

FACULDADE DE MEDICINA E CIRURGIA DE SÃO PAULO

Director: DR. ADOLPHO LINDENBERG

INSTITUTO DE HYGIENE — Boletins N. 4 e 5

Director: DR. G. H. DE PAULA SOUZA

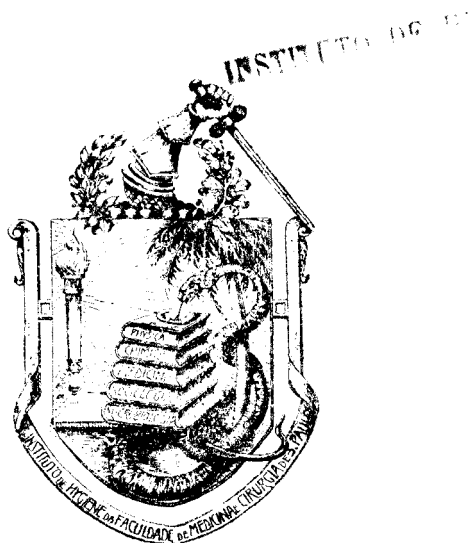
O predomínio da *Leptospira* ictero-hemorrhagica nos ratos de S. Paulo

Bacillos semelhantes ao da peste, encontra- dos nos ratos da cidade de S. Paulo

PELO

DR. WILSON G. SMILLIE

1920



Publicado sob os auspícios do Governo do Estado de São Paulo
e da Fundação Rockefeller, Estados Unidos

FACULDADE DE MEDICINA E CIRURGIA DE SÃO PAULO

Director : DR. ADOLPHO LINDENBERG

INSTITUTO DE HYGIENE — Boletins N. 4 e 5

Director : DR. G. H. DE PAULA SOUZA

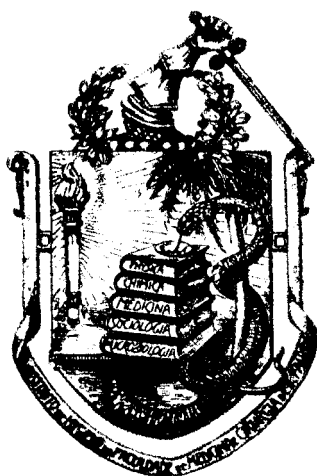
O predomínio da leptospira ictero-hemorrhagica nos ratos de S. Paulo

Bacillos semelhantes ao da peste, encontra- dos nos ratos da cidade de S. Paulo

PELO

DR. WILSON G. SMILLIE

1920



Publicado sob os auspícios do Governo do Estado de São Paulo
e da Fundação Rockefeller, Estados Unidos

Professor Cathedratico e Director do Instituto
DR. G. H. DE PAULA SOUZA

Professor substituto de Hyg. e Medicina Legal
VAGO

Assistente
DR. F. BORGES VIEIRA

Assistente pensionado
DR. ANTONIO DE ALMEIDA JUNIOR

Chefe do Posto Experimental
DR. SAMUEL B. PESSOA

O predomínio da *Leptospira* ictero-hemorrhagica nos ratos de São Paulo

pelo Prof. Dr. WILSON G. SMILLIE

A leptospira causadora da febre ictero-hemorrhagica adquiriu grande importancia para os scientistas, hygienistas e medicos nestes ultimos annos, devido as epidemias dessa molestia no Japão, nas trincheiras em França e na Italia, e á descoberta da extensa disseminação do seu agente etiologico, tanto no velho como no novo mundo. A valiosa dissertação do Dr. Ovidio Pires de Campos sobre a febre ictero-hemorrhagica em sua prelecção inicial aos estudantes de medicina, está ainda tão clara em vossas memorias, que bastará fazermos uma breve exposição dos conhecimentos actuaes quanto a esta molestia. Weil na sua primeira comunicação fez um bom resumo dos symptomas clinicos da molestia e notou que ella é mais commum entre cozinheiros, carniceros e os que trabalham em exgottos ou encanamentos. A mortalidade é baixa, sendo de 3 a 6% e a molestia ocorre em forma epidemica ou occasionalmente na forma esporadica. No Japão ha uma molestia muito commum entre os trabalhadores nas plantações de arroz. Esta molestia apresenta a mesma symptomatologia e pathologia que a molestia de Weil,

sendo porém mais frequentemente fatal, com uma mortalidade de 35% ou mais. Houve longas discussões quanto á identidade das duas molestias e essa questão ficou incerta por muitos annos.

Inada (1) e os que com elle cooperaram em 1915, descobriram a causa da ictericia epidemica no Japão; conseguiram cultivar o organismo e transmitir a molestia á cobayas. Descobriram tambem que o vector endemico era o rato de exgottos. Justamente por occasião das suas primeiras communicações, grassava nas trincheiras na Flandres uma epidemia de ictericia. Stokes (2) observou nos soldados infeccionados um organismo semelhante ao descripto por Inada, organismo esse encontrado tambem nos ratos apanhados nas trincheiras.

Noguchi (3) estudou organismos recebidos de Inada bem como outros de Stokes e por meio de reacções culturaes e immunologicas provou que os organismos encontrados no Japão e na Flandres eram identicos. Elle encontrou tambem em 8% dos ratos de exgottos de Nova York, uma leptospira que provou ser identica a do Japão e da Flandres.

Em trabalhos subsequentes a leptospira ictero-hemorrhagica tem sido encontrada em varias partes do mundo. Jobling e Eggstein (4) encontraram-na em 10 % dos ratos no Sul dos Estados Unidos. Nicolle e Lebailly (5) nos ratos em Tunis; Lheritier (6) na Algeria, e Coles (7) em 9 % dos ratos na Inglaterra. Uma alta porcentagem de infecções entre ratos foi observada nas areas onde predominavam as epidemias humanas. Ito observou a infecção em 40,2 % do *Mus. decumanus* no Japão e Stokes encontrou a leptospira nos rins de 40 % dos ratos nas trincheiras. Durante as investigações que fez em Guayaquil no anno passado. Noguchi (8) notou que 67 % dos ratos da cidade estavam infectados pela leptospira e tambem encontrou-a em um camondongo. Fizaram-se estudos com diversos animaes incluindo outros roedores, morcegos, etc., mas todos deram resultados negativos. Numa communicação pessoal, o Dr. Carini contou-me ter injectado órgãos de alguns ratos desta cidade em cobayas, conseguindo produzir symptomas typicos de hemorrhagia e ictericia. Além disso demonstrou a presença da leptospira no figado das cobayas infectadas. O Dr. McDowell, do Rio, tambem relata ter produzido a molestia em cobayas pela inoculação de material obtido dos ratos daquella cidade.

Em 1918 Noguchi (10) differenciou os varios generos de spirochetas, e o organismo causador da ictericia infectiosa ao qual tinha sido dado o nome de *spirocheta* foi classificado como uma *leptospira*; em seguida descreveu os caracteristicos morphologicos e culturaes desse organismo e indicou quaes os meios mais convenientes para a sua cultura.

O rato é sem duvida o foco endemico da molestia. Encontra-se a leptos-

pira nos rins e na urina de ratos aparentemente normaes e estes organismos causam a morte de uma cobaya em 7 ou 9 dias. A molestia torna-se mais frequente em qualquer lugar em que o homem se ache em contacto com ratos e suas excreções, particularmente nas minas humidas, nos escoa-doiros, nas trincheiras, nos exgottos, etc. Sem duvida em todas as comunidades occorrem no homem casos esporadicos que não são reconhecidos. A leptospira não sobrevive na urina, na agua ou no sólo por mais de 24 horas, em compensação ella é muito activa e passa facilmente atravez da pelle intacta. Parece provavel que no Japão a molestia seja algumas vezes transmittida directamente de homem para homem, pois que ella é mais frequente entre os camponezes que trabalham juntos nos campos encharcados onde cresce o arroz. Inada demonstrou que a leptospira póde persistir na urina de um convalescente por 4 ou 6 semanas depois de passado o periodo febril da molestia. Assim a leptospira na urina de um vector convalescente poderá penetrar na pelle de outro trabalhador e esta transmissão directa explicará talvez a elevação da taxa de mortalidade desta molestia no Japão.

A morphologia e os pormenores dos caracteristicos culturaes da leptospira ictero-hemorrhagica têm um interesse especial. Noguchi demonstrou por seus estudos em Guayaquil que o agente causal da febre amarella é muito semelhante á leptospira da ictericia epidemica. Os methodos de cultura são quasi os mesmos para os dois organismos, porém os syndromas pathologicos em animaes, ainda que haja entre elles certos pontos de semelhança, são distinctos e caracteristicos em cada molestia.

Occorreu-me que seria de interesse determinar a porcentagem da infecção pela leptospira ictero-hemorrhagica en-

tre os ratos de São Paulo e estudar os seus característicos culturaes e morphologicos. Com esse fim emprehendi este trabalho, cujos resultados passo a relatar.

Dos 41 ratos empregados nos estudos e apanhados em varias partes da cidade o maior numero proveio do galinheiro da Santa Casa, sendo 27 delles adultos e 14 novos. Logo depois de apanhado, o animal era chloroformisado e autopsiado com precauções de asepsia. Os rins eram triturados com areia em um almofariz esterilizado, adicionava-se então 10 c.c. de solução de Ringer e filtrava-se a emulsão em uma gaze dobrada. Injectava-se 5 c.c. desta emulsão intra-peritonealmente em uma cobaya de 200 a 250 grammas. Todas as cobayas foram conservadas por tres mezes e das quarenta e uma assim tratadas quatro manifestaram symptomas typicos de febre ictero-hemorrhagica e morreram. Os quatro casos positivos foram obtidos com rins de ratos adultos. 5 ou 6 dias depois da injectão observa-se uma febre repentina com ictericia que augmenta rapidamente e dá-se a morte do animal entre 36 a 48 horas depois, com hemorrhagia pelo nariz, recto e vagina. A autopsia apresenta um quadro caracteristico. Ao remover a pelle do abdomen observa-se um grande numero de pequenas hemorrhagias no tecido subcutaneo dando á superficie interna da pelle uma apparencia de noz moscada. As glandulas inguinaes e axillares, apresentam hemorrhagias. Ha em todas as mucosas, nos espaços intercostaes e geralmente distribuida por todo o corpo uma coloração amarella de um tom distincto cor de limão. Ha um grande numero de pequenas hemorrhagias nos tecidos retro-peritoneaes, nos rins, nas paredes do intestino grosso e delgado e especialmente nos pulmões. Estas multiplas hemor-

rhagias bem como a ictericia generalizada dão um quadro que não pôde ser confundido com o de qualquer outra molestia. Os esfregaços do figado patenteiam grande abundancia de leptospiras, as quaes são observadas nos rins em menor quantidade e a muito custo tambem na corrente sanguinea. Uma vez produzida a molestia na cobaya, ella pôde ser transmittida á gerações sem conta augmentando algum tanto a sua virulencia, como na raiva até attingir um certo gráo de virulencia. Neste caso o organismo typico tem um periodo de incubação de 5 a 6 dias e causa um curto periodo febril morrendo muitas vezes o animal algumas horas depois do apparecimento da ictericia.

Com um dos meus typos de leptospira a feição hemorrhagica dominou o quadro. Frequentemente a ictericia é realmente muito leve, mas a hemorrhagia nas glandulas inguinaes, rins, pulmões e peritoneo é bem accentuada. Este caracteristico persistiu por completo em todas as gerações subsequentes deste typo de microorganismo.

Fiz culturas de varios typos usando os methodos suggeridos por Noguchi. O caldo de cultura inicial consistia em 1,5 c.c. de soro de coelho colhido asepticamente — 4,5 c.c. de solução de Ringer e 1 c.c. de plasma de coelho citratado. A solução de Ringer e o soro de coelho foram conservados em tubos e addicionados ao plasma de coelho pouco antes da inoculação do tubo. Chloroformizei cobayas em estado adiantado da molestia e retirei uma pequena quantidade de material de diversos órgãos por meio de pipettas capillares esterilizadas e inoculei com isso diversos tubos. Fiz em geral culturas com material tirado do figado, dos rins, do baço e sangue do coração. O caldo era coberto com petroleo liquido e incubado a 37° C. Podia-se observar a

leptospira nas camadas superiores do caldo ao cabo de 7 a 9 dias. Esse caldo era semi-solido porque quando se adiciona o plasma de coelho forma-se um coagulo no qual a leptospira move-se livremente. Foram feitas culturas satisfactorias de tres das quatro raças.

O organismo pôde ser estudado sobre fundo escuro ou depois de colorido usando-se o corante de Leishman durante uma hora e em seguida o de Giemsa durante toda a noite. Sempre deve ser fixado em acido osmico, e mesmo nas melhores condições perdem-se um tanto os caracteristicos morphologicos durante a coloração. Os caracteristicos morphologicos e culturaes dos typos observados em São Paulo correspondem em todos os particulares as descripções de Noguchi e outros auctores. Não houve oportunidade para experiencias immunologicas comparativas com typos de outra proveniencia.

Inada (11) inoculou cavallos com culturas de varios typos de leptospiiras vivas e obteve um sôro o qual diminue grandemente os symptomas e reduz a mortalidade da molestia no homem.

A dignose da febre ictero-hemorrhagica no homem pôde ser feita pelo exame directo do sangue, methodo vagaroso e infructifero, ou pela inoculação intra-peritoneal do sangue ou urina do paciente em cobayas. Em seus estudos em Guayaquil, Noguchi observou que a susceptibilidade das cobayas a inoculação inicial é variavel. Elle inoculou grupos de quatro cobayas com a mesma emulsão de rins de ratos, destas, duas morriam com symptomas typicos, uma tinha um caso brando e a outra não apresentava symptoma algum. Esta variação de susceptibilidade é de grande importancia na diagnose dos casos humanos porque si algum apresentar um caso suspeito de febre ictero-hemorrhagica e a inoculação do

seu sangue em uma cobaya não produzir resultado algum, não se pôde afirmar com certeza que o paciente não teve febre ictero-hemorrhagica. Pôde ser que o organismo fosse de tão pequena virulencia que não produzisse symptomas objectivos na cobaya. No caso de se obter um resultado positivo não ha diagnose que possa ser feita com maior facilidade, porque o quadro pathologico em cobayas é macro e microscopicamente muito caracteristico.

Visto um ataque da molestia, embora brando, produzir uma immunidade relativamente alta e visto a virulencia da leptospira ser variavel, julguei provavel que algumas das cobayas inoculadas com rins de ratos tivessem soffrido de uma forma branda da molestia sem apresentar ictericia e hemorrhagias, a qual entretanto produziu immunidade á inecções subsequentes. Consegue-se obter um typo virulento de leptospira passando-a rapidamente por varias gerações de cobayas, portanto é facil determinar se as cobayas previamente inoculadas com rins de ratos estão ou não immunes, reinoculando-as com maiores doses de um typo virulento.

Em todos os casos inocularam-se com uma grande quantidade de emulsão fresca do typo virulento de leptospira uma cobaya testemunha e outra inoculada previamente. Em todos os casos são dados o dia da inoculação e da morte da cobaya. Todas as cobayas de testemunha morreram com symptomas caracteristicos e regularmente entre o setimo e o nono dia. Nove das onze cobayas inoculadas não apresentaram symptoma algum. Destas, duas não estavam immunes, e apresentaram symptomas typicos morrendo rapidamente. Realizaram-se experiencias identicas com outros typos virulentos. Dezoito cobayas que haviam sido inoculadas 30 ou 60 dias antes com rins

de rato e não tinham apresentado nessa ocasião symptoma algum, foram inoculadas novamente com um typo virulento de leptospira. Apenas quatro das dezoito não possuíam immunidade. Estas quatro desenvolveram symptomas typicos e morreram immediatamente.

Destas experiencias pôde-se concluir ou que quatorze cobayas possuíam uma alta immunidade natural contra a leptospira, ou o que é mais provavel, que esta immunidade fôra o resultado de um caso brando da molestia produzido pela leptospira de pouca virulencia, proveniente dos rins dos ratos de São Paulo. Si acceitarmos a segunda conclusão, a incidencia da leptospira nos ratos de São Paulo não é de 10 % conforme ficou estabelecido pelos symptomas typicos de ictericia e hemorragia nas cobayas inoculadas com emulsão de rins de rato, mas sim de 75 % conforme a immunidade produzida em cobayas inoculadas previamente, á inoculação subsequente de typos virulentos de leptospira. Apesar de muito provavel esta conclusão ainda não está provada. Adoptemos portanto o coefficiente de infecção escolhido por ou-

tros auctores, isto é, a porcentagem de ratos infeccionados por leptospi ras sufficientemente virulentas para produzir symptomas typicos em cobayas. A porcentagem é de 10 %, sendo semelhante ao coefficiente da infecção na Inglaterra, Nova York, Sul dos Estados Unidos, e Tunis, e é muito mais baixa do que a encontrada nas partes do mundo onde a molestia é epidemica, especialmente no Japão e nas trincheiras na França durante a guerra.

Apezar disso a leptospira ictero-hemorrhagica virulenta existe em São Paulo no rato de exgottos, seu vector endemico, e sem duvida produz casos esporadicos da molestia entre nós. Qualquer circumstancia que obrigue o homem a trabalhar em contacto com excreções de ratos por exemplo, causará sem duvida uma epidemia da molestia. Esta conclusão dá mais uma prova á accusação feita ao rato de ser um inimigo economico e uma ameaça mortal para a humanidade e vem estimular a nossa determinação de sustentar contra elle uma campanha vigorosa, continada a todo o transe.

Conclusões

1. — Inocularam-se em cobayas os rins de 41 ratos aparentemente normaes, apanhados na cidade de São Paulo. Disso resultou o desenvolvimento dos symptomas typicos da ictericia epidemica em quatro cobayas, sendo encontradas a *leptospira ictero-hemorrhagica* nos seus órgãos.

2. — Tres destes typos de leptospira foram cultivados de accordo com o methodo A de Noguchi.

3. — Uma grande proporção das cobayas inoculadas com rins de ratos desenvolveu um alto gráo de immunidade contra um typo virulento de leptospira. Portanto parece provavel que uma grande porcentagem, isto é, 75 % ou mais dos ratos de São Paulo albergam a leptospira ictero-hemorrhagica de pouca virulencia a qual produziu immunidade nas cobayas, sem causar symptomas objectivos.

Bibliographia

1. — Inada, Y., Ito, H. Hoki, R. and Wairi, H. — *Journal Exp. Med.* — 1916 — XXIV — 471.
2. — Stokes, A., Pyle, I. A. and Tytler, W. H. — *Lancet*. 1917 — 1 142.
3. — Noguchi, H. — *Journal Exp. Med.* — 1917 — XXV — 755.
4. — Jobling and Eggstein — *Journal Am. Med. Assoc.* 1917. — LXIX — 1787.
5. — Nicolle, C. and Lebailly, C. — *Compt. Rend. Soc. Biol.* — 1918 — LXXXI — 349.
6. — Lherithier, A. — *Bull. Soc. Path. Exot.* — 1918 — XI 357.
7. — Coles, A. C. — *Journal of Parasitology* 1918 Vol. XI, P. 1.
8. — Noguchi, H. — *Journal Exp. Med.* — 1919 — Vol. XXX — p. 95.
9. — McDowell —
10. — Noguchi, H. — *Journal Exp. Med.* — 1918 — Vol. XXVII — p. 393.
11. — Inada, R., Ito, H., Hoki, R. Ido Y., and Wani, H. *Journal Exp. Med.* 1918 — Vol. XXVII — p. 283.



Bacillos semelhantes ao da peste, encontrados nos ratos da cidade de São Paulo

pelo Prof. Dr. WILSON G. SMILLIE

Senhores:

Não tenho em mente causar sensação apresentando um artigo sobre assumpto que tanto preocupa o publico no momento actual. Tendo feito estas observações ha semanas atraz, sinto que a presença da molestia tenha vindo roubar ao meu artigo todo o interesse, pois, quem quererá saber de um bacillo semelhante ao da peste quando o verdadeiro germen da molestia se acha entre nós?

Apezar disso ousou apresentar-vos este trabalho como resumo da diagnose differencial do bacillo da peste em ratos, assumpto da maxima importancia em qualquer epidemia, e desejo mostrar-vos ao microscopio, um bacillo, cuja morphologia é identica á do bacillo da peste.

Durante as nossas pesquisas quanto á existencia do leptospira ictero-hemorrhagiae nos ratos de exgottos da cidade de São Paulo, encontramos incidentalmente um interessante grupo de microorganismos que a principio bastante nos inquietaram pela sua semelhança com o bacillo da peste.

O methodo empregado nessas pes-

quizas consistia em capturar ratos, aparentemente normaes, em varios pontos da cidade, e, depois de chloroformizal-os, retirar os rins, que eram macerados em um almofariz esterilizado com todas as precauções de asepsia, injectando-se a emulsão, assim obtida, na cavidade peritoneal de cobayas. Os nossos trabalhos proseguiam regularmente quando principiámos a fazer a necroscopia de ratos apanhados no galinheiro da Santa Casa. De cada grupo de tres ou quatro cobayas, injectadas com rins de ratos apanhados naquelle local, uma morria 12 a 24 horas depois de inoculada, manifestando symptomas typicos de animal inoculado com o bacillo da peste, apezar dos ratos empregados terem apresentado apparencia normal quando examinados.

Esfregaços com material retirado da cavidade peritoneal das cobayas mortas apresentavam myriades de bastonetes, Gram-negativos, de polos arredondados, que tomavam bem as cores de anilina, enquanto o meio ficava descorado, sendo a sua morphologia em todos os pontos caracteristica da do bacillo da peste. Obtinham-se facilmente culturas puras do germen por meio do

sangue retirado do coração das cobaias.

Era evidente que se tratava de um germen, que, si não era o bacillo da peste, tinha, por certo, relação íntima com elle. Cumpria-nos, portanto, a obrigação de abandonar qualquer outro trabalho e encetar immediatamente o estudo differencial desse organismo, o que foi feito incontinentemete.

Morphologia.

Em cultura nova ou em esfregaços dos tecidos do animal, o germen é um bacillo bipolar, de extremidades arredondadas; não é movel; não tem capsula e nem fórma esporos. Córa-se facilmente com as tintas communs de anilina e é Gram-negativo. Em caldo com chloreto de sodio a 3 % desenvolvem-se fórmas de involução. Não fórma fileiras, apesar de no caldo ser encontrado algumas vezes em grupo de dois e de quatro.

Caracteres culturais.

Agar. — Desenvolve-se vagarosamente em tubos de gelose inclinada, formando pequenas colonias esbranquiçadas e transparentes. Ao cabo de 24 horas, o inducto era apenas visivel. A addição de algumas gottas de sangue de coelho á gelose, favorece muito o desenvolvimento do microorganismo. A temperatura mais adequada ao seu desenvolvimento é 37.^o C. A temperatura de 20.^o C não é tão propicia ao crescimento das culturas.

Caldo.

O desenvolvimento das culturas foi muito escasso e diffuso em caldo, até depois de duas semanas de incubação; não conseguimos obter nelle a formação de estalactites caracteristicas. Co-

brindo a superficie do caldo com oleo, formaram-se pelliculas que se estenderam um a dois C. dentro do liquido, o que aliás só foi observado quando os frascos estavam collocados em repouso em logar firme durante quatro semanas.

Gelatina.

O desenvolvimento da cultura em gelatina effectuou-se vagarosamente sem liquefacção, depois de varios dias, observando-se um leve inducto ao longo do tracto da agulha.

Leite-turnesolado.

A mudança havida na cor do turnesol foi muito pequena, talvez devida á fermentação de insignificante quantidade (0.08 %) de assucar semelhante á dextrose presente no leite. Não houve coagulação.

Batatas.

A cultura em batatas foi invisivel. O exame do material, tirado da superficie da batata uma semana depois da inoculação, parecia indicar a existencia de um ligeiro inducto.

Meio semi-solido de Hiss.

Houve uma ligeira formação de acido, sem producção de gaz, no meio com dextrose, maltose, saccharose e mannita. Não se formou acido em lactose ou dextrina. Convem fazer notado que estes hydratos de carbono eram os unicos á mão e que a pureza chimica da saccharose era bem duvidosa.

Tubos de caldo com assucar.

Fizemos culturas em tubos de caldo com assucar, sendo a concentração em hydrogenio-íonte calculada sete dias de-

pois da inoculação. As culturas de todos os tubos patentearam desenvolvimento escasso. Os hydratos de carbono, que fermentaram, foram os mesmos acima indicados no meio semi-solido de Hiss. Em todos os tubos, onde houve fermentação, o ponto maximo a que atingiu a fermentação de acido foi 6,3, calculado pelo methodo colorimetrico. Nos tubos, em que não houve fermentação, e nos tubos-testemunhas, o ponto maximo foi 7,6.

Gelose de Mac Conkey (com taurocholato de sodio e vermelho neutro).

Repetidas sementeiras em gelose de MacConkey deram resultados negativos. Segundo a «Indian Plague Commission», o uso desse meio é um dos melhores methodos de differenciação entre o bacillo da peste e os do grupo pasteurella, porque o bacillo da peste se desenvolve rapidamente neste meio, o que se não dá com os outros membros do grupo da septicemia hemorrhagica.

Portanto é claro, que até este ponto, as unicas differenças caracteristicas entre o verdadeiro bacillo da peste e o organismo por nós observado consistiu em que este ultimo não se desenvolve no meio de MacConkey e em que não se obtem a formação característica de estalactites em caldo. Esta prova era inteiramente negativa e, assim, nas circumstancias presentes, não era sufficiente. Portanto, urgia obtermos a confirmação das observações culturaes já feitas.

Inoculação animal.

Cobayas. — Uma quantidade insignificante, 0,005 c. c., de um caldo com uma cultura de escasso desenvolvimento, de 24 horas, inoculada intraperito-

nealmente em uma cobaya de 300 grammas, produziu sempre a morte dentro de 14 a 20 horas. Havia uma area extensa de edema e hemorrhagia no ponto da inoculação; as glandulas inguinaes estavam enfartadas, de cor vermelha escura e intensamente congestas. O abdomen continha excesso de um fluido seroso claro ou levemente turvo, encontrando-se occasionalmente mancha branca de fibrina na superficie do figado. Os vasos abdominaes estavam extremamente turgidos; o baco engurgitado. A cavidade pleural continha 10 a 20 c. c. de serosidade e os pulmões estavam muito congestionados. A serosidade abdominal e pleural, o figado e o sangue do coração continham sempre, em grande numero, o organismo bipolar typico. Quando os bacillos eram inoculados subcutaneamente em cobayas, nas doses de 0,1 a 0,5 c. c. de um caldo de cultura de 24 horas, observava-se uma syndrome pathologica semelhante á produzida pelas inoculações intraperitoneaes, porque se seguia á inoculação uma septicemia rapida e fatal em poucos dias. Inoculando-se subcutaneamente nesses animaes, doses menores de 0,005 a 0,01 c. c. de um caldo de cultura de 24 horas, observava-se um quadro differente, havendo geralmente a formação de um abcesso no ponto da inoculação. O animal morria no quinto ou setimo dia com uma tremenda peritonite, pleurite e pericardite fibrino-purulenta. Em alguns casos o coração achava-se envolvido em uma camada de fibrina de 4 millimetros de espessura. O germen bipolar foi encontrado em numero consideravel nas cavidades serosas e no sangue do coração, ainda que menos frequentemente do que no material retirado de animaes inoculados intraperitonealmente.

Frccionou-se vigorosamente caldo de cultura do bacillo na pelle raspada ou

escarificada no abdomen de cobayas, mas apenas em um dos casos produziu-se a infecção, havendo a formação de um pequeno abcesso no logar escarificado, sem resultado fatal. Friccionaram-se também porções de culturas na mucosa do nariz, mas não se conseguiu transmittir a infecção por este meio.

Segundo Fritscher um dos melhores característicos differenciaes do bacillo da peste está em que a infecção pode ser produzida em cobayas pela simples fricção de um caldo de cultura deste organismo na pelle raspada do abdomen, ao passo que isso não se dá com os outros bacillos semelhantes.

Coelhos.

O bacillo é muito virulento para coelhos — 0,005 c. c. injectado intravenosamente, mata um coelho adulto dentro de poucas horas, 8 a 10, produzindo todos os característicos de uma septicemia hemorrhagica. Injecções de 0,01 c. c. são tão rapidamente fataes como as subcutaneas de 0,1 c. c. Os bacillos são sempre encontrados no sangue do coração.

Ratos brancos.

Os ratos brancos são muito menos susceptiveis ao bacillo. 0,1 c. c. de um caldo de cultura de 24 horas, inoculado intraperitonealmente em um rato branco novo (dose sufficiente para matar vinte cobayas) produz apenas symptomas brandos da molestia. Meio c. c. de um caldo de cultura de 24 horas, inoculado subcutaneamente, não produz resultado fatal, apesar de formar um abcesso local.

Pombos.

Um dos typos do bacillo é pathogenico para pombos. Meio c. c. de

um caldo de cultura de 24 horas, inoculado intramuscularmente, produz a morte em poucas horas. O exame do sangue do coração da ave revela a presença de um grande numero de bacillos bipolares. Este é outro característico valioso, porque o bacillo da peste nunca é pathogenico para pombos, porém não prova que o germen pertença ao grupo dos pasteurellas de aves, porque alguns dos outros membros do grupo causam infecção fatal aos pombos.

Toxina.

Inoculou-se o organismo em 250 c. c. de caldo simples, ao qual haviam sido adicionadas algumas gottas de sangue de coelho e conservou-se o frasco á temperatura da sala, durante cinco semanas. No fim desse tempo o caldo foi passado atravez um filtro de Berkefeld e o filtrado foi examinado, provando-se que elle era esteril. Dois ou tres c. c. deste filtrado continham toxina sufficiente para matar uma cobaya em 24 horas, quando inoculados intraperitonealmente. Esta produção de toxina não é uma característica differencial, porque não só o bacillo da peste, como qualquer outro membro do grupo da septicemia hemorrhagica, produz toxinas soluveis.

Sêro anti-pestoso.

Misturaram-se pequenas quantidades (0,5 c. c.) de uma cultura de 24 horas, com 2 c. c. de sêro anti-pestoso e a mistura foi injectada intraperitonealmente numa cobaya. Injectou-se em um animal-testemunha apenas uma quantidade igual da cultura de 24 horas. Ambos os animaes morreram dentro de 18 a 20 horas. Esta é uma prova addicional de que o germen em questão não é o bacillo da peste, pois

o sôro antipestoso sempre confere um certo grau de imunidade.

Agglutinação.

Inocularam-se animaes primeiramente com culturas mortas e, subseqüentemente, com culturas vivas do germen. Foi muito difficil produzir a immunidadade e varios animaes foram sacrificados antes que se conseguisse obter um sôro que agglutinasse o typo especifico.

Deu-se a agglutinação do typo especifico em uma diluição de 1/10 a 1/20, mas não se conseguiu a agglutinação pelo cruzamento de varios typos. Sôro anti-pestoso de alta titulação immunizante, obtido dos laboratorios de Butantan, não agglutinou nenhum dos typos.

Discussão.

Seis ou sete cobayas morreram de peritonite consequente á inoculação com rins de ratos de apparencia normal e todos capturados no mesmo local. Nos tecidos dessas cobayas foram observados tres typos distinctos de bacillos semelhantes ao da peste. Os tres typos foram considerados praticamente identicos quanto aos caracteres morphologicos e culturaes e quanto á virulencia para os animaes, se bem que um dos typos seja virulento para os pombos, enquanto outros não o são e que não se obtenha a agglutinação pelo cruzamento dos typos.

Graças ás observações morphologicas, culturaes e á experimentação em animaes, tornou-se evidente que se tratava de um organismo pertencente ao grupo da septicemia hemorrhagica. A

unica prova contraria a essa asserção foi a fermentação apparente da saccharose, talvez devida á dextrose contida na saccharose impura. Comtudo convem não esquecer que o grupo da septicemia hemorrhagica consta de um certo numero de organismos, muito semelhantes quanto aos seus caracteristicos morphologicos e culturaes e que o bacillo da peste é simplesmente membro deste grupo, productur de epidemias da molestia no homem e em ratos. A differenciação entre os varios membros do grupo e o bacillo da peste é em geral apenas de importancia academica, porque só este ultimo é pathogenico para o homem, enquanto os outros germens encontrados são observados em epizotias declaradas em cabras, carneiros, aves, cavallos, porcos, cães, coelhos, etc., conforme o caso.

Tinhamos entretanto de resolver um problema bem differente e profundamente pratico sob o ponto de vista da saude publica. Accidentalmente descobrimos que, em uma cidade grande e apenas 80 kilometros distante de um porto em que havia casos de peste naquella occasião, os ratos albergavam um organismo cuja morphologia era identica a do bacillo da peste. E' evidente que a responsabilidade de provar, rapida e accuradamente, si o organismo era ou não o bacillo da peste pezáva sobre nós, de modo que, si os resultados fossem positivos, pudessem ser tomadas medidas preventivas para evitar uma epidemia repentina da peste. Si pudessemos provar que o germen em questão não era o bacillo da peste, mas sim um dos membros do grupo da septicemia hemorrhagica, estaria resolvida a parte pratica do problema.

Exponhamos as razões que temos para afirmar que este bacillo não é o bacillo da peste

Morphologia.

Nada houve de referencia aos caracteres morphologicos e ás reacções corantes do organismo que fosse incompativel com o bacillo da peste, tendo sido até preenchidos todos os requisitos morphologicos.

Caracteres culturaes. Estalactites.

Todos os membros da septicemia hemorrhagica podem formar estalactites em condições favoraveis, portanto este não é um bom caracter differencial. Não conseguimos obter estalactites caracteristicas, embora depois de cinco semanas de cultura, talvez devido a condições desfavoraveis.

Gelose de Mac Conkey.

O facto do germen não se desenvolver em meio de taurocolato de sodio e vermelho neutro, ainda que negativa, é prova de consideravel importancia differencial, visto o verdadeiro bacillo da peste crescer promptamente nesse meio. A «Indian Plague Commission» considera-o como um valioso indicador differencial. Não obstante, esse item de prova requer confirmação.

Inoculação animal.

E' importante notar-se que todos os ratos submettidos á necroscopia tinham apparencia normal. E' um facto que poucas vezes se ha de dar no caso de serem os germens encontrados, bacillos da peste, se bem que bacillos pestosos de pouca virulencia para ratos já tenham sido descriptos. Visto o germen não ter causado a morte de ratos brancos embora quando inoculados na

dose de 0,5 c. c. de um caldo de cultura de 24 horas, deviamos concluir que, si o germen fosse o bacillo da peste, possuia muito pouca virulencia para os ratos. O quadro pathologico produzido em cobayas pela inoculação intraperitoneal de pequenas quantidades, 0,005 c. c., era caracteristico da peste, mas a inoculação subcutanea de pequena dose, 0,01 c. c. em cobayas causou uma syndrome inteiramente differente do quadro typico commum em cobayas atacadas de peste.

Prova ainda mais frizante resultou das repetidas tentativas de infeccionar cobayas friccionando cultura de 24 horas, não diluida, na pelle raspada do abdomen ou na mucosa do nariz, o que não transmittiu a molestia. Fritsche diz que a verdadeira peste é sempre produzida em cobayas por esse methodo, considerando-o um dos melhores pontos differenciaes na diagnose. Um dos typos provou ser pathogenico para pombos, caracter que não é notado no verdadeiro bacillo da peste.

Portanto, podemos concluir, com razão, que os germens, isolados dos rins de ratos apparentemente normaes de São Paulo, pertencem ao grupo da septicemia hemorrhagica, mas não são bacillos da peste. A que grupo pertenciam, si ao das aves, cavallos, cabras, carneiros, cães ou coelhos, é mais difficil dizer, não sendo impossivel que pertencessem a qualquer delles, visto os ratos terem estado em contacto intimo com todos esses animaes no quintal da Santa Casa. A questão mais importante e que mais nos interessava era si a molestia seria ou não a peste, e conseguimos chegar a uma conclusão quanto a esse ponto.

Bacillo Enteritidis.

Encontramos nos ratos de São Paulo um outro germen cujos caracteres morphologicos se assemelhavam um tanto aos do bacillo da peste. A cobaya, inoculada com os rins do rato N.º 15, morreu de peritonite geral 34 horas depois. O exame microscopico do fluido peritoneal demonstrou uma cultura pura de um germen Gram-negativo e colorindo-se bipolarmente com azul de methyleno. Semeámos tubos de gelose com sangue do coração e collocámos na estufa. Na manhã seguinte a superficie da gelose estava coberta por um inducto humido e esbranquiçado. Este desenvolvimento rapido foi uma característica quasi sufficiente para provar a impossibilidade de ser o germen o bacillo da peste. Estudos subse-

quentes, porém, levaram-nos a classificá-lo como um membro do grupo *B. enteritidis*. Bates encontrou na glandula enfartada de um rato submettido á necroscopia no Canal de Panamá, um germen «em fórma de alfinete de segurança», muito semelhante ao que encontrámos, sendo identificado como pertencente ao grupo do *B. enteritidis* e numerosas epizootias já foram observadas entre ratos e coelhos, devido ao bacillo de Gaertner. Segundo alguns auctores, o bacillo de Gaertner é um habitante normal do intestino do rato. E' um dos germens que é mais facilmente diferenciado do bacillo da peste pelo seu rapido crescimento em qualquer meio, pela motilidade, e pela formação d'um inducto pardo em batata.

Conclusões

1. — Isolaram-se tres typos de bacillos encontrados em ratos aparentemente normaes apanhados em São Paulo, numa occasião em que a cidade estava sob a ameaça da peste bubonica. Por meio de methodos culturaes e de inoculações animaes, provou-se não serem esses germens bacillos da peste mas pertencerem ao grupo *pasteurella*.

2. — A diagnose rapida e segura do bacillo da peste não é sempre um trabalho facil. Nunca nos devemos dar

por satisfeitos com os resultados de um ou dois methodos de differenciação, mas empregar todos os que forem conhecidos.

3. — O *B. enteritidis*, que se assemelha ao *B. pestis* quanto aos caracteres morphologicos e corantes, foi isolado dos rins de um rato aparentemente normal. O processo de differenciação entre o *B. enteritidis* e o *B. pestis* é muito simples.

