fizemos.

2.° — No 16.° dia. Peso — 125 grs. *Em boas condições.*

Ganglios — *bacillos e granulações acido-resistentes em quasi todos. Figado — muito rico em bacillos. Baço e sangue — negativos. Mucosa nasal — bacillos ácidos-resistentes.*

3.° — No 29.° dia. Peso — 125 grs. Femea. *Magra.*

Ganglios — *bacillos e granulações acido-resistentes em quasi todos. Figado e baço — granulações acido-resistentes. Mucosa nasal — bacillos cyanophilos. Sangue negativo.*

4.° — No 36.° dia. Peso — 80 grs. *Em boas condições. Ganglios — poucos bacillos em alguns ganglios. Figado, baço, sangue e mucosa nasal — bacillos acido-resistentes.*

5.° — No 45.° dia. Peso — 80 grs. Femea. *Gorda.*

Ganglios — *Bacillos acido-resistentes em alguns (inguinal direito rico), granulações acido-resistentes em todos. Figado e baço — granulações acido-resistentes. Sangue — negativo. Mucosa nasal — rica.*

6.° — No 60.° dia. Peso 125 grs. *Magro.*

Ganglios — *bacillos e granulações acido-resistentes em alguns (inguinal direito rico). Figado, baço, mucosa nasal — granulações acido-resistentes. Sangue — negativo.*

7.° — No 90.° dia. Peso 80 grs. *Magro.*

Ganglios — *granulações acido-resistentes. Figado e baço — negativos. Mucosa nasal — granulações acido-resistentes. Sangue — negativo.*

2.° *Lote*

Ratos de 100 e 125 grs., inoculados no peritonio. Material conservado 6 dias em glicerina.

8.° — No 21.° dia sacrificado um rato. Peso — 100 grs.

Em boas condições.

Ganglios — *granulações acido-resistentes. Figado e baço — granulações acido-resistentes.*

Outros órgãos não foram pesquisados.

9.° — No 39.° dia. Peso — 100 grs. *Em boas condições.*

Todos os órgãos *negativos*.

10.° — No 66.° dia. Peso — 125 grs. *Gordo*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes* (só na axillar direita) e *raras granulações cyanophilas*. Fígado, baço e sangue — *negativos*, Mucosa nasal — *bacillos cyanophilos*.

11.° — No 110.° dia. Peso — 125 grs. *Gordo*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes* (só na axillar direita) e *raras granulações cyanophilas*. Fígado, baço e sangue *negativos*. Mucosa nasal — *bacillos cyanophilos*.

3.° *Lote*

Ratos de 110 grs., inoculados sob a pelle do flanco direito. Material conservado 11 dias, na geladeira, em glicerina.

12.° — No 30.° dia foi sacrificado um rato. *Gordo*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes na pleiade axillar esquerda e granulações cyanophilas e alido-resistentes em quasi todas as demais*. Fígado, baço, sangue, mucosa nasal — *granulações cyanophilas e acido-resistentes*.

13.° — No 33.° dia. *Gorda*.

Ganglios — *poucos bacillos acido-resistentes em alguns; granulações cyanophilas*. Fígado — *bacillos cyanophilos e granulações acido-resistentes*. Baço — *bacillos acido-resistentes (rico)*. Sangue *negativo*. Mucosa nasal — *bacillos cyanophilos (rico)*.

14.° — No 63° dia. *Gorda*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes e granulações cyanophilas, em alguns*. Fígado — *negativo*. Baço — *granulações cyanophilas*. Sangue — *bacillos acido-resistentes*. Mucosa nasal — *bacillos acido-resistentes*.

15.° — No dia 110.° — Amanheceu morto. *Pseudo-tuberculose*.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes (rico), somente na inguinal direita; granulações cyanophilas em todas*. Fígado — *negativo*. Baço — *granulações cyanophilas*. Sangue — *negativo*. Mucosa nasal — *riquissimo em bacillos e granulações cyanophilas*.

16.° — No dia 122.° morreu de congestão pulmonar.

Ganglios — *bacillos acido-resistentes* (só na pleiade inguinal direita). Os outros órgãos — *negativos*.

4.° *Lote*

Ratos de 110 grs., inoculados sob a pelle do flanco direito. Material conservado 30 dias em glicerina.

17.° — No 30.° dia sacrificado. Começo de prenhez. *Magra*.

Ganglios, fígado, baço, mucosa nasal — *granulações cyanophilas*. Sangue — *negativo*.

18.º — No 33.º dia. *Gorda.*

Ganglios — *bacillos acido-resistentes em alguns e granulações cyanophilas em todos.* Fígado, baço, mucosa nasal — *granulações cyanophilas.* Sangue, negativo.

Abcesso no ponto de inoculação, *rico em bacillos acido-resistentes.*

19.º — No 40.º dia. *Prenhe. Gorda.*

Ganglios — *Bacillos acido-resistentes, só na pleiade inguinal direita; granulações cyanophilas em todos.* Fígado — e baço — *granulações cyanophilas.* Sangue — *negativo.* Mucosa nasal — *bacillos e granulações cyanophilas.*

Abcesso no ponto de inoculação, *rico em bacillos acido-resistentes.*

QUADRO II

N.º	Peso	Material conservado	Tempo de inoculação	Resultado
1	80 grs.	5 dias em glicerina	14 dias	+
2	125 grs.	6 " " "	16 "	+
3	125 grs.	6 " " "	29 "	+
4	80 grs.	5 " " "	36 "	++
5	80 grs.	5 " " "	45 "	+
6	125 grs.	5 " " "	60 "	+
7	80 grs.	5 " " "	90 "	—
8	100 grs.	5 " " "	21 "	—
9	100 grs.	5 " " "	39 "	—
10	100 grs.	6 " " "	66 "	—
11	125 grs.	6 " " "	110 "	+
12	110 grs.	11 " " "	30 "	+
13	110 grs.	11 " " "	33 "	+
14	110 grs.	11 " " "	63 "	+
15	110 grs.	11 " " "	110 "	+
16	110 grs.	11 " " "	122 "	+
17	110 grs.	30 " " "	30 "	—
18	110 grs.	30 " " "	33 "	+
19	110 grs.	30 " " "	40 "	+

Signaes: Bacillos em todos os órgãos examinados .+++
 Bacillos em mais da metade ++
 Bacillos em menos da metade +
 Negativos —

Em resumo:

Em 19 ratos inoculados, houve só 2 mortos, determinados por pseudo-tuberculose e congestão pulmonar.

Sacrificados, 5 estavam magros, um mesmo magríssimo e 12 gordos ou em boas condições.

Não houve um só caso de generalização a todos os órgãos, mesmo naquelles que tiveram intercorrença (pseudo-tuberculose e congestão pulmonar) e que encerravam ainda bacilos nos tecidos.

A capacidade defensiva do organismo manifesta-se aqui com maior energia. Em 2 casos houve encistamento dos germens no ponto de inoculação e também nos ganglios receptores immediatos da zona de penetração, isto é, inguinal e axillar direitas.

A destruição dos germens, que se faz em tempo variavel, é tam-bem mais precoce, seja que o virus é mais aggressivo, ou o bacillo se conserva mais difficilmente na glycerina.

Precoce e abundante foi, do mesmo modo, a eliminação pela via nasal.

Outro facto digno de observação é a existencia de granulações cyanophilas mais copiosas em quasi todos os órgãos dando a impressão que ellas representam o ultimo termo da phase regressiva do microorganismo.

Discussão

Em sua grande maioria, as infecções naturaes continuam muito obscuras.

Quando se observa, como na lepra murina, em que entram em scena organismo e micro-organismo, com afinidade um para outro, a destruição de doses macissas de germens inoculados, e o triumpho completo do animal, mais evidente se torna a complexidade com que as doenças se processam na natureza.

Entre nossos animaes de experiencia temos alguns infectados por escarificação da pelle, atravez de urna gotta de emulsão de triturado de ganglio de rato leproso.

E' mais ou menos um typo de infecção paucibacillar, até certo ponto comparavel ao que se deve dar na vida batalhadora dos ex-gotos onde elles mutuamente se recebem a dentadas.

Em cerca de 3 mezes de observação, nestes casos, temos obtido apenas ligeiras infestações de alguns ganglios. E' possivel que a infecção progrida, como também é possivel que se reduza a latencia prolongada, ameaçando a vida do animal, ou mesmo se transforme em immuidade.

Mas o que obtivemos com a inoculação do filtrado foi muito differente. Deu-se a generalização rapida do processo, deperecimento cachexia e morte.

Admittindo que o filtro Zeiss tenha deixado passar alguns bacillos, não obstante a prova negativa de nossas pesquisas, dar a esses poucos germens a responsabilidade do ataque a quasi todos os orgãos, no curto prazo de um mez, é forçar conclusões, e tanto mais se justifica essa maneira de vêr, quando por escarificação, não se obtém quadro que de longe se compare ao da inoculação do filtrado.

Somos, portanto, levados a admittir para o bacillo de Stefanski a mesma cyclogenia que Fontes, Calmette e sua escola, Sânairelli, Alessandrini, etc., reconheceram no bacilo da tuberculose.

Aliás, Markianos em 1929 e 1931, tendo injectado filtrado de material de lepra murina em ratos sãos, encontrou bacillos acido-resistentes nas glandular lymphaticas, 20 dias depois, em ratos novos, e 2 mezes depois, em adultos.

Em menos de 20 dias, mesmo em ratos adultos, encontramos bacillos acido-resistentes nos ganglios e visceras e eliminação pela via nasal.

Ninguém põe mais em duvida estes factos, mas, tendo entrado em nova phase a questão da filtrabilidade, com a verificação da passagem de alguns bacillos atravez das velas Chamberland ou Berkefeld e a hypothese de infecção paucibacillar, impunha-se como ainda se impõe a necessidade de novas pesquisas.

Este trabalho procura trazer um contingente experimental neste sentido.

E suas conclusões não permitem arrimo á idea da acção infecciosa dos poucos bacillos, em contraposição aos elementos ultra-microscopicos.

Temos de acceitar que o bacillo de Stefanski *tem uma phase virus e que esta phase, que depois evolue para a forma bacillar, é a mais aggressiva do seu cyclo vital.*

As experiencias de inoculação macissa de *bacilos lavados*, com um minimo sempre possivel, de formas invisiveis, vêm corroborar nessa ordem de considerações.

Se o germen, em sua *forma bacillar* representasse a phase verdadeiramente activa no ataque e diffusão do organismo, teriamos infecções mais agudas, extensão a todos os ganglios e visceras, maior gráo de aniquillamento do que na inoculação do filtrado.

E o que se viu foi justamente o contrario: tendencia ao encislamento *in loco* ou aprisionamento nos ganglios afferentes, menor disseminação, bom estado geral, destruição mais precoce dos germens, com apparecimento copioso de formas granulares e cyanophilas.

Não houve um só caso de infestação geral, mesmo com intercurrência grave, como a pseudo-tuberculose.

Tenho para mim que, neste processo de inoculação, as *formas*

activas que, por ventura, acompanham os bacillos, são embaraçadas pela desagregação destes, que, reduzidos a granulações acido-sensíveis, são logo destruídas, vindo assim provocar a formação de anticorpos.

Conclusões

Filtrando em filtros Zeiss emulsões de bacillos de Stefanski e inoculando-as em ratos, ao mesmo tempo que se acompanhavam outras series inoculadas com os mesmos bacillos, porém "lavados", concluímos o seguinte:

1.º — O virus é mais activo e dissemina-se com maior rapidez. Dentro de, pelo menos 14 dias, já se encontram nos ganglios lymphaticos bacillos acido-resistentes.

2.º — Os animaes, que estavam submettidos a regimen completo, pouco variaram em face á infecção, não obstante as diferenças de peso e idade.

3.º — Infecções intercorrentes facilitam de modo consideravel a disseminação dos micro-organismos.

4.º — Quando o animal resiste á infecção os bacillos desaparecem dos organs em 312 mezes, mais ou menos, dependendo essa destruição da virulencia dos germens.

Os órgãos infectados conservados em glicerina por 30 dias, tornam-se poucos virulentos.

5.º — A' inoculação de *Bacillos lavados*, o organismo defende-se melhor: ha intensa bacteriolyse, resultando abundantes granulações cyanophilas, outras vezes os germens ficam encystados subcutaneamente, *in loco*, ou retidos nos ganglios afferentes.

6.º — Em todos os casos, a eliminação dos germens pela via nasal é copiosa.

7.º — Em menos de 3 mezes o organismo, geralmente, consegue desembaraçar-se dos bacillos, com excepção dos que se acham encystados.

S.º — O ultra-virus é a phase aggressiva na cyclogenia do bacillo de Stefanski.

Cria-se com elle um estado infeccioso no rato, mas nem sempre se chega á lepra murina. Esta condição parece depender de varias circumstancias associadas, cujo conhecimento se impõe por novas pesquisas.

Aproveitamos a oportunidade de agradecer ao eminente Prof. M. Ficker as facilidades que nos offereceu para a obtenção do bacillo de Stefanski como Lambem ao nosso esclarecido companheiro do Instituto, dr. Benjamin Ribeiro e ao nosso dedicado auxiliar João Lamosa pelo que nos ajudaram neste trabalho.