

Trabalho do Instituto de Hygiene de S. Paulo

## O VIRUS ISOLADO DOS DOENTES DE FEBRE AMARELLA SILVESTRE DURANTE O ULTIMO SURTO EPIDEMICO VERIFICADO NO ESTADO DE S. PAULO. (\*)

DR. LUCAS DE ASSUMPCÃO

Assistente do Instituto de Hygiene

Ao Instituto de Hygiene foi commettida a incumbencia do isolamento do virus dos casos de febre amarella silvestre em surto epidemico em diversas localidades do Estado, assim como de fazer as provas de protecção indispensavel ao estudo epidemiologico desse mal.

Pelo Director do Instituto fomos incumbidos desse serviço.

\* \* \*

Indiscutivelmente muito têm progredido nestes ultimos annos os conhecimentos sobre a febre amarella.

Graças a descobertas recentes, que permittiram trazer para o laboratorio o estudo do mal amarillico, dilataram-se os nossos conhecimentos sobre essa molestia.

A possibilidade do estudo experimental da febre amarella estava limitada aos seus periodos epidemicos. Não se conhecia o seu agente nem um animal sensível que o pudesse conservar.

No estudo da febre amarella succedem-se factos historicos cada um assignalando novo progresso.

(\*) Trabalho apresentado á Associação Paulista de Medicina (Secção de Hygiene e Medicina Tropical) em 2 de outubro de 1937. Sob o titulo "O virus isolado dos doentes de febre amarella silvestre que ora se observa em S. Paulo", o mesmo trabalho tinha sido apresentado, em nota prévia, á Sociedade de Biologia de S. Paulo, sessão de 8-IV-937.

O primeiro começou em 1900, quando a Comissão da Febre Amarella do Exercito dos Estados Unidos, sobre a direcção do Major Walter Reed, provou que o *Stegomyia Aedes aegypti* era responsavel pela transmissão da febre amarella.

O segundo, em 1927, quando Stokes Bauer e Hudson (1) acharam que certas especies de macacos — *Macacus sinicus* e *Macacus rhesus* eram sensiveis á febre amarella, servindo pra provas experimentaes.

Com esta descoberta iniciou-se nova phase no estudo da febre amarella. Ficou demonstrado ser o agente infeccioso filtravel, atravessando a vela Berkefeld N e poude ser transmittido do homem para o macaco e do macaco para o homem pela inoculação do sangue ou pela picada de mosquitos (*Aedes aegypti*). Esses e muitos outros factos interessantes foram revelados nessa época pelos membros da "West African Yellow Fever Commission of the International Health Division of the Rockefeller Foundation".

Como o terceiro facto historico, ha a descoberta da susceptibilidade do camondongo, feita em 1930, por Max Theiler (2), do "Departemen of Tropical Medicine" da Harvard Medical School".

Verificou Max Theiler que o camondongo branco adulto, não sensivel ao virus da febre amarella quando inoculado no peritoneo ou sob a pelle, mostrava-se sensivel á inoculação intracerebral, morrendo com encephalite. Demonstrou tambem, na mesma occasião, que era possivel fazer uma prova de protecção intracerebral.

Com camondongos muito mais se intensificou o trabalho de laboratorio sobre a febre amarella. Com macacos além dos trabalhos serem muito dispendiosos, ha sempre a difficuldade no seu manuseio, por se tratar de animaes indoceis.

Servem os camondongos não só para o isolamento do virus, como tambem, principalmente pela prova de protecção intraperitoneal, proposta por Sawyer e Lloyd (1931) (3), para os trabalhos epidemiologicos em grande escala.

Como quarto e ultimo facto historico a descripção em 1932, no Valle de Chanaan, Espirito Santo (Brasil) por Soper, Penna, Cardoso, Serafim, Frobisher e Pinheiro (4) de um typo de febre amarella com feição epidemiologica diversa da febre amarella classica transmittida por um vector domiciliario, o *Aedes aegypti*; de uma febre amarella sem o concurso desse vector, independendo do cyclo homem-mosquito-homem, accomettendo de preferencia os individuos no interior das mattas ou em suas proximidades e que denominaram de "febre amarella silvestre", identificada pelas observações clinicas, autopsias, infecção de *M. rhesus*, provas de protecção e isolamento do respectivo virus.

Nestes ultimos annos a Fundação Rockefeller tem constatado uma vasta disseminação da febre amarella silvestre em diversas localidades da America do Sul. No Brasil, a febre amarella silvestre, com diagnóstico feito pelo exame

histo-pathologico do figado, tem sido encontrada principalmente nos seguintes Estados: Amazonas, Bahia, Goyaz, Minas Geraes, S. Paulo, Matto Grosso e Paraná.

Segundo referencias de Adolpho Lutz (1930), esse typo de febre amarella já se teria verificado em 1898, em um agrupamento de indios no Rio Verde, e em Funil, nas proximidades de Campinas, entre trabalhadores occupados na derrubada da matta, onde verificou a ausencia de *Aedes aegypti*.

Nem todos entre nós estão de accordo na existencia da febre amarella silvestre. Ha os que a negam, mesmo no conhecimento das provas experimentaes de laboratorio, julgando-as puro "artificialismo de experimentação". Para estes, a febre amarella silvestre não pode ser febre amarella, mas sim uma doença nova á qual se lhe dará nome proprio.

Neste trabalho iniciamos o estudo do virus que isolamos dos sangues que nos enviaram de casos tidos como de febre amarella silvestre. Vamos apenas registrar os factos por nós observados na parte que se refere ao isolamento e identificação do agente causador dessa doença, agente que alguns affirmam ainda não estar descoberto, apesar dos estudos nesse sentido já feitos pela Fundação Rockefeller.

## ISOLAMENTO DE VIRUS

Até 1925 era geralmente acceito ser o *Leptospira icteroides* o agente causador da febre amarella.

Com a descoberta da susceptibilidade dos macacos ao virus dessa molestia e os estudos então feitos nesse sentido com o isolamento do virus, passaram esses animaes a ser empregados para esse fim.

Entre nós Aragão (5) na epidemia occorrida no Rio de Janeiro, em Junho de 1928, aproveitou a oportunidade para confirmar as experiencias anteriormente feitas na Africa por Stokes, Bauer e Hudson. Inoculando sangue de alguns doentes obteve a infecção experimental do *Macaccus rhesus* e tambem de um *Macaccus cynomolgus*, sendo o primeiro entre nós a inocular com successo, sangue virulento nesses animaes.

A sensibilidade do *Macaccus rhesus* ao virus foi ainda aqui confirmada pelos estudos feitos no Rio por A. Marques da Cunha e Julio Muniz; na Bahia por N. C. Davis e A. W. Burke e em S. Paulo por J. Lemos Monteiro.

Empregando-se macacos sensiveis, estes podem contrahir infecção sendo picados por mosquitos infectados, como tambem quando inoculados com emulsões desses mosquitos ou quando injectados por via sub-cutanea ou intra-peritoneal com 2 a 10 cc. de sangue citratado ou não, de um doente.

Desde os trabalhos de Reed, Carrol, Agramonte e Lazear (1900) membros *American Commission*, em Cuba, depois confirmados por innumerous pes-

quizardores, que se conhece o facto dos doentes de febre amarella apresentarem virus no sangue circulante do 1.º ao 3.º dia da doença, sendo nesse periodo que se deve retirar o sangue para isolamento do virus. Este sangue deve ser inoculado immediatamente, podendo tambem ser conservado por alguns dias e mesmo algumas semanas, se mantido num frigo na temperatura de 4 a 8º C. abaixo de 0.

Depois que Max Theiler verificou a sensibilidade do camondongo ao virus da febre amarella quando injectado no cerebro, tornou-se muito mais facil e menos dispendioso o isolamento desse virus.

A technica é simples: inoculação intracerebral de 0,03 cc. de sôro do doente em camundongos previamente etherizados.

Foi a technica que usamos, mesmo porque, no momento, não tinhamos macacos.

A febre amarella experimental no camondongo é diferente da do macaco. No camondongo o virus é neurotropico, sendo as suas principaes lesões as de uma encephalite com inclusões intranucleares das cellulas ganglionares. Ás vezes observa-se sangue no estomago e intestinos. O camondongo morre geralmente apresentando paralyisia das patas posteriores.

Quando o camondongo está paralytico ou moribundo deve ser morto pelo cloroformio. Retira-se então asepticamente o cerebro que é triturado com 6 cc. de agua physiologica e novamente inoculado em outra serie de camundongos, na quantidade de 0,03 cc. dessa emulsão em cada um (injecção intracerebral).

Tanto o virus no macaco como no camondongo poderá ser mantido em passagens continuas de animal em animal, como nas primeiras experiencias sobre febre amarella fizeram Stokes, Bauer, e Hudson passando-o directamente de macaco a macaco.

Depois do trabalho de Sawyer, Lloyd and Kitchen (1929) (6) que indicaram uma technica especial para conservação do virus previamente congelado e em seguida secco no vacuo, os laboratorios que lidam com esse virus assim o conservam. Se a seccagem for bem feita, o virus amarillico poderá ser conservado virulento por mais de um anno, desde que seja mantido em geladeira a 4-6.º C.

## PROTOCOLLOS DO ISOLAMENTO DE VIRUS

Para isolamento de virus recebemos 12 sangues, retirados em venula, de doentes clinicamente suspeitos de febre amarella silvestre do interior do Estado de S. Paulo. As venulas vinham dentro de uma garrafa thermos com gelo. Os sôros eram separados e geralmente centrifugados antes de serem inoculados.

*Doente n.º 1* — S. D., com 30 annos de idade, Marilia (Pompeia). Sangue retirado no 2.º dia da doença e recebido em 15-XII-937. O sôro foi inoculado em uma serie de 5 camundongos no dia seguinte de manhã.

No segundo dia um camondongo foi encontrado morto; todos os outros sobreviveram até o fim da observação que geralmente é feita durante 30 dias.

Quando um camondongo morre antes do 4.º dia essa morte não é attribuída á infecção amarillica, facto assignalado primeiramente por Theiler e depois confirmado por outros experimentadores.

Esse caso foi, portanto, negativo na pesquisa de virus.

Após restabelecimento desse doente recebemos sangue para prova de protecção. O resultado foi negativo, morrendo todos os cinco camondongos, com que foi feita a prova (0/5). Esta prova faz parte da primeira serie (Serie 1) de provas de protecção que fizemos e cujos resultados foram enviados ao "Serviço especial de defesa contra a febre amarella" do Serviço Sanitario do Estado.

Este caso, portanto, não foi de febre amarella.

*Doente n.º 2* — P. B., com 35 annos de idade. Jundiahy (Rocinha). Adoeceu no dia 9 de Fevereiro de 1937, sendo retirado o sangue no dia 11. Nesse mesmo dia o sôro desse doente foi inoculado em 8 camondongos. Damos a seguir a ficha com os resultados.

Doente n.º 2	11		13		15		17		19		21		23		25		27		29		31		
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Grupo de camondongos n.º 4	1			+																			
	2								d <sup>†</sup>														
	3								d	d	+												
	4								/	d	+												
	5								/	d	d <sup>†</sup>												
	6									d	d	d	+										
	7									d	d	d	m	+									
	8									/	d	m	+										
Nome: P. B                      Localidade: Rocinha																							
Data da inoculação: 11-II-1937																							

Signaes: / suspeito de doente  
 d doente  
 m moribundo  
 + morto  
 † sacrificado para passagem

Na ficha acima verifica-se que um camondongo amanheceu morto no 3.º dia, morte precoce, geralmente accidental.

Os camondongos começaram a ficar doentes no 8.º dia, em que se observam dois doentes e um suspeito, permanecendo os outros em bom estado. O camondongo n.º 2, assignalado na ficha com signal especial, foi sacrificado e o cerebro inoculado em outra serie de camondongos. No 9.º dia já existiam cinco camondongos doentes; no 10.º, dois mortos, tres doentes e um suspeito, sendo o camondongo n.º 5 tambem sacrificado para nova passagem do virus; no 11.º,

todos os tres camondongos restantes estavam doentes; no 12.º, um morto e dois moribundos. Os dois ultimos dos oito inoculados morreram no 13.º dia.

Os camondongos mortos foram autopsiados, nenhuma lesão macroscopica tendo sido encontrada. O esfregaço dos seus órgãos, assim como as sementes feitas em diversos meios aerobios e anaerobios não só dos órgãos como do sangue do coração, nada revelaram.

Nas passagens feitas com o cerebro as emulsões foram sempre sementes, nada tendo nascido nos meios.

Como se vê na ficha, o periodo de incubação da infecção foi de oito dias, quando appareceram doentes os primeiros camondongos. Do 10.º ao 13.º dia morreram todos os que não foram sacrificados. Nas duas passagens feitas, os camondongos apresentaram a mesma encephalite, sendo continuada a serie. Actualmente estamos na 42.ª passagem dessa fonte de virus.

Após tres passagens fizemos a primeira seccagem desse virus, em 11-II-937. No dia 27 do mesmo mez abrimos o primeiro tubo e inoculamos uma serie de camondongos, todos tendo morrido do 8.º ao 12.º dia.

Tratando-se do primeiro virus que isolamos, com elle fizemos varias provas, inoculando-o sob a pelle e no peritoneo em alguns grupos de camondongos, não se mostrando elle pathogenico por essas vias.

Com o fim de verificar se elle se comportaria como o virus amarillico neurotropico, isolado em Dakar, conhecido com o nome de "raça franceza" com a qual são feitas actualmente as provas de protecção, tomamos um grupo de seis camondongos adultos (18-20 grs.) e inoculamos no cerebro de cada um 0,03 cc. de uma solução de amido a 2% em agua physiologica, e, em seguida, no peritoneo, 0,6 cc. de uma mistura de 1,5 cc. de emulsão de cerebro de um camondongo doente (3.ª passagem) e 3 cc. de um sôro normal negativo em prova de protecção. Fizemos para contrôlo a mesma experiencia com o mesmo sôro empregando cerebro de um camondongo doente tendo sido inoculado com o virus neurotropico (F 503). Os cinco camandongos deste grupo morreram do 5.º ao 7.º dia; na prova feita com o virus do doente n.º 2, que estamos estudando, não morreu nenhum dos cinco inoculados. Fizemos, portanto, duas provas pela technica que se faz a prova de protecção intraperitoneal de Sawyer e Lloyd não sendo identicos os resultados por estar apenas na 3.ª passagem o virus do doente n.º 2; ao passo que o virus da raça franceza estando com 503 passagens intracerebraes é fortemente neurotropico.

Quando estava na 16.ª passagem, fizemos nova e identica prova tendo morrido igualmente os camondongos em que ella foi feita com o virus da febre amarella F 503, como com o virus do doente 2, querendo isto dizer que se tinha exaltado o neurotropismo do nosso virus, já o permittindo, injectado no peritoneo, dirigir-se e fixar-se no cerebro previamente irritado pela solução de gomma, o que se não dera quando em 3.ª passagem.

Quando este virus attingio á 31.<sup>a</sup> passagem, procuramos verificar como elle se comportaria em uma prova de protecção com um sôro amarillico immune. As fichas abaixo resumem as provas que foram feitas com sôros immune e normal, uma com o virus do doente 2 e outra com o virus neurotropico da febre amarella, F. 503.

Prova de protecção intra-peritoneal

Grupo de camundongos 218	10		12		14		16		18		20		22		24	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1							d	+								
2							d	d	+							
Sôro normal (N.P.110) <sup>1</sup>	3						d	d	m	+						
	4						/	/	m	m	+					
Data: 10-VIII-937	5						/	m	m	+						

Fonte de virus: Doente 2 (31.<sup>a</sup> passagem)

<sup>1</sup>(N.P.110) Sôro normal negativo (febre amarella) fornecido pela Fundação Rockefeller

Prova de protecção intra-peritoneal

Grupo de camundongos 219	10		12		14		16		18		20		22		24	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1																
2																
Sôro immune positivo <sup>1</sup> (I.P. 113)	3															
	4															
Data: 10-VIII-937	5															

Fonte de virus: Doente 2 (31.<sup>a</sup> passagem)

<sup>1</sup>(I.P.113) Sôro immune (febre amarella) fornecido pela Fundação Rockefeller

Prova de protecção intra-peritoneal

Grupo de camundongos 220	10		12		14		16		18		20		22		24	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1					/	+										
2					/	d	+									
Sôro normal (N.P.110) <sup>1</sup>	3					d	m	+								
	4					d	m	+								
Data: 10-VIII-937	5					/	d	m	+							

Fonte de virus: F 503 (virus africano)

<sup>1</sup>(N.P.110) Sôro normal negativo (febre amarella) fornecido pela Fundação Rockefeller

<u>Prova de protecção intra-peritoneal</u>															
	10	12	14	16	18	20	22	24							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo de camundongos 221															
Sôro immune positivo* (I.P. 113)															
Data: 10-VIII-937															
Fonte de virus: F 503 (virus africano)															

\* (I.P. 113) Sôro immune (febre amarella) fornecido pela Fundação Rockefeller

As fichas acima são bastante elucidativas. O virus por nós isolado de um caso de febre amarella sylvestre foi neutralizado em uma prova de protecção intraperitoneal por um sôro immune amarillico de maneira identica ao virus neurotropico da febre amarella F. 503.

Do doente P. B., n.º 2, após restabelecimento, foi-nos enviado sangue para prova de protecção, tendo dado resultado positivo (5/5) como consta da 2.ª serie de provas por nós feitas e enviadas ao "Serviço especial de defesa contra a febre amarella".

Com um sôro immune (negativo antes e positivo após vaccinação) de uma das pessoas vaccinadas contra a febre amarella com o virus africano fizemos outra prova de protecção com o virus do doente 2, sendo este neutralizado, resultando a prova positiva.

Portanto: o sôro do doente 2, que tivera febre amarella sylvestre, neutralizou, em uma prova de protecção intraperitoneal, o virus africano da febre amarella; de outro lado, o virus isolado do doente 2 foi neutralizado pelo sôro de um vaccinado com o virus africano da febre amarella.

*Doente n.º 3* — D. M. Com 24 annos de idade. Fazenda Sampaio — Jun-diahy (Rocinha). Adoeceu 16-II-937. O sangue foi retirado no dia 18. Com o sôro desse doente inoculamos apenas dois camundongos, nenhum tendo ficado doente até o fim da observação.

D. M. teve alta em 21-II-1937.

*Doente n.º 4* — A. Q. O. Com 59 annos de idade. Sitio Guarapyranga — Parnahyba. Adoeceu 17-II-1937 e teve alta 25-II-937. O sangue foi retirado no dia 19 e nesse mesmo dia inoculado em 10 camundongos (Grupo 11).

No 9.º dia apresentarem-se dois camundongos suspeitos; no 10.º, quatro doentes; no 11.º, quatro doentes e quatro suspeitos; no 12.º, um morto, seis doen-

tes e tres suspeitos; no 13.º, sete doentes e um suspeito; no 14.º, dois mortos, um moribundo e um doente; no 15.º, um morto e um doente; no 16.º, um morto ficando um vivo até o 30.º dia, ultimo da nossa observação. Foram sacrificados camundongos doentes para passagens no 12.º e 13.º dias.

Doente n.º 4		49	21	23	25	27	1	3	5	7	9	11										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo de camundongos n.º 11	1								/	d	d	+										
	2								/	d	d	d*										
	3									d	d	d	d*									
	4									d	d	d	d*									
	5									/	d	d*										
	6									/	d	d	+									
	7									/	d	d	+									
	8									/	/	d	m	+								
	9									/	d	d	d	+								
	10									/	/											
Nome: A. P. O. Localidade: Parnahyba																						
Data da inoculação: 19-II-937																						

Praticamente o resultado da inoculação do sôro deste doente foi identico ao do doente n.º 2. Houve apenas um periodo de incubação de mais dois dias, tendo tambem morrido os camundongos após dois a quatro dias de doença.

Este virus não foi conservado, nem continuamos estudos sobre elle.

A. Q. O. teve alta no dia 25-II-1937.

Doente n.º 5 — A. M., com 28 annos de idade. Presidente Wenceslau. Sangue retirado na dia 21-II-1937, no 3.º dia da doença. Recebido no dia 23 e inoculado no mesmo dia.

Doente n.º 5		23	25	27	1	3	5	7	9	11	13	15										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Grupo de camundongos n.º 19	1										/	d	d	m	+							
	2																				d	+
	3																				d	+
	4																					
Nome: A. M. Localidade: Presidente Wenceslau																						
Data da inoculação: 23-II-937																						

Foram inoculados 4 camundongos, mas todos de 25 a 30 grammas de peso e com 7 mezes.

Dos quatro inoculados, um nada apresentou até o ultimo dia de observação, tendo morrido os outros tres, um no 18.º dia e dois no 19.º. Não fizemos passagens desses camundongos. É possivel que elles só se apresentassem tão tar-



Esta fonte de virus foi secca para conservação quando estava na 3.<sup>a</sup> passagem, em 3-IV-1937. No dia 28-V-1937 abrimos um tubo passando o virus para uma serie de camondongos.

Quando doentes sacrificamos um, cujo cerebro foi inoculado em *Macacus rhesus* pelo Dr. Paulo de Azevedo Antunes, com quem estamos fazendo a segunda parte deste trabalho; os outros camondongos morreram.

O doente P. A. n.º 8, de quem isolamos este virus teve alta em 25-III-1937.

*Doente n.º 9* — S. L., com 10 annos de idade. Mogy-Mirim. O sôro deste doente foi retirado e inoculado no dia 11-III-1937 em um grupo de 8 camondongos, sobrevivendo todos. O doente falleceu no dia 12-III-1937 e o exame histo-pathologico do figado foi negativo segundo as informações que recebemos do "Serviço especial de defesa contra a febre amarella".

*Doente n.º 10* — E. S., com 19 annos de idade. Municipio de Salto. Adoeceu no dia 15-III-1937, sendo retirado o sangue no dia 17 e inoculado no dia seguinte em um grupo de 4 camondongos (Grupo 43):

Doente n.º 10	18	20	22	24	26	28	30	1	3	5	7										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1										/	d	+									
2										/	d	d#									
3											d	d	d	+							
4										/	/										
Nome E 5                      Localidade: Salto																					
Data da inoculação: 18-III-937																					

No 10.<sup>o</sup> dia apresentaram-se 3 camondongos doentes e um suspeito; no 11.<sup>o</sup>, um morto, dois doentes e um suspeito, sendo um dos doentes sacrificado para passagem; no 12.<sup>o</sup>, um doente, nada apresentando o outro camondongo; no dia 13, um morto, conservando-se um vivo até o fim da observação.

Fizemos 2.<sup>a</sup> passagem em um grupo de seis camondongos (Grupo 54), tendo todos ficado doentes no 7.<sup>o</sup> dia. Sacrificamos seis para seccagem do virus no dia 5-IV-1937. No dia 2-VI-1937 abrimos um tubo passando o virus em um grupo de camondongos. Destes, um, quando doente, foi sacrificado e o cerebro inoculado no peritoneo de um macaco rhesus pelo Dr. Paulo de Azevedo Antunes; os outros morreram.

E. S. teve alta em 27-III-1937.

*Doente n.º 11* — A. R., com 12 annos de idade. Jundiahy (Rocinha). Adoeceu em 28-III-1937. O sangue foi retirado em 29-III-1937. No dia 3 de Abril inoculamos 5 camondongos (Grupo 56).

Doente n.º 11	3		5		7		9		11		13		15		17		19		21		23	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1							/	d	d	+												
2							/	d	d	+												
3							/	d	d	+												
4							/	d	d	+												
5							/	d	d	m	+											
Nome: A.D. Localidade: Rocinha																						
Data da inoculação: 3-IV-937																						

Do 9.º ao 12.º dia morreram todos os camondongos como se vê na ficha tendo sido sacrificado o de n.º 3 para passagem.

Na segunda passagem também morreram todos os camondongos, mas não conservamos essa fonte de virus.

A. R. teve alta no dia 1-IV-1937.

*Doente n.º 12* — P. I. R., com 42 annos de idade. Varzea dos Souzas — Parnahyba. Adoeceu dia 2-IV-1937. O sangue foi retirado no dia 3 e inoculado no mesmo dia em sua serie de cinco camondongos (Grupo 60).

Doente n.º 12	3		5		7		9		11		13		15		17		19		21		23	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1							/	d	d	+												
2							/	d	d	d	+											
3							/	d	d	d	+											
4							/	d	d	d	+											
5							/	/	d	+												
Nome: P. I. R. Localidade: Parnahyba																						
Data da inoculação: 3-IV-937																						

Os camondongos inoculados com o sôro desse doente apresentaram-se quasi todos no 7.º dia com o pelo eriçado, sendo assignalados na ficha quatro como suspeitos; no 8.º dia quatro estavam doentes e um suspeito; no 9.º dia, continuaram quatro doentes e um suspeito; no 10.º, existia um morto e quatro doentes, sendo estes sacrificados para seccagem e conservação do virus.

P. I. R. falleceu no dia 6-IV-1937.

O exame histo-pathologico do figado deste doente foi positivo, revelando o quadro da febre amarella.

## DISCUSSÃO

Pelo "Serviço especial de defesa contra a febre amarella" do Serviço Sanitario do Estado, nos foram enviados 12 sangues, todos retirados de doentes clini-

camente suspeitos de febre amarella silvestre, de zonas em surto epidemico desse mal, sendo os sôros retirados nos tres primeiros dias da doença.

Todos esses sangues foram conservados em garrafas thermos cheias de gelo, até serem os sôros inoculados no cerebro de camondongos, na dose de 0,03 cc.

Esses sôros ao mesmo tempo que inoculados em camondongos, foram tambem semeados em diversos meios aerobios e anaerobios, não revelando nestes meios vegetação alguma.

Desses 12 sôros 7 mostraram-se pathogenicos para os camondongos inoculados no cerebro: os dos doentes n.ºs 2, 4, 5, 8, 10, 11 e 12. Após um periodo de incubação de 6 a 13 dias os camondongos apresentaram-se primeiramente com o pello eriçado e perda de actividade, recusando a alimentação. No dia seguinte uns moviam-se difficilmente, outros já apresentavam paralyisia das pernas posteriores: estes morriam no mesmo dia ou no seguinte; aquelles, podiam ainda permanecer mais um ou dois dias doentes para morrer com ou sem paralyisia. Quadro identico, embora com menor periodo de incubação, apresentavam os camondongos inoculados com a raça neurotropica do virus la febre amarella, F. 503, que temos em nosso laboratorio.

Dos camondongos doentes, principalmente quando paralyticos, fizemos passagem do cerebro para outros camondongos, reproduzindo a encephalite. Esse material antes de inoculado era semeado em meios de cultura, nada vegetando.

A impressão que tivemos era a de se tratar de um virus comportando-se no camondongo de maneira identica ao da febre amarella.

Pelo processo de Sawyer, Lloyd e Kitchen seccamos as fontes desse virus isoladas dos doentes n.ºs 2, 8, 10 e 12. Estas fontes estão sendo conservadas em "frigidaire".

Temos aberto mensalmente um tubo de cada um desses virus, passando-os em series de camondongos, reproduzindo-se a molestia observada quando na inoculação do sôro dos doentes.

Pelo methodo de seccagem que seguimos, o material que vae ser secco é previamente filtrado em vela Berkefeld N; portanto, as nossas quatro fontes de virus são filtraveis nessa vela, como o virus da febre amarella; e tambem verificamos a filtrabilidade desse virus em Seitz, empregando como diluente ascite pura.

A filtrabilidade do virus da febre amarella quando presente no sangue humano, já tinha sido assignalada por diversos pesquisadores: Reed, Carrol, Agramonte e Lazear (1900-01); Marchoux, Salimbeni e Simond (1903); Rosenau, Parker, Francis e Bayer (1905). Mas foi desde os trabalhos de Stokes, Bauer e Hudson (1928) que a filtrabilidade do virus da febre amarella poude

ser bem estudada, tendo elles verificado a filtrabilidade em Berkefeld e em Seitz do virus no sangue de macacos infectados.

Estudos no mesmo sentido foram continuados principalmente por Bauer e Mahaffy (1930), (7) com a raça "Asibi", que verificaram ser o virus, tanto no sangue de macacos, como o de mosquitos infectados, filtraveis em vela Berkefeld N, V e W como tambem em Chamberland L 11; e ainda que o virus morre rapidamente quando suspenso em solução physiologica ou agua distillada, sendo a acção prejudicial desses diluentes muito diminuida quando a elles se acrescenta 10% ou mais de sôro normal de rhesus.

Bauer (1931) (8) recommendou tambem, como diluente, liquido de hydrocele humana, de pessoas não immunes á febre amarella, servindo puro ou diluido em partes iguaes com agua physiologica. Ainda nas mesmas condições tem sido usado sôro humano e ascite.

Temos experimentado como diluente, com bons resultados, na falta de sôro, a ascite pura, nas filtrações tanto da raça neurotropica como do virus por nós isolado de doentes de febre amarella silvestre.

Dos 12 doentes cujos sangues nos foram enviados, 4 morreram: n.ºs 5, 6, 9 e 12. Com o sangue do doente n.º 9 não isolamos virus e o exame histo-pathologico do figado foi negativo. Do doente n.º 5 constatamos virus, mas não o conservamos; tendo sido positivo o exame histo-pathologico do figado. Dos cinco camondongos inoculados com o sôro do doente n.º 6 apenas um ficou doente no 15.º dia, morrendo no 22.º dia sem que fizessemos passagem; mas este caso foi positivo no exame histo-pathologico do figado. Do doente n.º 12 isolamos virus, conservando-o; sendo positivo o exame histo-pathologico do figado, que apresentou o quadro da febre amarella.

Dos doentes n.ºs 2, 4, 8, 10 e 11, que tiveram alta, isolamos tambem virus, mas só conservamos tres para estudo, após seccagem, n.ºs 2, 8 e 10.

O comportamento em camondongo do virus que isolamos é identico ao assignalado por Theiler no seu trabalho original em que inoculou material de *Macacus Rhesus* infectado com a "raça francesa" do virus da febre amarella. Theiler observou que na primeira inoculação desse material o periodo de incubação foi de 8 a 30 dias, geralmente 8 a 12, sendo que nas primeiras passagens a virulencia exaltava-se rapidamente e já na 5.ª os camondongos ficavam doentes no 6.º ou 7.º dia, morrendo do 7.º ao 8.º.

Os camondongos inoculados pela primeira vez com os sôros que estudamos apresentaram identico periodo de incubação, e, após cinco passagens, esse periodo encurtou-se rapidamente com o augmento da virulencia. Em geral na 5.ª passagem já os camondongos morriam todos do 6.º ao 9.º dia.

Segundo Theiler o camondongo morto pelo virus da febre amarella não apresenta na autopsia lesões macroscopicas para o diagnostico. O unico meio seguro é o exame do cerebro, em cujos cortes o exame histo-pathologicos revela a existencia de encephalite e mudanças nucleares nas cellulas ganglionares.

Entregámos ao Dr. Walter Maffei alguns cerebros para estudo nesse sentido.

Quando este trabalho foi apresentado em nota previa, estavamos ainda com os nossos virus nas primeiras passagens, tendo nessa occasião verificado que em 3.<sup>a</sup> passagem o virus inoculado no peritoneo com sôro normal não se dirigia para o cerebro previamente irritado com injeccão da solução de amido, sobrevivendo os camondongos. Na repetição da mesma prova com esse virus na 16.<sup>a</sup> passagem, morreram todos os camondongos, como vimos atraz, graças ao seu neurotropismo exaltado; e, em uma prova de protecção feita com um sôro amarellico immune e um sôro normal, com o nosso virus em 31.<sup>a</sup> passagem e o virus neurotropico da febre amarella F. 503, os resultados foram identicos, sendo esses virus igualmente neutralisados pelo sôro imune, morrendo todos os testemunhas com sôro normal.

Ainda outras provas foram feitas demonstrando que tanto o virus africano, como o isolado por nós de doentes de febre amarella silvestre, são neutralisados igualmente tanto pelo sôro immune de pessoas que tiveram febre amarella silvestre, como pelo sôro immune de vaccinados pelo virus africano, indicando a existencia de neutralisação cruzada entre esses virus.

## RESUMO E CONCLUSÕES

O A. inicia o seu trabalho referindo-se ao grande progresso nestes ultimos annos dos estudos sobre a febre amarella, que estavam limitados aos seus periodos epidemicos por não haver meio algum capaz de conservar o virus.

A descoberta da sensibilidade do *Macacus rhesus* á febre amarella e mais recentemente do camondongo em inoculaçãc intracerebral, como tambem a possibilidade da conservação do virus em estado secco, permittiram trazer para o laboratorio o estudo do mal amarillico, o que concorreu para o grande desenvolvimento da sua parte experimental.

Commenta os principaes factos historicos por que tem passado o estudo da febre amarella, e que recentemente ella se apresenta em alguns lugares sob uma nova forma, geralmente no interior das mattas ou em suas proximidades, sem o concurso do *Aedes acgypti*, differente, portanto, da febre amarella urbana e mesmo rural transmittida por esse *Stegomyia* independendo do classico cyclo homem-mosquito-homem, sendo a intecção extra domiciliaria.

Passa em seguida a estudar os processos de isolamento e identificação do virus da febre amarella.

Cita as suas experiencias nesse sentido com os sangues enviados para o A. pelo «Serviço especial de defesa contra a febre amarella» do Serviço Sanitario do Estado, mostrando e discutindo todos os protocollos.

Dos 12 sangues recebidos, todos provenientes de doentes clinicamente suspeitos de febre amarella silvestre, das zonas em surto epidemico, 7 mostraram-se pathogenicos para camundongos na inoculação intracerebral dos respectivos sôros.

Dos camundongos doentes, principalmente quando paralyticos, o A. fez passagem do cerebro para outros camundongos, reproduzindo a encephalite. Esse material era antes seamedo em meios de cultura, nada vegetando.

Pelo processo de SAWYER, LLOYD e KITCHEN o A. seccou e conserva as fontes isoladas dos doentes ns. 2, 8, 10 e 12, e tem aberto todos os mezes um tubo de cada uma passando-as em séries de camundongos, reproduzindo a molestia observada na inoculação do sôro dos doentes.

Dos 12 doentes cujos sangues o A. recebeu, morreram os assignalados com os ns. 5, 6, 9 e 12. Do sangue do doente n.º 9 o A. não isolou virus, sendo negativo o exame hsto-pathologico do figado. Constatou a presenca do virus no sangue do doente n.º 5 do qual o exame hsto-pathologico do figado foi positivo. Isolou ainda virus do doente n.º 12, conserando-o em estado secco, tendo sido positivo o exame hsto-pathologico do figado.

Dos doentes ns. 2, 4, 8 e 10, que não morreram, o A. isolou virus, mas só conserva tres, após seccagem, para estudo (ns. 2, 8 e 10).

O virus isolado do doente n.º 2 já se encontra em 42.<sup>a</sup> passagem.

O virus isolado pelo A. é filtravel em vela Berkefeld N e em Seitz, tendo sido feita a filtração com sôro humano normal e com ascite em 100% desses diluentes.

No camundongo, o comportamento do virus isolado pelo A. é identico ao do virus neurotropico da febre amarella, nas provas apresentadas.

Em prova de protecção intra-peritonial o sôro amarillico immune neutralisa em igualdade de condições o virus isolado pelo A. de um caso de febre amarella silvestre (31.<sup>a</sup> passagem) e o virus neurotropico da febre amarella isolado por SELLARDS em Dakar, ou «raça franceza» (F 503).

Foram feitas tambem provas que demonstraram a existencia de immuidade cruzada entre o virus isolado pelo A. de doentes de febre amarella silvestre e o virus africano da febre amarella.

Além das outras provas apresentadas, o facto da existencia de immuidade cruzada entre esses dois virus é de grande importancia para que se possa admittir a sua identidade.

O resultado da inoculação em *Macacus rhesus* do virus isolado pelo A. será apresentado em outro trabalho.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

The author refers to the great progress made, these last years, in the investigations on yellow fever, formerly limited to epidemic periods, since there was no known way of conserving the virus.

The discovery of the susceptibility of *Macacus rhesus* to yellow fever, and, more recently, that of mice to intracerebral inoculation, as also the possibility of conservation of

the dried virus have made possible the laboratory investigation of yellow fever, thus contributing greatly to the development of the experimental researches on the same.

The A. reviews the principal historical facts in the study of yellow fever, and describes how it has appeared, recently, under a new form, usually in the middle of woods, or in their near proximity, without the agency of *Aedes aegypti*, thus differing from urban or even rural yellow fever transmitted by means of this *Stegomyia*, independently of the classic cycle: man-mosquito-man, through extra domiciliary infection.

The methods of isolation and identification of the yellow fever virus are reviewed.

The experiences made with the blood specimens sent by the «Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarella» are recorded and the reports on the cases are commented upon

From 12 blood specimens, of clinically suspected cases of yellow fever, from a region where the disease was epidemic, 7 were pathogenic for mice, when the serum was injected intracerebrally.

From sick mice, especially when paralytic, a transfer was made into other mice, producing an encephalitis. This material was formerly inoculated into various culture media, but no culture was observed.

The virus obtained from patients ns. 2, 8, 10 and 12 has been dried and is kept according to the method of *Sawyer, Lloyd and Kitchen*. One tube of each is opened every month and inoculated into a series of mice, producing the disease observed after inoculation with the blood of the patients.

From the 12 patients whose blood was received, ns. 5, 6, 9 and 12 died. No virus was isolated from the blood of patient n. 9, and the histo-pathological examination of the liver of the same was negative. Virus was isolated from n. 5, in which the histo-pathological examination of the liver was positive. Virus was isolated also in n. 12, and is kept under a dry form, while the histo-pathological examination of the liver was positive.

Patients ns. 2, 4, 8 and 10 are alive. From these, virus was isolated, but only three were kept after drying, for further investigations (ns. 2, 8, 10).

The virus isolated from n. 2 has been up to date re-inoculated 42 times.

The virus isolated is filtrable through Berkefeld N and Seitz filters. Normal human serum and ascitic fluid 100%, were used for this filtration.

The behaviour of the virus isolated is similar, to that of the neurotropic virus of yellow fever.

In intra-peritoneal protection tests, the immune yellow fever serum neutralises equally the virus isolated by the A. from a case of jungle yellow fever (31st transfer) and the neurotropic yellow fever virus isolated by Sellards at Dakar, or «French race» (F 503).

Some tests were made to demonstrate the existence of crossed immunity between the virus isolated by the A. from patients suffering from jungle yellow fever and the African virus of yellow fever.

Besides the other proofs reported, the fact of cross immunity between these two virus is of great importance toward establishing its identity.

The result of the inoculation in *Macacus rhesus* of the virus isolated by the A. will be reported in a later paper.

## BIBLIOGRAPHIA

- 1 — STOKES, A., BAUER, J. H., and HUDSON — 1928 — Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Amer. Jour. Trop. Med.* Vol. VIII.
- 2 — THELLER, M. — 1930 — Studies on the action of yellow fever virus in mice. *An. of Trop. Med. and Par.* Vol. XXIV.
- 3 — SAWYER, W. A., and LLOYD, W. — 1931 — The use of mice in tests of immunity against yellow fever. *The Jour. of Exp. Med.* Vol. LIV.
- 4 — SOPER, F. L., PENNA, H., CARDOSO, E., SERAFIM, J., FROBISHER, M., and PINHEIRO, J. — 1933 — Yellow fever without *Aedes aegypti*. Studi of a Rural Epidemic in the Valle do Chanaan, Espirito Santo, Brasil, 1932. *A Jour. Hyg.* Vol. XVIII.
- 5 — ARAGÃO, H. B. — 1928 — Relatório a respeito de algumas pesquisas sobre a febre amarella. Instituto Oswaldo Cruz. Supplemento das Memorias n.º 2.
- 6 — SAWYER, W. A., LLOYD, W., and KITCHEN, S. F. — 1929 — The preservation of yellow fever virus. *The Jour. of Exp. Med.* Vol. L.
- 7 — BAUER, J. H., and MAHAFFY, A. F. — 1930 — Studies on the filtrability of yellow fever virus. *Amer. Jour. of Hyg.* Vol. XII.
- 8 — BAUER, J. H. — 1931 — Some characteristics of yellow fever virus. *The Amer. Jour. of Trop. Med.* Vol. XI.