MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO DE BUTANTAN

1926

Tomo III - Fasciculo Unico

MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO DE BUTANTAN

1926

Tomo III - Fasciculo Unico



Endereço: SÃO PAULO (Brasil)
Caixa Postal, 65

SUMMARIO

Dr. Emilio Ribas . . . . . Pag. n.° 3

Contrbuição ao estudo dos batrachios, pelos Drs. Vital Brazil e J. Vellard . . . . . " " 7

Notas sobre os Oxyurus parasitos das baratas domesticas, com a descripção de uma nova especie: Oxyurus Australasiae, sp. nov., pelos Drs. Samuel B. Pessôa e Clovis Corrêa. . . " " 71

Immunização "Per os". Estudo sobre as differenças de poder antigenico e immunizante de 4 amostras de B. Shiga, pelos Drs. Paulo Marrey e Eduardo Vaz . . . . . " " 77

Sobre o preparo da vaccina anti-dysenterica "per os", pelo Dr. Eduardo Vaz.. . . . . " " 84

Anatoxina diphterica e seu valor pratico, preparo, poder antigenico, emprego na producção da anti-toxina e na prophylaxia da diphteria, pelo Dr. José Lemos Monteiro. . . . . " " 96

Sensibilidade e immunidade e diphteria; Schick test e Kellogg test, pelo Dr. José Lemos Monteiro. . . . . " " 137

Contribuição ao estudo dos typos de meningococcos encontrados no Brasil, pelo Dr. Lucas de Assumpção. . . . . " " 143

Sobre a acção physiologica do veneno de Sapo. II Veneno do Sapo (Bufo marinus) e secreção urinaria, pelo Dr. Jayme R. Pereira. . . . . " " 171

Sobre a acção physiologica do veneno de Sapo. III Veneno do Sapo (Bufo marinus) e musculo liso, pelo Dr. Jayme R. Pereira . " " 177

Presença do bacteriophago na agua dos rios de São Paulo, pelo Dr. José Lemos Monteiro . . . . . " " 187

A Defeza contra a Mosca, pelo Dr. Vital Brazil. . . . . " " 189

O Sôro Diagnostico da Syphilis pelo methodo actualmente usado no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos, em confronto com a reacção de Wassermann, pelo dr. Lucas de Assumpção " " 205

Contribuição ao estudo do veneno das aranhas, 2.ª Memoria, pelos Drs. Vital Brazil e J. Vellard. . . . . " " 243

Contribuição ao estudo do veneno das glandulas das serpentes Aglyphas, pelos Drs. Vital Brazil e J. Vellard. . . . . " " 301

Contribuição ao estudo das aranhas, novas especies de Argiopidae, pelo Dr. J. Vellard. . . . . " " 327

SOMMAIRE

Dr. Emilio Ribas . . . . . Pag. n.° 3

Contribution a l'étude des batraciens, par les Drs. Vital Brazil et J. Vellard. . . . . " " 7

Notes sur les Oxyures parasites des blattes domestiques, avec la description d'une nouvelle espèce: Oxyurus australasiae, sp. nov., par les Drs. Samuel Pessôa et Clovis Corrêa. . . . " " 71

Immunisation "per os". Etude sur les différences de pouvoir antigènique et immunisant de 4 échantillons de B. Shiga, par les Drs. Paulo Marrey et Eduardo Vaz. . . . . " " 77

Sur la préparation de la vaccine anti-dysentérique "per os", par le Dr. Eduardo Vaz. . . . . " " 84

Anatoxine diphtérique et sa valeur pratique, préparation, pouvoir antigénique, emploi dans la production de l'antitoxine et dans la prophylaxie de la diphtérie, par le Dr. José Lemos Monteiro " " 96

Sensibilité et immunité à la diphtérie; Schick test et Kellogg test, par le Dr. José Lemos Monteiro. . . . . " " 137

Contribution à l'étude des types de méningocoques rencontrés au Brésil, par le Dr. Lucas de Assumpção. . . . . " " 143

Sur l'action physiologique du venin de crapaud. II Venin du crapaud (Bufo marinus) et sécrétion urinaire, par le Dr. Jayme R. Pereira. . . . . " " 171

Sur l'action physiologique du venin de crapaud. III Venin du crapaud (Bufo marinus) et muscle lisse, par le Dr. Jayme R. Pereira. . . . . " " 177

Présence du bactériophage dans l'eau des rivières de São Paulo, par le Dr. José Lemos Monteiro. . . . . " " 187

La défense contre la mouche, par le Dr. Vital Brazil. . . . . " " 189

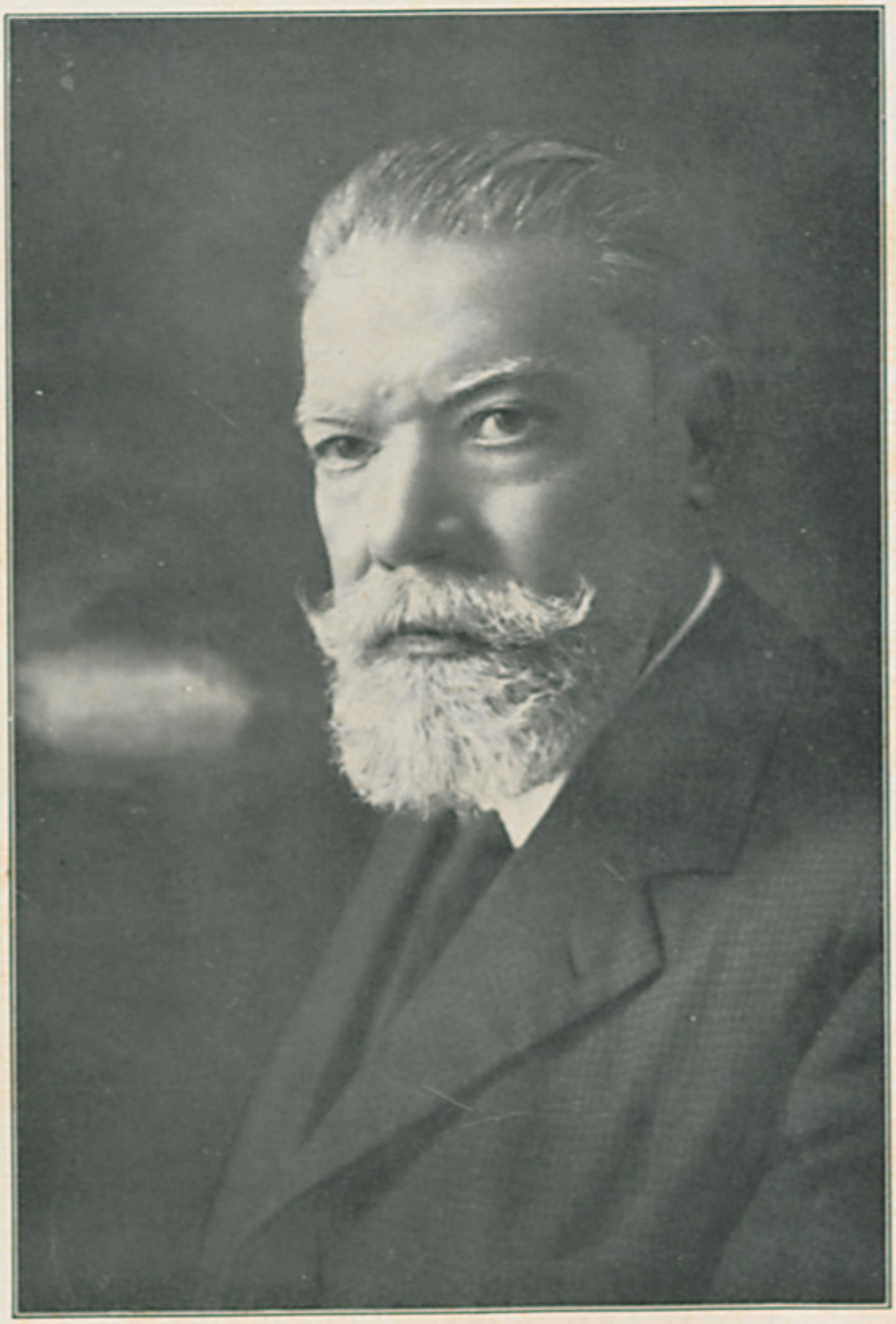
Le Séro-diagnostic de la Syphilis par la méthode actuellement utilisée à l'Institut Pasteur de Paris, avec les serums actifs, comparèe à la rèaction de Wassermann, par le Dr. Lucas de Assumpção. . . . . " " 205

Contribution à l'étude du venin des araignées, 2.éme Memoire, par les Drs. Vital Brazil et J. Vellard. . . . . " " 243

Contribution à l'étude du venin des glandes des serpents aglyphes, par les Drs. Vital Brazil e J. Vellard. . . . . " " 301

Contribution à l'étude des Araignées; nouvelles espèces d'Argiopidae, par le Dr. J. Vellard. . . . . " " 327

HOMENAGEM



DR. EMILIO RIBAS

EX-DIRECTOR GERAL DO SERVIÇO SANITARIO DO ESTADO DE SÃO PAULO

* 11 DE ABRIL DE 1862

† 19 DE DEZEMBRO DE 1925

Dr. EMILIO RIBAS

Prestando respeitosa homenagem á memoria do eminente homem de sciencia, que foi a um tempo grande administrador e grande bemfeitor da humanidade, a quem o Instituto deve, ao lado da sua fundação, uma enorme somma de beneficios, a Redacção d'estas "Memorias", transcreve, com a devida venia, o excellente artigo; em que o "Paiz", a proposito do fallecimento do notavel hygienista, põe em relevo a sua personalidade:

—"Sabbado, em S. Paulo, falleceu o Dr. Emilio Ribas, o sa-
"neador do Estado, o fundador do Instituto de Butantan.

"Este simples registro resume a grandeza da vida desse homem
"de sciencia, que foi ao mesmo tempo um realizador de grandes feitos.
"A sua vida foi uma serie de grandes e bellos esforços, heroicos muitas
"vezes, na defesa da saude e da vida de outrem.

"Culto, estudioso, de grande intelligencia, destacara-se 'desde
"moço na Faculdade de Medicina do Rio. Formado em 1887, partiu
"para o interior de S. Paulo, onde clinicou até 95, quando entrou
"para os serviços de Desinfectorio Central, na capital paulista.

"A febre amarella dominava então no Brasil, e no combatel-a
"grangeou o joven medico titulos que o impuzeram de maneira de-
"finitiva ao conceito da classe medica e dos dirigentes do Estado.

"Nas commissões de combate á febre amarella, que desempenhou
"em Pilar, Pirassununga, S. Caetano, Jahu' e Campinas, principal-
"mente nesta ultima cidade, realizou o doutor Ribas trabalhos de
"notavel valia, registrados nos relatorios por elle enviados aos seus
"collegas e que lhe puzeram o nome na maior evidencia, levando-o,
"em 1898, á direcção do serviço sanitario, na vaga aberta pela elei-
"ção senatorial do Dr. Silva Pinto. E durante 19 annos, na di-
"recção desses serviços, prestou o Dr. Emilio Ribas os maiores
"serviços a S. Paulo.

"Duas epidemias, principalmente, devastavam o Estado: a fe-
"bre amarella e a variola. Em 1899, irrompeu a peste bubonica.
"Contra estes flagellos, luctou vigorosa e efficazmente o director
"dos serviços sanitarios, enviando as commissões sanitarias aos
"pontos atacados, fazendo a diffusão da vaccina, já produzida em
"grandes quantidades pelo Instituto Vaccinogenico. A coragem
"pessoal do director dos serviços, o seu enthusiasmo e ardor commu-
"nicaram-se a todos os auxiliares, e a obra realizada foi completa.

"Mas havia deficiencia apreciavel do sôro anti-pestoso,—adqui-
"rido difficilmente no Instituto Pasteur de Paris. Propoz, então,
"o Dr. Ribas a fundação do Instituto Serum-Therapico de Butan-
"tan, confiando a sua direcção a Vital Brazil, que estabelecera o
"diagnostico da peste em Santos, e ahi combateu a molestia. Já
"era conhecido o doutor Vital Brazil, pelos seus trabalhos sobre a
"sôro-therapia anti-ophidica desenvolvidos mais tarde para honra

"de S. Paulo e do Brazil. Mas, ao Dr. Emilio Ribas, o creador "do estabelecimento, cabe a maior honra; a da creação e escolha "do homem que deveria dirigir e desenvolver o novo instituto.

"Armado de elementos para o combate á peste e á variola, fal- "tava-lhe poder luctar da mesma fórma contra a febre amarella. E' "a sua grande campanha, em que demonstrou toda a coragem, e foi "capaz de todos os sacrificios, até o triumpho final.

"Antes de vel-a adoptada francamente pelos norte-americanos, "aceitou o Dr. Emilio Ribas a theoria havaneza da transmissão da "febre amarella pelo "stegomya calopus", e convencido da sua ver- "dade, transformou os processos de combate ao mal, orientando "nesse sentido as commissões sanitarias que partiam para o in- "terior.

"Um mez antes de iniciarem os norte-americanos a sua grande "campanha saneadora de Cuba, espalhava o Dr. Ribas em S. Paulo "os primeiros folhetos, aconselhando o combate ao stegomya trans- "missor da febre amarella.

"Em 1902, em Ribeirão Preto e S. Simão, já os novos proces- "sos de combate foram usados para debellar a febre amarella.

"Como é natural, a nova theoria era ainda discutida, e por isso "o doutor Ribas decidiu repetir em S. Paulo as experiencias dos "medicos cubanos e americanos.

"S. Paulo offerecia condições excepcionaes para essas expe- "riencias, porque a febre amarella não existia na capital, afastando- "se deste modo as suspeitas, de que por terem sido as experiencias "de Havana realizadas na vizinhança de uma cidade secularmente "infectada, pela febre amarella, os doentes inoculados artificial- "mente por mosquitos poderiam já estar com a infecção incubada.

"Vencendo difficuldades de toda a sorte, inclusive o escrupulo "do presidente do Estado, Dr. Bernardino de Campos, que relutava "em consentir que o Dr. Ribas, director do serviço Sanitario e seu "amigo se expusesse em primeiro logar, como pretendia, ás picadas "por mosquitos infectados, conseguiu o illustre scientista, apoiado "pelo Dr. Bento Bueno, secretario do Interior, repetir as experien- "cias de Havana, e fortalecer o seu espirito na convicção de que o "combate á febre amarella devia resumir-se na guerra ao mosquito "e na protecção dos doentes contra as picadas desses insectos. Es- "sas experiencias constaram de duas séries. Na primeira foram "picados o Dr. Emilio Ribas, o Dr. Adolpho Lutz e mais tres pes- "soas, não immunes, por mosquitos creados no Instituto Bacterio- "logico e infectados sugando o sangue de amarellentos em S. Simão "nos dois primeiros dias de molestia.

"Tres doentes tiveram febre, albuminuria e outros symptomas, "deixando convencidos os experimentadores de que tinham produ- "zido uma febre amarella, felizmente benigna e terminando pela "cura. A segunda série consistiu em fazer que pessoas não immu- "nes dormissem, durante dez dias, em camas forradas por colchões, "fronhas, lençóes e cobertores cheios de sangue e productos de eli- "minação de amarellentos, peças de camas com que se tinham cober- "to doentes de febre amarella em Taubaté, e cautelosamente trans- "portados para S. Paulo. Os homens que se prestaram ás expe- "riencias estiveram recolhidos no hospital do Isolamento em quartos

"protegidos contra mosquitos e sob a vigilancia immediata dos me-
"dicos encarregados de acompanharem as experiencias: Drs. Luiz
"Pereira Barreto, Adriano de Barros, Silva Rodrigues, além do pes-
"soal do Hospital. A segunda parte das experiencias foi brilhan-
"te. Nenhum dos homens sentiu o mais pequeno incommodo.

"Se as primeiras experiencias motivaram ainda duvidas de al-
"guns clinicos, isso em nada alterou a convicção do director dos
"serviços sanitarios, que continúou a applicar os novos processos
"e com elles venceu a febre amarella, destruindo os fócos de Tau-
"baté, S. Simão, Ribeirão Preto e Santos.

"A 12 de Outubro de 1903, agradecendo esses notaveis serviços,
"o governo do Estado prestou-lhe uma grande homenagem, offe-
"recendo-lhe em sessão solemne uma medalha de ouro e um diploma
"com os seguintes dizeres:

. "Salus Publica. O Governo do Estado de S. Paulo, tendo em
"consideração o acto humanitario do Snr. Dr. Emilio Marcondes
"Ribas, que se sujeitou espontaneamente a experiencias realizadas
"no Hospital do Isolamento desta capital, no intuito de demonstrar
"a transmissão da febre amarella, pelo stegomya fasciata, confere-
"lhe uma medalha de ouro em testemunho de apreço e reconheci-
"mento. S. Paulo, 2 de Outubro de 1903. O presidente do Estado,
"Bernardino de Campos. O secretario do Interior, Bento Bueno".

"Na mesma occasião o deputado Cesario Travassos formulou
"um projecto ao Congresso estadual autorizando a concessão de um
"premio de 200:000$, ao Dr. Ribas e assegurando-lhe o direito,
"em qualquer época, á aposentadoria com todos os vencimentos de
"seu cargo.

"Informado desse projecto impediu o Dr. Emilio Ribas a sua
"apresentação, declarando-se bem pago com as homenagens recebi-
"das do governo e da sociedade paulista.

"Coube, pois, ao Dr. Emilio Ribas a gloria de realizar pela
"primeira vez, no Brazil os novos processos de lucta contra a fe-
"bre amarella, o que constituiu grande parte da obra gloriosa de
"Oswaldo Cruz na campanha de saneamento do Rio de Janeiro.
"No 6.º Congresso Brazileiro de Medicina, realizado nesta capital, as
"memorias do Dr. Emilio Ribas, relatando as experiencias de S.
"Paulo e os resultados colhidos na campanha em varias cidades do
"interior do Estado, foram approvadas e louvadas unanimemente.

"A fama do Dr. Emilio Ribas transpoz as nossas fronteiras e
"seu nome tornou-se dos mais acatados nos grandes centros scienti-
"ficos de Paris, Londres, etc.

"Mas não bastou haver luctado e vencido contra a peste, a fe-
"bre amarella e a variola. Tambem contra a lepra houve o grande
"medico de empregar os seus esforços.

"Em 1913 incumbiu-o o governo paulista de estudar esse mal
"e as conclusões dos seus estudos lidas no 1.º Congresso Medico Pau-
"lista e mais tarde em 1918, no 1.º Congresso Sul Americano de
"Dermatologia e Syphilographia, realizado no Rio de Janeiro, foram
"unanimemente approvadas.

"Na direcção dos serviços sanitarios de S. Paulo, foi o Dr.
"Emilio Ribas um admiravel administrador e innovador. Em 1916
"creou o serviço gratuito de prophylaxia e tratamento do trachoma;
"creou tambem a inspecção medico-escolar e ampliou e desenvolveu

"todos os outros serviços dessa repartição, dando-lhes secções ver-
"dadeiramente modelares, como o hospital de isolamento de Santos.
"Todos os problemas de hygiene foram tratados pelo Dr. Emilio
"Ribas nos seus 19 annos de direcção de Saude Publica de S. Paulo,
"posto, em que prestou, ao seu Estado e ao Brazil, os mais rele-
"vantes serviços, tornando-se merecedor de todas as honras por par-
"te de seus concidadãos".

Principaes trabalhos do Dr. Emilio Ribas

1887 — "Morte apparente dos recem-nascidos" (These inaugural).

1901 — "O mosquito como agente da propagação da febre amarella".

1902-1903 — "Travaux touchant la prophylaxie de la fièvre jaune".

1903 — "Memoria sobre a prophylaxia da febre amarella, apresentada ao 6.º Congresso Brazileiro de Medicina e Cirurgia".

1909 — "The extinction of yellow fever in the State of S. Paulo". (Conferencia realisada perante a Sociedade Tropical de Londres).

1910 — "Alastrim, e Milkpox — Nota previa apresentada a Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo.

1912 — "Alastrim, Amdas e Milkpox" — Communicação lida em sessão da Sociedade de Medicina Tropical de Londres.

1914 — "Etiologia da lepra, herança e contagio". — Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia.

1915 — "Prophylaxia da lepra, os asylos colonias". — Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia.

1915 — "Eradication of yellow fever from the State of S. Paulo". — Memoria apresentada ao 2.º Congresso Scientifico Pan-Americano em Washington.

1916 — "Lepra, sua frequencia no Estado de S. Paulo. — Meios prophylaticos aconselhaveis". 1.º Congresso medico Paulista.

1918 — "Frequencia da lepra em S. Paulo". — Prophylaxia da lepra. Relatorio apresentado ao 1.º Congresso Sul-Americano de Dermatologia e Syphiligraphia—Rio de Janeiro.

1921 — "Questões de hygiene".—A febre typhoide em S. Paulo. —Conferencia realisada no Instituto de Hygiene.

1922 — "Campanhas sanitarias — A febre amarella".—Conferencia realisada no Instituto de Hygiene.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS BATRACHIOS

PELOS DOUTORES

VITAL BRAZIL E J. VELLARD

INTRODUCÇÃO

Entre os animaes venenosos ou reputados taes, os batrachios, particularmente as salamandras e os sapos occuparam, em todos os tempos, em todos os paizes, lugar saliente. Desde a mais remota antiguidade e especialmente durante a idade média, estiveram sempre associados aos mysterios da magia, originando innumeraveis fabulas a seu respeito. Serviam principalmente ao preparo de philtros e de venenos subtis, não faltando, nunca, no caldeirão dos feiticeiros, *o sapo*, ao lado de outros ingredientes suspeitos. Mais tarde perdeu, em parte, este renome, continuando, entretanto, a gosar de um papel na therapeutica empirica de varios paizes, sendo recommendado no tratamento de differentes affecções, quer sob a forma de oleo de sapo ou de preparados semelhantes, quer sob a da applicação do animal vivo sobre as partes doentes.

Ha alguns annos que um bom numero de biologistas tem tratado do assumpto, para estabelecer a verdade sobre estes factos empiricos. Negada por alguns, a presença de secreção toxica foi reconhecida em um certo numero de *urodelos e anouros*, por quasi todos os autores que se occuparam d'estas pesquizas. Fóra, porém, da observação quasi unanime da toxicidade d'estas secreções, as opiniões estão longe de accordo, no que respeita a sua origem, acção physiologica, pharmacologica, propriedades physico-chimicas, etc. Muitas d'estas divergencias se explicam, pela diversidade dos methodos empregados para obtenção do veneno e pela multiplicidade das especies estudadas. E' assim que alguns autores tratam do "*veneno dos batrachios*" e de suas propriedades, sem mesmo distinguir os urodelos dos anouros, generalisando a todos os batrachios, conclusões applicaveis a uma só especie.

Rarissimos e incompletos os trabalhos que encontramos sobre especies brazileiras de sapo. Fomos por essa razão, conduzidos a fazer algumas experiencias sobre o veneno da especie mais commum

entre nós, *o Bufo marinus*, experiencias estas que tendo nos revelado factos extremamente interessantes, alguns dos quaes não registados anteriormente, nos decidiram a um estudo mais detalhado comprehendendo outras especies do genero Bufo e de outros batrachios.

Faremos, para maior clareza, preceder a exposição de nossas pesquizas, de uma primeira parte historica em que daremos uma synthese dos trabalhos anteriores.

PRIMEIRA PARTE

HISTORICO

Na antiguidade eram os sapos considerados como extremamente venenosos. Acreditava-se que pela bocca, pelo anus, pelos poros da pelle, segregavam um veneno dos mais violentos e que o bafo ou o simples contacto do seu corpo bastava para communicar ás plantas, sobre as quaes tocassem, propriedades tão venenosas, que absorvidas por homem ou animal determinariam a morte acompanhada de horriveis soffrimentos. Segundo *Fausto* (1) uma crença muito popular ao norte da Europa explica a existencia do veneno do sapo, pela faculdade d'estes animaes absorverem as substancias venenosas do solo ou dos vegetaes, donde o nome de "*Erd-magnete*", ou imans da terra, dado a estes animaes, em certas regiões da Allemanha, ou o de "*Reine des Champigons*", como lhes chamam os Bretões, comprehendendo-se igualmente a razão, pela qual são designados os cogumellos, entre os quaes se encontram especies eminentemente toxicas, por "*Chapéo de sól de sapo*", "*Paddenstohlen*", "*Toadstoals*", ou "*Krôtenstühle*".

Aristoteles e *Plinio* falam do sapo como de um animal estremamente venenoso. O Talmud classifica-o entre os seres impuros, cujo contacto obriga a purificações.

Na idade media a secreção do sapo era considerada como um dos elementos de numerosos venenos que podiam, segundo a sua composição, determinar a morte lenta ou rapida. O uso criminoso d'este veneno, leviamente negado, na actualidade, era geralmente conhecido outróra. *Ambrosio Paré* (2) affirma que era empregado em seu tempo. No Brazil é conhecido, por tradição, o uso que certos escravos africanos, — os chamados feiticeiros, — faziam do sapo, para fins criminosos. E' assim que o naturalista *Marcgrave* (3) em sua historia natural do Brazil diz que nossos feiticeiros preparavam com o *sapo cururu'* torrado, um pó, que misturado aos alimentos, determinava a morte no meio de violentas dores, acompanhadas de inflammação da garganta, de perturbações visuaes, dyspnéa, vomitos, diarrhéa, convulsões e delirio. Como remedios contra taes envenenamentos, aconselha Marcgrave vomitivos, purgativos, banhos quentes e applicação sobre a cabeça do doente de um sapo partido ao meio. Actualmente ainda o povo reputa o sapo perigoso, podendo, quando irritado, lançar a certa distancia um jato de veneno capaz de determinar a cegueira.

A pharmacopéa popular de diversos paizes utilisa o sapo. Assim é que na China é empregado em diversos preparados para combater a hydropisia. Entre nós, em certas localidades do interior, principalmente no Estado do Rio, segundo nos informaram varios medicos, é empregado, em fricções, um oleo, a que chamam oleo de sapo, o qual é preparado lançando-se em azeite, a ferver, um sapo vivo. Em outros lugares (Minas Geraes) aconselha-se, no tratamento da erysipela, eczemas rebeldes e outras affecções cutaneas, fricções com um sapo vivo. A mesma tradição parece existir na Argentina, pois *Novaro* (4) cita dois casos extremamente interessantes de tratamento de herpes pela applicação do sapo vivo sobre a parte affectada, tratamento este que determinou o envenenamento dos pacientes, em um dos quaes se verificou a morte em 32 horas.

ENVENENAMENTOS ACCIDENTAES:

Os sapos possuem apenas um veneno cutaneo, destinado a defenderem-se naturalmente contra os outros animaes, principalmente contra os que sejam tentados a mordel-os ou a engolil-os. Não dispõe de um apparelho inoculador de veneno, sendo consequentemente inoffensivos, para o homem, em condições naturaes.

A litteratura consigna, entretanto, factos de envenenamento accidentaes, quer pela applicação directa ou indirecta sobre as mucosas, principalmente sobre a mucosa ocular, quer pelo uso empirico d'este veneno.

Os medicos antigos attribuiam, a estes animaes, muitos accidentes, pelos quaes não eram, as mais das vezes, responsaveis. E' assim que *Ambrosio Paré*, cita o caso de dois negociantes, que pereceram, dentro de poucas horas, por haverem bebido vinho no qual se haviam deitado algumas folhas de um vegetal, onde se encontraram numerosos sapos. *Rondelet*, (5), na mesma epocha, affirma ter observado uma mulher que succumbira por haver comido hervas sobre as quaes passara um d'estes animaes. Dois seculos mais tarde, *Delamazière* (6) assignala um envenenamento no homem, o qual terminou por cura rapida.

Fora d'estes accidentes hypotheticos, sem outro interesse, senão o de mostrar como era generalisada a crença na acção venenosa do sapo, a litteratura moderna regista um certo numero de factos interessantes e bem verificados.

Um dos mais antigos é o consignado por *Laurentius* (7) que observou a morte, no meio de convulsões, de um lagarto que mordera um sapo.

Gemminger (8) tambem vio morrer, dentro de pouco tempo, um gavião, que dilacerara com o bico, um sapo que lhe fôra dado, como alimento. Descreveu, como unicos symptomas, viva agitação; violentos esforços para vomitar seguidos da morte quasi que immediata do passaro. *Lataste* (9) refere o caso de um rato que morrera, em consequencia de haver comido um sapo, com elle encerrado na mesma gaiola; este mesmo autor não observara, entretanto, accidente local algum, em consequencia da projecção do veneno sobre a mucosa. *Bringard* (10) cita o caso de um cão morto rapidamente por syncope, depois de ter mordido um sapo. *Von Mehely*, citado por *Boulen-*

ger (11), observou um outro cão que nas mesmas condições se restabelecera em dois dias, depois de violentas dores e de salivação intensa.

O Dr. *A. Fontes*—do Instituto Oswaldo Cruz, nos referio o caso de um cão que sucumbira, em poucas horas, por haver mordido um sapo. O Dr. *Franco da Rocha* tambem observou um outro cão que depois de haver atacado um sapo apresentara phenomenos de envenenamento, com abundante salivação, tendo sido salvo, entretanto, por meio de lavagens repetidas com leite.

No homem citam-se, tambem, casos de ophtalmias mais ou menos graves, devidas á acção do veneno transportado accidentalmente ao globo ocular, pelos dedos ou projectado no orgão visual, por pressão exercida sobre a glandula. *Staderini*, (12) refere um exemplo d'estes accidentes, no caso de uma mulher que se restabeleceu em dois dias, depois de haver apresentado uma forte opalescencia e anesthesia quasi completa da cornea e paresia de todos os musculos oculares. *Novaro*, (13) tendo recebido, no curso de uma experiencia um jacto de veneno de *Bufo arenarum*, sobre o globo ocular, teve uma sensação immediata de frio, acompanhada de ischemia, seguida de congestão conjunctival e de perisclerite persistente, durante dois mezes.

FACTOS EXPERIMENTAES:

Na Europa se encontram principalmente tres especies de sapos pertencentes ao genero Bufo: o Bufo calamita, o Bufo vulgaris do Norte da Europa e o Bufo viridis da Europa meridional.

A ingestão d'este veneno, no homem, segundo *Ambrosio Paré*, (2) determina desfallecimento, caimbras, enfraquecimento do pulso, cyanose, ictericia, vomitos, sobrevindo a morte por syncope. *Laurentius* (7) observou no cão vomitos violentos e salivação abundante, em consequencia de absorpção por via oral d'este veneno. *John Davy* (14) não teve resultado algum positivo trabalhando, ao que parece, com a urina d'este animal. *Dumeril et Bibron* (15) referem que rans e salamandras, collocadas no mesmo recepiente com sapos, succumbiram. *Gemminger* (8) conclue que os sapos podem, em certas circumstancias, secretar um veneno muito activo e de acção assaz semelhante a strychnina.

Gratiolet et Cloetz (16) estudaram comparativamente a acção dos venenos cutaneos da salamandra terrestre e do sapo commum. Segundo estes autores, o veneno do sapo ao contrario do de salamandra não é convulsivante; inoculado em pequenos passaros, estes cambaleiam, abrem o bico, fecham os olhos e cahem mortos em 5 ou 6 minutos; péla necropsia, não se encontra senão uma apoplexia pericerebelósa consideravel e os canaes semi-circulares cheios de sangue. Uma pequena tartaruga (Testudo mauritanica) picada na pata com uma agulha molhada no veneno, apresentou uma paralysia do membro, ainda persistente 8 mezes depois. Sobre a mucosa bucal do homem não observaram reacção alguma dolorosa. Concluiram, entretanto, que as crenças populares a respeito d'este veneno se justificam pela sua acção toxica energica experimentalmente verificada.

O primeiro trabalho experimental, verdadeiramente notavel sobre este assumpto foi o de *Vulpian* em 1854, (17) seguido de uma segunda memoria, em 1856 e de diversas notas posteriores. Por inoculação, Vulpian verificou que o veneno de sapo mata rapidamente o cão, o cobaio, com os seguintes symptomas: 1.° excitação (1.ª phase); 2.° depressão (2.ª phase); 3.° vomitos ou nauseas; 4.° longo periodo, em que se observam crises convulsivas, tremores espasmodicos e opisthotonus no cobaio e que falta no cão. O cobaio morre em 30 minutos, a rãn em 45 minutos e o cão numa hora. Por via oral não conseguio provocar symptomas no cão pela administração do veneno de mistura com uma pillula de carne; obrigando, entretanto, este animal a morder o sapo, observou vomitos quasi que immediatos, forte salivação com restabelecimento dentro de uma hora. Por esta via conseguio determinar a morte lenta da ran.

A irritabilidade muscular, *post-mortem*, é mantida no cão e na ran. A acção sobre o coração é variavel segundo as especies: parada em diastole no momento da morte no cão; quasi imperceptivel no cobaio, depois da parada da respiração; para antes da respiração no pardal e na ran. Em todos os casos a parada do coração tem como causa o enfraquecimento da irritabilidade muscular de suas paredes.

Segundo Vulpian existe uma certa analogia physiologica entre este veneno e o curare, analogia que estaria confirmada pela maior resistencia do sapo a estas duas substancias.

Ao contrario dos autores precedentes, *Cuvier* (18) não reconhece a natureza toxica da secrecção cutanea do sapo, affirmando que "não constitue um veneno senão para os animaes muito fracos". Do mesmo modo, *Rainey* (19) não obteve senão reacção local pela injecção do veneno, o que só se explica por haver trabalhado com um producto muito impuro. Para *Claude Bernard*, (20) o veneno age sobre a fibra muscular, sendo os musculos voluntarios atacados em primeiro lugar; o coração não para senão em um periodo mais adeantado do envenenamento.

No homem *Lataste* (9) não notou effeito algum local consecutivo a applicação do veneno sobre as mucosas.

Fornara (21) que publicou uma serie de memorias sobre o veneno de sapo, utilisou-o sob a forma de extractos alcoolicos, a que deu o nome de phrynina. A acção d'este veneno, seria segundo este autor, muito semelhante a da digitalina, mas as nauseas mais violentas do que as determinadas por este alcaloide. Um coelho morre em 5 horas por ingestão de 90 milligrammas de phrynina. A injecção subcutanea determina gangrena. Os symptomas observados nos animaes consistem em viva agitação, a principio, acompanhada ou não de augmento da sensibilidade e dos reflexos, vem depois a salivação, os vomitos, a polypnéa e violentas convulsões no coelho e por vezes na ran. Os passaros são menos sensiveis do que os outros animaes.

Fornara pensa que o veneno possue uma forte acção sobre o systema nervoso central. *Staderini* (12) tendo observado um caso de ophtalmia consecutiva a projecção de veneno no globo ocular, realisou as interessantes experiencias que se seguem. A instillação

de uma solução de veneno a 2 °|°, provoca nos animaes a anesthesia das palpebras e da cornea, a começar de cinco minutos depois da applicação da solução e durando de 4 a 5 horas, acompanhada de hyperhemia conjunctival e de opacidade da cornea, que desapparecem ao fim de 24 horas. Uma solução a 1 °|° sem provocar irritação local produz ainda anesthesia total, sem immobilisar, contudo o globo occular. A tenotomia operada n'estas condições é indolor.

Em 15 minutos a conjunctiva e a cornea humana são anesthesiadas nas mesmas condições, por muitas horas; mas a diminuição da sensibilidade é ainda notavel depois de 24 horas. A pressão ocular interna é igualmente diminuida, mas a pupilla e accomodação não são atacadas. Pequenas doses de veneno collocadas na mucosa buccal do homem ou injectadas no cão, exercem a mesma acção anesthesica; mas a injecção de fortes doses determina ulceração local. A contractilidade dos musculos da ran mergulhados em uma solução de veneno é rapidamente abolida. O veneno secco e redissolvido é tão activo como o veneno fresco.

Por experiencias *in vitro*, *Pugliese* ([22]) notou que o veneno transforma a hemoglobina em methemoglobina; não poude, entretanto, verificar *in vivo* estes resultados.

Phisalix et Bertrand ([23]) estudando a acção do veneno do *B. vulgaris* sobre a ran que se mostrou muito sensivel, observaram, como principaes symptomas, a paralysia posterior a principio, a myosis e retardamente nos batimentos do coração que para em systole. A acção do veneno é attribuida por estes autores a dois principios chimicos differentes—a bufotalina, veneno cardiaco e a bufotenina veneno paralysante.

Fausto, ([1]) em 1902, publicou um importante trabalho sobre o veneno dos sapos da Europa. Em suas pesquisas utilisou não o veneno natural, mas duas substancias obtidas por maceração alcoolica da pelle e purificações successivas—a bufotalina e a bufonina, corpo mal definido, differindo do precedente, principalmente por sua solubilidade menor e por sua acção mais fraca. Physiologicamente, a bufotalina se comporta como a digitalina, provocando diminuição do numero de batimentos cardiacos, a elevação da pressão e reforço da systole ventricular, podendo chegar até ao peristalthismo cardiaco, interrompido por silencios systolicos. Todos os outros symptomas observados são consequencias das perturbações circulatorias que produzem secundariamente diminuição funccional do systema nervoso, podendo chegar até a paralysia. As demonstrações foram feitas sobre o coração da *Rana temporaria* mas nenhuma acção directa poude ser demonstrada sobre os systemas nervoso ou muscular. Sobre os animaes de sangue quente, Fausto ensaiou a acção da bufotalina por via gastrica e parental, notando que no primeiro caso a dose lethal era 10 vezes maior de que no segundo: depois de um periodo de agitação sobrevem nauseas, vomitos, crises espasmodicas de suffocação; os movimentos respiratorios, diminuidos de frequencia são mais profundos, lembrando, por vezes, o Cheyne Stokes; o pulso é irregular, ora lento, ora rapido, algumas vezes dicroto; fraco com bruscas contracções a respiração para afinal, morrendo o animal com algumas convulsões. No coelho a dyspnéa é mais accentuada do que no cão ou no gato.

Heuser (24) e depois d'elle *Krakow* (25) confirmaram a semelhança do veneno total com a digitalina, sendo que este ultimo autor observou igualmente a acção anesthesica assignalada por Staderini. Para *Kobert* (26) igualmente a acção d'este veneno assemelha-se a da digitalina e é devida a duas substancias, a bufotalina e a bufonina isoladas por Fausto, mas acredita que a phrynolisina isolada por *Pröscher* (27) da pelle do *Bombinator igneus* e assignalada posteriormente no Bufo vulgaris é de natureza muito differente. *Pierrotti* (28) notou que o veneno não se altera pelo tempo, pelo calor, pela putrefacção, pelos alcalis ou pelos acidos fracos, nem pela filtração. Segundo este autor a ran, o coelho, o cobaio, o rato, o gato, o cão e o pombo são muito sensiveis, especialmente estes trez ultimos animaes. Os symptomas são analagos aos que foram descriptos pelos autores anteriores. *Fühner* (29) occupou-se da acção comparada do veneno total, obtido por maceração da pelle em liquido de Ringer, sobre o coração do proprio animal, sobre o da Rana temporaria e o da Rana esculenta, tendo verificado uma menor sensibilidade para o sapo. As curvas obtidas nestas especies de animaes são qualitativamente semelhantes e não haveria senão uma simples differença na amplitude da reacção.

Hermann Wieland (30) criticou o trabalho de Fühner, por haver este empregado veneno muito impuro, tendo utilisado, em suas experiencias, a bufotalina preparada pelo methodo de Fausto. Para elle a acção d'este producto é muito semelhante á da digitalina; notou algumas differenças ligeiras entre as curvas por elle obtidas e as de Fühner. Suas conclusões geraes são, entretanto, as mesmas.

Em 1910 *Dehaut* (31) publicou um estudo sobre o veneno dos batrachios sem trazer facto algum original sobre o dos sapos.

Mme. *Physalix* (32) falla longamente a respeito dos sapos em seu livro sobre os animaes venenosos e os venenos. Parece não ter realisado pesquisas pessoaes sobre o assumpto, limitando-se a resumir os trabalhos anteriores, particularmente os de Physalix, Bertrand e os de Pierrotti.

Trabalhos, sobre o veneno das especies sul americanas de sapo, são muito raros, referindo-se as duas especies mais communs do genero Bufo—o B. Marinus L. (Syn. B. agua Seba) e o B. Arenarum Hensel.

O Dr. *J. Baptista de Lacerda* (33) foi o primeiro que no Brazil se occupou com o veneno de sapo, estudando o do B. Marinus, que elle chamou *Bufo ictericus*, tratando-se mui provavelmente do macho d'aquella especie. Os resultados a que chegou são assaz curiosos, alguns dos quaes não alcançaram confirmação posterior.

Segundo este investigador o veneno estudado era menos activo do que os dos Bufos europeus e de acção differente, tanto do ponto de vista chimico, como do ponto de vista physiologico.

Em 1912, *Abel e Macht* (34) publicaram um interessante trabalho sobre o veneno d'esta especie (B marinus), pelo qual se verifica haverem isolado dois principios, um dos quaes identificaram a adrenalina na proporção de 6, 72 °|°, e outro de acção toxico-cardiaca e diuretica analoga a digitalina.

Acrisio Bezerra (35) em sua these apresentada a Faculdade de

Medicina da Bahia, occupou-se do veneno de sapo, fazendo trabalho de simples compilação.

Novaro (4 e 13), na Argentina escreveu duas notas muito interessantes sobre o veneno do B. arenarum. Foi, este autor, levado a occupar-se experimentalmente do assumpto pela observação de accidentes determinados por esta especie, aos quaes já tivemos occasião de nos referir anteriormente. Depois de haver determinado a minima mortal para as differentes especies animaes de laboratorio, verificou que o Bufo arenarum resiste, por injecção subcutanea, e intraperitoneal ao seu proprio veneno até a dose de 500 mg.

Do ponto de vista physiologico estabeleceu *Novaro*, a semelhança de acção d'este veneno com a da adrenalina, observando tachicardia, com elevação de pressão, seguida quasi sempre de brachycardia mais accentuada do que com a adrenalina, vaso constricção e a morte por syncope. A coagubilidade do sangue não lhe pareceu modificada. A acção local era intensa, caracterisada por forte congestão e tumefação, quando depositada sobre uma ferida. Sobre o globo ocular notou sensação de frio, ischemia, seguida de congestão conjunctival, podendo se acompanhar de perisclerite, persistente de 1 a 2 mezes. Ao contrario do que se dá com a adrenalina, observou que este veneno provoca a contractura generalisada do intestino isolado do coelho, dilata o globo ocular enucleado da ran e produz a glycemia no coelho.

SECREÇÃO MUCOSA OU VENENO MUCOSO DOS BATRACHIOS.

Além do veneno propriamente dito, denominado veneno granuloso ou dorsal, segragado pelas paratoides e pelos agglomerados de glandulas da face dorsal, assignalou-se nos batrachios uma secreção fornecida por pequenas glandulas redondas de Leydig ou glandulas mucosas, existindo sobre toda a superficie tegumentaria, no meio das glandulas de veneno e mesmo sobre as paratoides. Todavia, na face ventral, estas glandulas mucosas se apresentam isoladas.

Em diversas especies de batrachios têm sido assignaladas propriedades toxicas d'esta secreção, a despeito da enorme difficuldade de obter-se este producto em estado de pureza.

Eis, segundo Physalix e Mme. Physalix, as propriedades geraes da secreção mucosa dos batrachios; é um liquido incolor, viscoso, neutro, espumando com facilidade, insipido, de odor penetrante, variavel segundo as especies, parcialmente soluvel no sôro physiologico e coagulando pelo alcool. Do coaculo alcoolico pode ser retirada pela agua a substancia toxica. As soluções perdem rapidamente a actividade, do mesmo modo a dissecação diminue muito a toxidade, isto, porém, nenhuma relação tem com a evaporação de productos volateis, porquanto o mucus inodoro das larvas é, entretanto, toxico. O calor attenua-o geralmente. Certos mucus, porém, guardam sua toxicidade completa ou parcialmente.

Sobre o mucus das especies de Bufo Sul Americanas não existem pesquizas. Das especies europeas Dehaut, Mme. Physalix e Physalix se occuparam, tendo este ultimo autor verificado a sua pequena actividade, ainda que tenha conseguido matar, por injecção de for-

tes doses, rans nas quaes observou paralysia e a parada do coração em diastole.

PROPRIEDADES PHYSICO-CHIMICAS DO VENENO GRANULOSO:

Todos os autores que se tem occupado com o estudo d'este veneno descrevem-n'o como uma substancia leitosa ou cremosa, de consistencia variavel, de côr branca ou amarellada, de gosto amargo e cheiro *sui generis*, em estado fresco. Dissecado transforma-se em uma massa amarella translucida, de aspecto corneo ou resinoide.

Fóra d'estes caracteres em que as opiniões são accordes, a maior diversidade se verifica no modo de interpretar a natureza e as propriedades d'este veneno, como veremos pela exposição que se segue.

Em 1817 *Pelletier* (36) achou-lhe um gosto amargo, picante e caustico. Este veneno seria formado de trez elementos differentes: uma materia graxa muito amarga, uma substancia muito semelhante a gelatina e um acido em parte livre e em parte combinado a uma base; dá emulsões com a agua e envermelhece o papel de tournesol.

Segundo *Dumeril* e *Bibron*, (15) seu cheiro se approxima muito do de almiscar e sua reacção é muito acida. *Davy* (38) affirma que elle é parcialmente soluvel no alcool e dá com o acido azotico uma coloração vermelha.

Gratiolet e *Cloetz* (16) verificaram primeiro que o veneno dissecado conserva toda a actividade. Depois procuraram separar seu principio activo pelo tratamento successivo pelo ether sulfurico e pelo alcool. Segundo estes autores a parte activa do veneno seria um alcaloide.

Claude Bernard (20) estabeleceu, muito claramente, a differença entre os venenos de batrachios e os venenos ophidicos, sendo os primeiros soluveis no alcool e thermoresistentes, e os segundos se precipitando, ao contrario pelo alcool e thermo-labeis.

Casali (38) de collaboração com *Fornara*, retirou, do veneno do Bufo viridis, uma substancia que pensa ser um alcaloide a bufidina, de acção analoga ao veneno total, pouco soluvel na agua, mais facilmente soluvel no chloroformio, no ether, no alcool, dando com o acido chlorhydrico uma bella coloração verde, que seria semelhante a obtida com a digitalina. A analyse da bufidina não poude ser feita; ella daria entretanto, a maior parte das reacções de coloração dos alcaloides.

Fornara, (21) em 1877, tendo em vista pesquisas pharmacologicas e therapeuticas, obteve por maceração da pelle inteira, uma nova substancia, muito impura, de côr vermelho amarellada, de odor viroso, hygroscopica, a que chamou phrynina.

Em 1884, *Calmels*, (39) achou que o veneno de sapo contem uma pequena quantidade de methylcarbylamina, $C{=}N{=}CH^3$ a qual elle deve em parte o seu cheiro e sua toxicidade e principalmente o acido methylcarbylamino o isocyanetico $C{=}N$, $CH^2{-}(O\ OH)$, que pode ser reproduzido por synthese, tratando a glycocolla pelo acido formico. E' a esta reacção que no organismo do sapo, seria devida a formação da parte activa do veneno, visto o sangue d'este animal conter acido formico em pequena quantidade, como já haviam assignalado *Casali* e *Fornara* (38). Este acido artificialmente preparado

se transforma em contacto com o ar em uma substancia deliquescente em que se separam gotticulas oleosas e pequenos crystaes, como se observa com o acido retirado do veneno natural. *Bufalini* (40) assignalou as propriedades reductoras do veneno de sapo que daria a diazo-reacção.

Segundo *Hewlet*, (41) o principio activo do veneno seria um alcaloide, possuindo todos os caracteres da digitalina. De uma especie de batrachio o *Bombinator igneus*, *Prôscher* (27) retirou, por maceração da pelle, uma substancia hemolytica, que se altera na temperatura de 56.°, sob a acção do alcool e dos acidos a qual denominou phrynolisina.

Fausto (1) em um interessante trabalho já citado anteriormente (1902) analysa do ponto de vista chimico este veneno, tendo extrahido, por maceração de pelles de sapo no alcool, duas substancias,—a bufonina e a bufotalina. A primeira é um corpo crystalisavel em agulhas ou em prismas; seu ponto de fusão é 152, sua formula elementar C^{34} H^{54} O^{2}, C=82, 5 e H=10, 93, donde o peso molecular=494. Muito soluvel no benzol, no chloroformio, no alcool quente, pouco soluvel no ether, quasi insoluvel no alcool frio, insoluvel nos alcalis e nos acidos; sua reacção é neutra. Dissolvida no chloroformio, dá, pela addição de acido sulfurico, um anel vermelho escuro; pela agitação, o chloroformio toma a côr vermelha, emquanto que o acido torna-se fluorescente. Evaporada em uma capsula com acido chlorhydrico e um traço de perchlorureto de ferro, não dá a reacção da cholesterina.

A *bufotalina* de formula elementar C^{34} H^{46} O^{10}, corresponde a C=66, 45 °|° e H=7, 49 °|°, com peso molecular=614. Muito soluvel no chloroformio, no alcool, no acido acetico, na acetona, nos alcalis, insoluvel no ether de petroleo, pouco soluvel no benzol e na agua; tem reacção acida e dá com as bases saes, cujos solutos são alcalinos, ligeiramente opalescentes e muito amargos; precipitam pelo chloreto de Ba ou de Ca, pelos saes de cobre, e pelos oxydos de prata e de chumbo. Ao contrario da bufonina, a bufotalina não parece possuir o grupo hydroxila; aquecida em uma capsula com acido sulfurico, dá com o bromureto de Cal. uma coloracão pardo avermelhada; precipita com o tanino; aquecida com o acido chlorhydrico, não dá coloração alguma.

A bufotalina, de acção physiologica semelhante a digitalina, deriva, segundo *Fausto*, da bufonina, por oxydação. A propria bufonina seria um derivado da cholesterina.

Este trabalho tem sido, com justa razão, criticado, principalmente, por haver preferido, este chimico notavel, trabalhar com a pelle do animal ao em vez de empregar o veneno natural, colhido directamente das glandulas, como seria mais logico e mais facil. Constitue, entretanto, notavel contribuição ao estudo da questão, permettindo orientar futuras pesquisas sobre a natureza e propriedades chimicas do veneno dos batrachios.

Bertrand, (42) que repetiu a technica de Fausto, para obtenção das suas duas substancias, pensa que a bufonina não é um principio elementar novo, mas simplesmente cholesterina ordinaria, impurificada por substancias extranhas e pela bufotalina, que lhe dá uma fraca acção sobre o coração. Em collaboração com *Phisalix*, (23)

este mesmo autor retirou do veneno de sapo, duas substancias. Uma seria a bufotalina semelhante a de Fausto, se bem que com formula differente—C^{119} H^{111} O^{35}—de aspecto resinoide, incolor, da reacção neutra, muito soluvel no alcool, no chloroformio, na acetona e no acido acetico; pouco soluvel no ether e na agua distillada. Seria um veneno cardiaco. A outra substancia seria a bufotenina, muito soluvel na agua distillada e no alcool, de composição chimica desconhecida. Seria um veneno paralysante.

Kobert, (26) confirma os resultados de Fausto. Para elle a bufotalina não é, nem glycoside, nem alcaloide, mas um acido. Tanto a bufotalina, como a bufonina seriam derivadas da cholesterina, modo este de ver que teria confirmação no facto de haver Fausto extrahido, de calculos biliares humanos, um derivado de cholesterina, possuindo acção analoga a da digitalina.

Pierotti, (28) pensa que o veneno deve sua actividade a um alcaloide e assignalou que o calor, a putrefação, a dyalise, o alcool, o ether e outros agentes destruidores dos albuminoides, nenhuma acção tem sobre elle.

Lacerda, (33) em trabalho citado anteriormente, se occupou mui ligeiramente das propriedades physico-chimicas do veneno do nosso Bufo-marinus (B. ictericus), achando-o differente do das especies europeas, com aspecto cremoso, amarellado, inodoro, muito caustico, insoluvel no alcool a frio ou a quente, e na agua, com os quaes formaria apenas suspensões. Soluvel na acido chlorhydrico (sem coloração) no acido azotico (coloração violeta); e no acido sulfurico (coloração verde); com a potassa e a ammonea daria uma coloração rosea; insoluvel no acido acetico, na essencia de terebenthina, no ether, no chloroformio; enegreceria pelo acido chromico. De reacção fracamente acida. Ao microscopio apresenta-se sob a forma de granulações, que diminuem sob a influencia do acido acetico.

Segundo *Abel* e *Macht*, (34) o veneno do B. marinus conteria dois principios activos crystalisaveis, dos quaes um seria a *bufagina*, de formula C^{18} H^{24} O^{4}, alcaloide de acção semelhante a da digitalina e o outro a adrenalina, que entra na composição do veneno na proporção de 6, 72 °|°. E' a este ultimo corpo que seria devida a coloração azul esverdeada que tomam os instrumentos de aço ao contacto do veneno.

Shipley e *Wislocki*, (48) citado por *Swale Vincent*, (64) pensam que a adrenalina se forma, na glandula, a custa da tyrosina ou de um corpo visinho, por perda de CO^2.

Novaro (13) assignalou que a secreção do B. arenarum, obtida por pressão das paratoides e dissecada, fornece cerca de 34 a 38 °|° de veneno secco no qual se encontra de 1 a 3, 5 por 100 de adrenalina, com as principaes reacções: perchloreto de ferro, acido iodico, etc.

IMMUNIDADE NATURAL OU ADQUIRIDA CONTRA O VENENO DOS BATRACHIOS:

Os conhecimentos sobre a resistencia natural ou adquirida de diversos animaes e do proprio sapo ao veneno, são confusos e contraditorios. Assim é que certos autores sustentam que o sapo é

completamente immune ao seu proprio veneno, emquanto que outros lhe teriam assignalado uma sensibilidade mais ou menos accentuada.

Vulpian (17) acreditava que o sapo era completamente refractario ao proprio veneno, sendo sensivel, entretanto, ao veneno do tritão e da salamandra. Mais tarde reconheceu, com *Claude Bernard*, (20) que esta resistencia do sapo ao proprio veneno, embora muito maior do que a dos outros animaes, não era comtudo absoluta. *Claude Bernard*, explica esta resistencia relativa por uma sensibilidade mais fraca das fibras musculares d'este animal.

Fornara, (21) consigna do mesmo modo a maior resistencia do sapo ao proprio veneno.

Physalix e *Bertrand*, (22) tendo registado a toxicidade do sangue do sapo, explicam a immunidade relativa d'este animal ao seu veneno, ao qual seria 500 vezes menos sensivel do que a ran (experiencia com a bufotalina) por uma secreção interna continua do veneno, trazendo como consequencia a tolerancia do individuo. Esta resistencia dos batrachios não se estabeleceria senão depois do desenvolvimento das glandulas e as larvas seriam muito sensiveis ao veneno da propria especie (experiencias com a salamandra); a semelhança physiologica do veneno e da digitalina explicaria igualmente a pouca sensibilidade do sapo a este toxico.

O. Heuser, (24) que estudou as diversas hypotheses admissiveis para explicar a resistencia do sapo aos venenos cardiacos, focalisa, por eliminação a da não receptibilidade do musculo cardiaco a estes venenos (immunidade local ou dos tecidos), ainda que não tenha conseguido demonstrar o facto, por falta de uma boa preparação. Esta resistencia se extende, além da digitalina, a physostigmina, a muscarina, a strophantina, a helleborina, a scyllipicrina e ao alcool; mas não ao baryum ao qual o sapo seria tão sensivel como a ran, por injecção subcutanea.

Führer, (29) mostrou que a acção do veneno de sapo sobre o coração isolado do sapo e da ran é a mesma.

Hermann Wieland, (30) com o mesmo fim, servio-se da bufotalina preparada segundo o methodo de Fausto. Este trabalho sobre a importancia do calcium para a fraca sensibilidade do sapo aos venenos cardiacos, contem factos interessantes, entre os quaes, destaca-se o da medida da sensibilidade d'este animal ao seu proprio veneno. Dos factos expostos, pode se deduzir, embora não fosse esse o pensamento do autor, que o sapo, comquanto mais resistente do que a ran, ao seu veneno, está longe de possuir uma verdadeira immunidade, facto que as nossas pesquizas confirmaram, como adeante veremos.

IMMUNIDADE NATURAL DE OUTRAS ESPECIES DE ANIMAES AO VENENO DE SAPO:

Certos autores teriam observado a resistencia natural de certos animaes a este veneno, o que lhes permitteria fazer do sapo alimento habitual. Segundo *Vulpian*, (17) por exemplo as colubrideas podem engulil-o impunemente, assim como os patos e os ra-

tos commem-n'o, sem sentirem phenomenos de envenamento, emquanto que as rans, recebendo um pequeno jacto de veneno sobre o dorso, succumbem em poucas horas.

Mme. Physalix, (32) pretende que certos passaros e numerosas serpentes, particularmente a Tropidonotus natrix, digerem impunemente volumosos sapos, contendo em sua pelle uma dose de veneno capaz de matar muitos cães ou muitos gatos por via gastrica.

Affirma ainda que as rans e os batrachios visinhos, comquanto sensiveis ao veneno do sapo, o são comtudo muito menos, do que os vertebrados superiores. As nossas experiencias, como adeante veremos, não confirmaram em absoluto estes resultados.

IMMUNIDADE ADQUIRIDA CONTRA O VENENO DE SAPO:

Poucas tentativas de immunisação tem sido feitas, com o veneno natural, com extractos artificialmente obtidos e com outras secreções cutaneas, não tendo sido concludentes os resultados alcansados.

Prôscher, (27) teria obtido um sôro anti-hemolitico com as injecções repetidas de phrynolisina; mas este facto tantas vezes citado não nos leva ao conhecimento das propriedades antigenicas de verdadeiro veneno, pois aquella substancia é um producto artificial absolutamente differente do veneno granuloso.

M. e Mme. Physalix, affirmam ter immunisado diversos animaes com o veneno mucoso de varias especies de batrachios, sem contudo, em suas experiencias, indicarem, em detalhe, o methodo seguido, nem registrarem os respectivos protocollos, podendo acontecer que não se trate de immunidade contra o verdadeiro veneno e sim contra substancias toxicas, de natureza proteica, possuindo funcção antigenica, as quaes, como impurezas, podem acompanhar, em certas circunstancias, quer o veneno mucoso, quer o veneno granuloso. E' o que verificamos em uma especie de Cystignathidae, indigena, o *Pyxicephalus cultripes.* Com relação a immunisação contra o veneno granuloso de especies do genero Bufo, passam, em silencio, os autores, sem registarem resultados positivos ou quaesquer tentativas a respeito.

EXISTENCIA DE OUTRAS SUBSTANCIAS TOXICAS NOS SAPOS:

Além dos venenos granulosos ou mucosos tem procurado certos autores a toxicidade de outros humores ou tecidos do sapo.

Reza a tradição popular que este animal, quando irritado, póde projectar, a certa distancia, um jacto de veneno, tomando por este, a urina limpida emittida n'estas circumstancias. Antigos experimentadores, taes como *Rainey,* (19) *Davy,* (37) *Hautz,* (44) referem experiencias sobre este assumpto, fazendo notar a acção irritante d'este liquido, sem acção alguma geral. Entretanto, *Physalix* (23) pensa ter achado, na urina, uma parte do veneno, que passando das glandulas na circulação, a maneira de secreção interna, se elimina assim parcialmente, baseando-se na observação que fizera, da urina do sapo injectada no peritoneo, haver determinado a morte da ran, com symptomas semelhantes aos determinados pelo veneno granu-

loso. Para este autor, não só a urina, como o sangue, o sorô e a lympha do sapo e de alguns outros batrachios, são toxicos pela existencia do veneno que pode parcialmente passar para a circulação.

OUTRAS ESPECIES DE BATRACHIOS ANOUROS RECONHECIDAS COMO VENENOSAS:

Fora do genero Bufo, tem-se reconhecido a existencia de secreções cutaneas venenosas em outras especies de anouros. Como os grupos estudados não pertencem, de modo geral, a nossa fauna, contentar-nos-emos em enumerar rapidamente as principaes especies estudadas com os caracteres geraes de seus venenos, sem entrar em maiores detalhes.

Mencionaremos, em primeiro lugar, o *Discoglossus pictus*, que tem a pelle quasi lisa como a ran ou apenas salpicada de finas granulações. O veneno granuloso, d'esta especie, é de difficil obtenção e não foi estudado. O veneno mucoso, segundo *Dehaut e Mme. Physalix*, (45) seria pouco irritante para as mucosas, mas muito toxico por via parental, determinando no começo convulsões e depois paralysia. Seria claramente myotico e diastolico, mas sem acção coagulante ou hemolytica. O sôro d'esta especie seria igualmente toxico.

Alytes obstetricans, pequeno bactrachio com a pelle completamente coberta de granulações, tem, segundo Physalix, o veneno muito irritante e muito toxico, de acção paralysante e diastolica. O extracto de ovos de alytes seria toxico para a ran, para equenos passaros e seria dotado de forte acção necrosante local. O veneno granuloso d'esta especie não foi estudado.

O veneno mucoso de *Pelobates cultripes*, seria, segundo *Mme. Physalix* e *Dehaut*, (46) pouco toxico, determinando lentamente a morte do rato e da ran.

O *Pelobates fuscus*, foi estudado por *Sauvage*, (47) que verificou a actividade toxica e irritante da secreção mucosa.

Gidon, (48) fez varias experiencias, com a secreção cutanea da Hyla arborea (Europa) sobre a ran e o rato, tendo verificado a acção nauseante, paralysante sobre o coração, que pára em diastole.

Segundo *Camis*, (49) o *Leptodactylus ocellatus* é completamente refractario a acção do curare. *Houssay* e *Hug*, (50) attribuem este resultado ao emprego de um curare impuro, tendo verificado, entretanto, que este batrachio, sem ser inteiramente refractario, é muito mais resistente a acção do curare, do que a ran europea e do que o *Bufo marinus*. Observaram, além disso que a minima curarisante corresponde a dose minima mortal, de sorte que o animal curarisado morre fatalmente dentro de algum tempo, ao envez de se restabelecer, como acontece com a *Rana esculenta* ou com o *Bufo marinus*.

O Dr. *Lutz*, (51) assignalou a acção irritante do *mucus* da *Leptodactylus pentadactylus*.

P. Bert, (52) foi o primeiro experimentador, que consignou o producto da raspagem da pelle da Rana esculenta como toxico para os passaros e muito irritante, quando applicado sobre as mucosas.

A. Dutartre, (53) confirmou estes resultados, emquanto que

Gidon, (48) teria observado que o mucus d'esta especie exerce acção diastolica. *Kobert*, (26) duvida do valor d'estes resultados.

Dehaut, (31) affirma que a *Rana temporaria* é desprovida de secreção toxica; mas *Mme. Physalix* cita trabalhos de *Leroy*, (54) segundo os quaes, o extracto alcoolico da pelle d'esta especie, conteria uma substancia de propriedades analogas ás da bufotalina.

A *Dendrobates tinctorius*, pequeno batrachio arboricola, possue segundo o testemunho de varios autores e viajantes uma secreção cutanea das mais activas, utilisada pelos indios do chaco columbiano, como veneno para suas flexas. *Saffray*, citado por *Alexandre Pagenstecher*, (55) diz que os indios apanham, por meio de uma folha, as Dendrobates, para evitar o contacto caustico de sua secreção cutanea e depois de as haverem espetado em um pedaço de madeira, aproximam-n'as do fogo. Os animaes, sob a acção do calor, cobrem-se de abundante secreção, que é colhida para ser applicada ás pontas das flexas. Um pequeno veado ferido por uma d'estas flexas morre em poucos minutos; o mesmo acontece ao tigre.

Escobar, (56) publicou em 1869 uma nota sobre este veneno, mas o trabalho de *Posada Arango*, (57) escripto um anno antes, é muito mais completo. Tratando o veneno pelo alcool, este ultimo autor obteve uma substancia alcaloidica, dotada das mesmas propriedades do veneno total, tendo verificado igualmente que ambos eram destituidos de acção por via gastrica.

Baseando-se sobre a opinião de varios autores, *Kobert*, (26) pensa que a acção d'este veneno é muito semelhante á do curare.

SEGUNDA PARTE

PESQUIZAS

Daremos aqui o relatorio de nossas pesquizas sobre as quatro principaes especies do genero Bufo, que se encontram no Brazil, e sobre alguns outros batrachios que tivemos a opportunidade de examinar.

Em muitos pontos, differem os nossos resultados dos que foram registados, pelos experimentadores europeus, o que pode ser attribuido a diversidade das especies estudadas e, em alguns casos, aos methodos artificiosos para obtenção dos venenos ou as substancias d'elle derivadas.

O genero Bufo tem representantes em todas as partes do mundo, com excepção unica de algumas ilhas do oceano Pacifico. Segundo *Nieden*, (50) encontram-se no Brazil sete especies de Bufo a saber: *B. marinus*, L.; *B. typhonius*, L.; *B. missionum* Blg.; *B. arenarum*, Hensel; *B. d'Orbignyi*, D. e B.; *B. crucifer*, Wied; *B. granulosus*, Spix.

A estas é necessario juntar mais duas especies recentemente descriptas pelo Dr. Lutz: (51)—O *B. paracnemis* e o *B. rufescens*.

As especies, d'este genero que estudamos foram: o B. marinus, o B. paracnemis, o B. arenarum e o B. crucifer.

B. marinus, tambem designado por *B. agua*, Seba ou *B ictericus* Spix, é uma especie de grande tamanho e muito commum no Brazil. Temos exemplares de differentes pontos do Estado de S. Paulo, do Paraná, de Santa Catharina, do Rio Grande do Sul, de Minas Geraes e do Rio de Janeiro. O dimorphismo sexual, n'esta especie é muito accentuado.

Femea: Comp. 16c; patas post. 20c; patas ant. 11c,5; cabeça 5c; paratoides 4c. A cabeça é bem desenvolvida, as paratoides ovaes. A côr geral é cinza amarellada, com numerosas manchas negras, formando um desenho irregular sobre o dorso e uma faxa mediana dorsal clara. A face ventral é de um branco sujo com manchas escuras assaz numerosas. O colorido e o desenho variam muito n'esta especie; alguns exemplares são extremamente escuros, com faxa mediana clara e faxa semelhante sobre as faces lateraes.

Macho: Menor do que a femea, medindo:—comp. 13c; patas post. 13c, 5; patas ant. 7c; cabeça 4c; paratoide 3c. A cor geral é amarello esverdeada. Toda a face dorsal é coberta de pequenas papillas.

A face ventral é amarello claro com manchas pardas mais ou menos visiveis.

B. arenarum. Especie menor do que a precedente, assaz semelhante no colorido e muito menos commum do que ella.

B. paracnemis, Lutz. Esta especie fôra até aqui confundida com o B. marinus, do qual se destingue, entretanto, por caracteres bem salientes. Attinge a um tamanho maior do que o do B marinus, apresenta um dimorphismo sexual muito menos accusado; o aspecto geral é mais volumoso, a cabeça mais curta, as paratoides menos salientes si bem que do mesmo comprimento, terminadas em ponta posteriormente; as patas relativamente menos longas. A côr geral é de um cinza-esverdeado, com algumas manchas escuras no dorso, que não formam um desenho como na especie com a qual o comparamos. A face ventral é de um cinza esbranquiçado, salpicado de pequininas manchas escuras. O macho e a femea têm grandes papillas dorsaes, largas principalmente numerosas na parte mediana do dorso. O macho não se distingue da femea senão por papillas da mesma natureza, mas um pouco mais abundantes e principalmente pela presença de um sacco vocal, muito desenvolvido e cujos tegumentos são mais pigmentados do que o resto do ventre.

Femea: comp. 20^{c}; patas post. 19^{c}; patas ant. 11^{c}; cabeça 4^{c},7; paratoides 6^{c}.

Macho: comp. 18^{c},5; patas post. 18^{c},5; patas ant. 9^{c},5; cabeça 4^{c},8; paratoides 5^{c}.

Esta especie é muito commum em todo o Estado de S. Paulo e Sul de Minas Geraes.

B. crucifer. Especie muito facil de se distinguir da precedente, por seu tamanho muito menor, suas paratoides muito reduzidas e uma linha escura, de bordos claros, situada no dorso, no sentido longitudinal. A côr geral da femea é de um cinzento pardo; a do macho amarello esverdeado. O ventre é cinza claro, salpicado de pontilhados escuros. A pelle da femea é coberta de finas granulações e a do macho de glandulas um pouco mais desenvolvidas.

Macho: comp. 6^{c},5; patas post. 9^{c},2; patas ant. 4^{c}; cabeça 2^{c},2; paratoides 0,^{c}8.

Femea: comp. 10^{c}; patas post. 11^{c},5; patas ant. 3^{c},5; cabeça 3^{c}; paratoides 1^{c},3.

E' uma especie commum no Estado de S. Paulo e nos Estados visinhos.

CAPITULO I

LOCALISAÇÃO DO VENENO. — ESTRUCTURA DAS GLANDULAS:

A secreção de veneno dos batrachios, elemento de defesa puramente passivo, é elaborada por formações glandulares dessiminadas por toda a superficie tegumentaria ou reunidas sobre certos pontos em saliencias mais ou menos volumosas.

No genero Bufo, estas glandulas são, de ordinario, extremamente numerosas, contribuindo para dar a estes animaes seu aspecto aspero e repugnante. O numero, a distribuição e a forma d'estas glandulas são extremamente variaveis, segundo a especie, o sexo e algumas vezes segundo os individuos. Nos machos do *B. marinus* e do *B. arenarum*, toda a superficie dorsal é coberta por granulações ou papillas muito numerosas e pequenas; nas femeas estas granulações são maiores e mais juntas.

Em todas as especies de Bufo, porém, observam-se em certos pontos da pelle, conglomerados de glandulas particularmente desenvolvidas. O mais importante d'estes, situado atraz da membrana do tympano, obliquo de dentro para fora, recebeu o nome muito improprio de parotidas ou melhor de paratoides (Boulenger), ainda que não tenha relação alguma com o apparelho digestivo. As paratoides são particularmente volumosas no *B. Marinus*, menos desenvolvidas no *B. paracnemis* e muito reduzidas no *B. crucifer*.

Além d'este grupo de glandulas, certas especies apresentam outros igualmente notaveis, como o tibial posterior, situado ao longo da tibia das patas posteriores e muito desenvolvido na femea do B. marinus e do B. paracnemis.

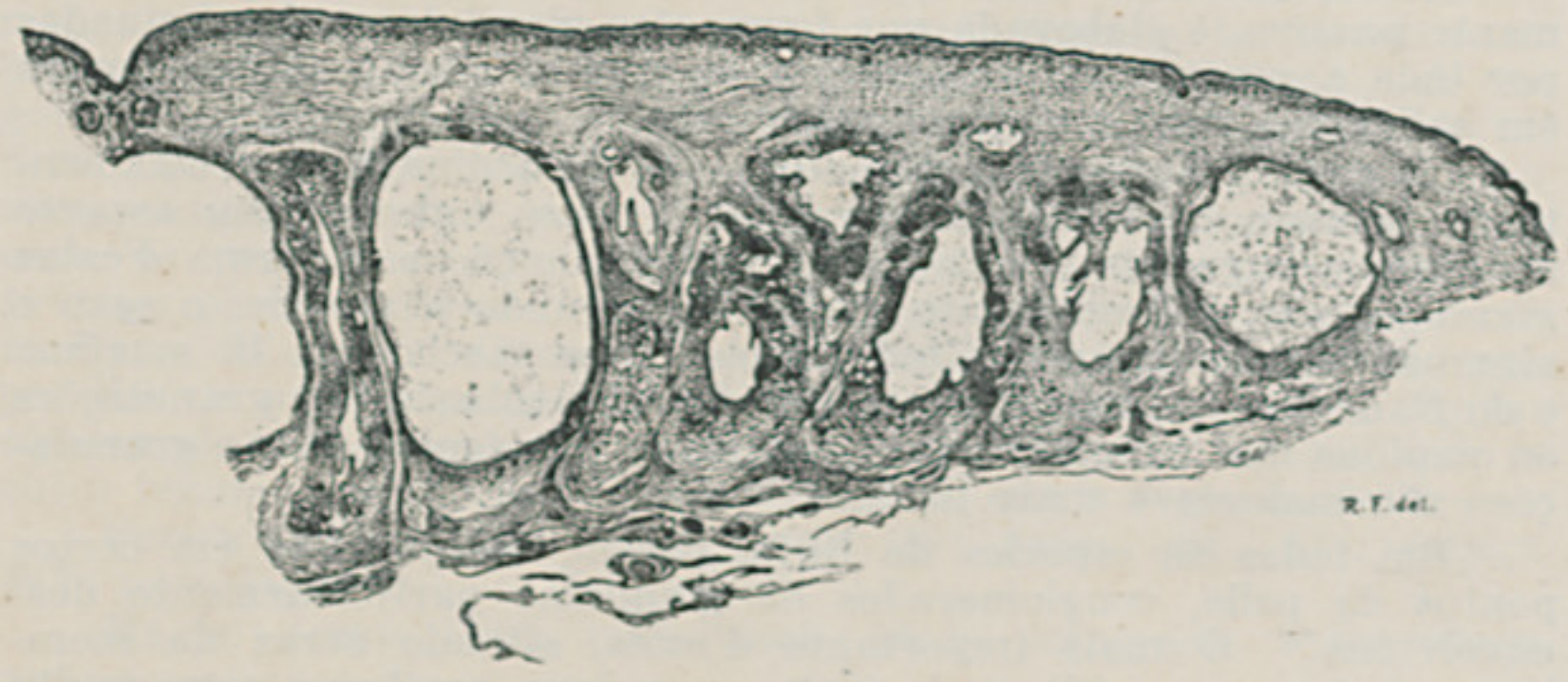
Todas estas verrugosidades têm a sua superficie crivada de pequenos orificios ou poros, que representam o papel de canaes excrectores do veneno. Uma pressão exercida sobre estas glandulas faz saltar pequenas gottas ou jactos de uma substancia cremosa ou leitosa (veneno) que, em certas circumstancias, podem ser projectadas com força a mais de 40ᶜ de distancia.

Leydig, (⁵⁹) que foi o primeiro a fazer um estudo detalhado sobre a estructura comparada dos tegumentos d'estes animaes, distingue, além das glandulas de veneno propriamente ditas, trez typos de glandulas, das quaes sómente duas se encontram nos batrachios do genero Bufo: pequenissimas glandulas redondas, muito numerosas, principalmente na superficie do animal mesmo sobre as paratoides, mas isoladas na face ventral; são as glandulas mucosas *d'Engelmann*, assim chamadas, por este autor, para as distinguir das glandulas de veneno ou granulosas;—finalmente, glandulas, formando nos dedos dos machos de muitos batrachios, e por vezes em outras partes do corpo, excrescencias corneas, de existencia transitoria, as excrescencias ou escovas nupciaes.

Nem todos os herpetologistas se acham de accordo em admittir estes diversos typos de glandulas. Assim *Calmels*, (⁶⁰) as filia a

um mesmo typo, cujo epithelio se differencia posteriormente, para o desempenho de funcções especiaes.

Um corte macroscopico de uma paratoide de B. marinus, revela uma massa eliptica de contorno superior irregular, bosselada, limitada pela epiderme, cavada de largas cavernas ovaes ou elipticas, perpendiculares a superficie da paratoide, e podendo attingir a 2—2,5 m. m. ou mais de diametro; são os accinos glandulares. A um



Corte de paratoide de Bufo marinus. Augmento 6 ×

fraco augmento estes accinos apparecem alojados na espessura do derma; alguns dentre elles são bem desenvolvidos, outros de formas irregulares, murchos, com as paredes em parte destruidas, deixando entre os tecidos visinhos, soluções de continuidade, onde se vêm numerosos leucocytos e hematias; são os accinos tendo já expulso o respectivo veneno e em via de destruição. Os accinos não alterados possuem membrana de natureza muscular lisa, sobre a qual repousam numerosos nucleos, sem que exista verdadeira camada epithelial continua; o interior dos accinos é occupado por uma secreção finamente granulosa, o veneno já elaborado. *Rainey* (19) foi o primeiro a assignalar a formação do veneno por fusão dos nucleos cellulares, o que permitte classificar estas glandulas no grupo das *holocrinas*. O accino é cercado de fibras musculares lisas, parallelas a suas paredes, se espessando em seu polo superior, onde formam um verdadeiro esphincter, descripto pela primeira vez por *Schultz*, (66) o qual se oppõe a sahida do veneno, explicando a projecção violenta d'este, quando se faz pressão sobre as paratoides; tambem, no estado de repouso, o canal excretor, em sua parte inferior, intradermica, é difficilmente reconhecivel; em sua parte superior, intra epidermica é constituido por uma penetração das cellulas da epiderme, sem indicação de revestimento proprio. O acino é cercado de uma riquissima rêde de capillares sanguineos e tambem segundo *Ranvier* (61) de lymphaticos e de nervos.

Na parte superior do derma, existem numerosas glandulas, pequenas, arredondadas, providas de um canal excrector muito distin-

cto: são as glandulas mucosas; são formadas de membrana propria, forrada de um epithelio cylindrico, cujas cellulas inferiores são muito altas e diminuem de altura para o polo da glandula; seu conteudo é hyalino, sempre desprovido de granulações.

A origem e o renovamento das glandulas têm sido muito discutidos. Segundo a maior parte dos autores, *O. Seeck*, (67) *Maurer*, (68) *Ancel*, etc. (69) as glandulas mucosas e granulosas, teriam origem no ectoderma e desenvolver-se-iam independentemente. Segundo *Mme. Physalix* (32), sua origem seria antes a folha superior do mesoderma. Para alguns autores, as glandulas granulosas derivam das glandulas mucosas, das quaes são typos differenciados. Alguns histologistas, entre os quaes recentemente *Shipley* e *Wisloki* (43) pensam que depois de haver expulso o seu conteudo, o acino granuloso se reabsorve pouco a pouco, sendo substituido por um novo acino formado a custa dos bulbos situados na base do antigo saco. Outros autores não acreditam no desapparecimento das antigas glandulas, admittindo antes que ellas sejam capazes de reformar o seu conteudo. Não sendo nossa intenção fazer o estudo histologico e embryologico das glandulas, para o que nos falta certamente a competencia de especialista, limitar-nos-emos a ligeira exposição que ahi fica, documentada por cortes de paratoides de B. arenarum, que a nosso pedido, fez o Dr. *Dorival de Camargo Penteado*.

Uma questão importante do ponto de vista pratico, é o mechanismo da expulsão do veneno. Dada a disposição das fibras musculares lisas em torno dos acinos das glandulas, a expulsão do veneno não se subordina a vontade do animal; de sorte que o sapo não pode, nas condições ordinarias, lançar a distancia seu veneno; com a pressão exercida sobre as glandulas, a resistencia das fibras musculares vencida, surge o veneno do poro excrector. Tratando-se de um conglomerado volumoso de glandulas, como nas paratoides, em que as fibras musculares são abundantes, offerecendo consequentemente maior resistencia, uma forte pressão exijida para esta ser vencida, projectará com violencia o veneno a certa distancia do animal. E' o que acontece quando se colhe o veneno das paratoides por pressão sobre estas; o veneno é muitas vezes projectado a mais de 50c podendo alcançar os olhos do operador. O mesmo resultado pode-se produzir, quando se toma o corpo de um sapo em extensão forçada; a pressão é exercida, n'este caso, sobre as paratoides pela forte tensão da pelle circumvisinha a localisação das glandulas.

Certas excitações chimicas, podem, por acção reflexa, provocar a excreção do veneno, que néstas condições, vem sempre acompanhado por maior dose de secreção mucosa.

Ekhard, (62) demonstrou que a excitação electrica dos nervos produz uma abundante secreção de veneno, emquanto que *Weiss*. (63) notou que a secção dos nervos impede mesmo a sua formação. *Physalix* (23) de colloboração com *Contrejean* (13) obteve igualmente uma forte secreção de veneno e de mucos por excitação electrica dos lobos, opticos, mas a injecção de pilocarpina, não produzia, segundo este autor, senão a secreção mucosa.

Segundo *Kobert*, (26) existeriam, na medulla, outros centros de excitação da secreção glandular. O chloreto de baryo produzia uma secreção generalisada do veneno, emquanto que o curare a paralysaria. A atropina seria inactiva.

O interesse d'estas pesquizas é puramente theorico, pois o melhor meio de obter-se o veneno, é o que empregamos, pela compressão das paratoides ou dos conglumerados das glandulas tibiaes posteriores.

CAPITULO II

PROPRIEDADES PHYSICO-CHIMICAS DO VENENO

Extrahido das paratoides, o veneno se apresenta sob o aspecto de um liquido muito espesso, leitoso ou cremoso, de côr branco puro (Bufo marinus) ou amarello carregado, (Bufo paracnemis) de cheiro fortemente aliaceo no B. crucifer, e quasi inodoro nas outras especies estudadas.

A variação de consistencia, que se observa de um para outro individuo, ou até no mesmo exemplar, nas differentes extracções, parece subordinada ao gráo de elaboração da secreção, notando-se que ella se apresenta, de ordinario, muito mais fluida depois de numerosas extracções, podendo mesmo reduzir-se a um liquido opalescente, quasi desprovido de toxicidade.

Em contacto com o ar, secca-se rapidamente transformando-se em uma massa dura translucida, de aspecto corneo ou resinoide. Na estufa a 37° essa seccação se faz rapidamente, reduzindo-se a 1/3 do peso do veneno fresco.

A reacção dos solutos em agua distillada, ou sôro physiologico, é fracamente acida ao tournesol; nas soluções feitas em agua de cal é neutra.

Recentemente extrahido das glandulas, dissolve-se lenta, mas completamente em agua distillada. E' menos soluvel no sôro physiologico ou nas soluções salinas fracas, incompletamente soluvel no alcool absoluto, no ether, no chloroformio, na acetona, no oleo de oliva e na glycerina.

O veneno secco se dissolve com muito mais difficuldade.

Bufo marinus—As soluções em agua distillada, são de aspecto gommoso, opalescente, tomando, depois de algum tempo, um bellissimo tom roseo, que se transforma em côr pardacenta pelo envelhecimento. Esta mudança de côr que se opera lentamente, na temperatura Normal, dá-se rapidamente pelo aquecimento em temperatura elevada ou pela esterilisação a 120°.

As soluções aquosas filtram em papel com certa difficuldade, perdendo sua opalescencia pela simples addição de um pouco de alcool ou de ether.

Na agua de cal, o veneno se dissolve com muito mais difficuldade, tomando mais rapidamente, depois de filtradas as suas soluções, a côr pardacento escura, com separação de um precipitado escuro.

Afim de determinar o gráo de solubilidade no alcool absoluto, no ether, no chloroformio e na acetona, realisamos numerosas experiencias, tanto com o veneno fresco como com o veneno secco. No intuito, porém, de eliminar a causa de erro attribuivel á agua do proprio veneno, mencionaremos apenas a mais rigorosa d'estas experiencias, realisada com o veneno cuidadosamente seccado:

—5 de Maio de 1925.—Em uma serie de frascos, põe-se em contacto 100 c. c. de cada um destes dissolventes com 1 gramma de veneno secco; a 15 de Maio, depois de 14 dias de contacto, filtra-se o conteudo de cada um dos frascos, evaporando-se-o separadamente. O residuo secco e pesado para cada dissolvente foi o seguinte:

Alcool absoluto: (rigorosamente deshydratado). Em 2 dias de contacto, o alcool toma uma côr amarella que escurece progressivamente; o residuo secco, apresenta-se sob o aspecto de laminas pardas avermelhadas, pesando 142,5 mg.

Ether: Mudança alguma na côr do dissolvente; residuo de aspecto oleoso, amarellado, pesando 30 mg.

Chloroformio: Residuo de aspecto oleoso, pesando 15 mg.

Acetona: Residuo oleoso, amarello, pesando 12 mg.

O veneno dissolvido e retomado respectivamente por novas e iguaes porções dos dissolventes, renovados de 15 em 15 dias. A 21 de Novembro a quantidade global de veneno, dissolvido pelo alcool, era de 250 mgs. e um anno depois, a contar do começo da experiencia, se elevava a 290 milligs.

As soluções aquosas de veneno, não coagulam, nem pelo calor, nem pelo reactivo de Esbach, nem pelos outros precipitantes da albumina; dão, entretanto com alguns agentes chimicos reacções coloridas que vamos registrar:

Com o acido azotico fumegante em excesso, as soluções aquosas diluidas a 2 °/°° dão uma coloração violeta clara; com soluções concentradas a 1 °/°, uma coloração vermelha intensa, que desapparece dentro de algumas horas a frio, mais rapidamente a quente. Esta reacção permitte revelar a presença de quantidades minimas de veneno.

1 c.c.	de	HAZO	3	mais	1	milligr.	de	veneno	—	coloração	violeta	carregado em 1 min.
»	»	»	»	»	0,5	»	»	»	»	»	claro	» » »
»	»	»	»	»	0,15	»	»	»	»	»	muito claro	» » »
»	»	»	»	»	0,1	»	»	»	»	»	fraco	» » »
»	»	»	»	»	0,05	»	»	»	»	»	clara em 5 minutos	
»	»	»	»	»	0,01	»	»	»	ligeira coloração violeta em 30			»

Com o acido sulfurico concentrado e solução fraca de veneno a 2 °/°°, coloração violeta esverdeado claro; com a solução forte a 1 °/° annel amarello, depois verde claro, verde carregado e roxo; por agitação todo o liquido, torna-se roxo. Estas reacções são estaveis.

Fausto e Kobert indicaram para o veneno do sapo da Europa, a reacção que Salkowski descobriu para cholesterina. Em consequencia da fraca solubilidade do veneno das nossas especies, no chloroformio, não obtivemos senão um annel amarello no limite do chloroformio com o acido sulfurico e uma coloração amarella mais ou menos accentuada do acido. Moodificamos então do modo seguinte esta reacção; o veneno fresco é collocado em uma capsula com o chloroformio; depois de haver rejeitado o excesso d'este liquido, ajuntam-se algumas gottas de acido sulfurico; produz-se então coloração amarella-esverdeada, dpois verde mais carregado no acido, emquanto que o veneno se tinge em azul esverdeado. Nas mesmas condições a cholesterina se tinge de vermelho vivo e o acido torna-se verde-flurescente.

Uma outra reacção muito mais sensivel do que a precedente é a que se obtem com o sulfato de ferro. Com um traço d'este reactivo, as soluções de veneno apresentam uma bella coloração violeta sombria, que desapparece lentamente a frio e rapidamente a quente. Um ligeiro excesso de reactivo produz apenas um precipitado amarello esverdeado, mais ou menos abundante. Esta reacção permitte revelar traços de veneno inferiores a 0,01 mg. E', porém, muito delicada em manejar, podendo ser embaraçada ou impedida por impureza, mesmo em quantidades infimas.

Com uma solução de molybdato de ammoneo, obtem-se uma coloração amarella; si a esta mistura junta-se um pouco de acido sulfurico concentrado, obtem-se rapidamente um annel azul escuro; pela agitação, todo o liquido torna-se azul intenso. Esta reacção é das mais sensiveis.

Com o acido chlorhydrico, e acido acetico a frio ou a quente, não ha reacção.

Com a solução normal de soda ou com ammoniaco, as soluções de veneno perdem a opalescencia e tomam uma coloração amarellada.

O nitrato de prata em contacto com a solução de veneno reduz-se rapidamente, com a formação de prata colloidal. Com a tintura de iodo a frio, abundante precipitado, soluvel a quente, tornando-se a solução de côr vinhosa; pelo resfriamento reapparece o precipitado. Com o sulfato de cobre coloração verde.

Algumas gottas de solução de acido chromico provocam um abundante precipitado amarello. Com o perchlorureto de ferro precipitado soluvel em um excesso de reactivo. Não precipita com o acetato de chumbo, nem com o hyposulfito de sodio. O veneno possue propriedades reductoras muito energicas. A solução de permanganato de potassio a 1 °|° é rapidamente descorada.

1 c c. de sol. de veneno	a 1/1000	mais 5 gottas de MnO^4K a 1/1000 - Descoloração imme.
» » » » »	» 1/10000	» » » » » » » » »
» » » » »	» 1/100000	» » » » » » » » em 30 min.
» » » » »	» 1/1000000	» » » » » » » » em 1 hora e 30 miinutos

Bufo paracnemis.—O veneno, in natura, é amarello alaranjado; as soluções ligeiramente coloridas de amarello. As proprie-

dades geraes de solubilidade, mudança de côr sob a influencia do tempo, do calor,, etc., são identicas as do B. marinus; algumas reacções são, entretanto, differentes: A solução fraca de veneno a 2 °|°, dá com acido azotico, coloração violeta pallido, quasi roseo; a solução forte a 1 °|° com o mesmo reactivo dá coloração vermelho intensa semelhante a do B. Marinus, desapparecendo igualmente, em algumas horas, a frio e mais rapidamente a quente. Com o acido sulfurico concentrado, a solução fraca a 2 °|°° dá uma bella coloração verde claro; com a solução, forte a 1 °|°, annel amarello, depois vermelho de mais a mais intenso, communicando-se a todo o liquido; estas côres são estaveis. Na reacção de Salkowsky, modificada, como já o indicamos, o veneno toma a côr rosea, passando ao vermelho, emquanto que o acido se torna verde amarellado e depois verde carregado. Com o molybdato de ammonio e o acido sulfurico, dá coloração verde claro, reacção esta extremamente sensivel.

Bufo arenarum e *Bufo crucifer*.—As reacções com o veneno d'estas duas especies, não foram estudadas em detalhe. Verificamos, entretanto, que as principaes reacções são identicas ás do veneno do B. marinus.

CAPITULO III

ACÇÃO PHYSIOLOGICA

Emquanto que os venenos das serpentes, das aranhas e dos escorpiões, de natureza albuminoide, agem exclusivamente por via parental, o veneno do sapo é dotado da propriedade de penetração rapida atravéz de todas as mucosas, podendo determinar por essa via, em quasi todas as especies animaes, a morte, com a mesma energia de acção que a determinada por injecções subcutanea ou endo-venosa.

O modo particular de acção d'este veneno, sua differenciação das outras peçonhas, tanto por sua natureza chimica, como por sua resistencia aos agentes physico-chimicos, imprimem-lhe uma caracteristica especial, da qual resulta, como nota principal, a sua adaptação aos fins da defeza do animal contra os seus inimigos naturaes. De facto não foi para ser injectado que a secreção toxica do sapo foi creada; foi especialmente para actuar sobre as mucosas, no momento do animal ser atacado, que a natureza lhe deu esse potente apparelho protector representado pelo conjuncto de glandulas disseminadas pela superficie cutanea.

Foi procurando nos aproximar das condições naturaes de acção do veneno, que mais attenção prestamos ao estudo d'este, por via mucosa, o que nos permittio assignalar factos extremamente interessantes.

Assim, depois de indicar as propriedades physiologicas d'este veneno e de estudar rapidamente sua acção por via parental, deter-nos-emos mais especialmente em relatar as nossas pesquizas sobre a sua acção atravez das mucosas.

PROPRIEDADES GERAES DO VENENO:

E' um veneno essencialmente neuro-toxico, provocando a principio, uma phase curta de agitação, seguida de depressão, depois de paralysia, no começo posterior, quando o veneno é introduzido na circulação geral, de violentas convulsões tonicas e de morte por parada da respiração.

Uma forte tachycardia inicial e acceleração consideravel dos movimentos respiratorios constituem a regra; mas o coração é o ultimo orgão paralysado, só parando depois da cessão completa dos movimentos respiratorios. Observa-se sempre forte hypersecreção salivar, lacrymal e nasal, nauseas, vomitos nos animaes susceptiveis d'este reflexo, diarrhéa, myosis muito accusada das pupillas, hyperthermia de 1 a 2 gráos, seguida de hypothermia tardia, morrendo o animal em quasi estado de algidez.

As injecções hypodermica ou intramuscular determinam sempre forte edema hemorrhagico, acompanhado de vasta necrose local.

A dose minima mortal, para uma especie dada, por via endovenosa, differe pouco da minima mortal por via intramuscular; mas a morte é ordinariamente muito mais lenta no segundo caso. Com uma dose elevada de veneno a morte pode ser fulminante, sem que haja tempo de observar os symptomas habituaes. Com uma dose um pouco inferior a minima mortal, os animaes se restabelecem depois de apresentar phenomenos graves, entre os quaes o de paralysia quasi completa.

A acção physiologica do veneno, das quatro especies estudadas, é sensivelmente a mesma, e comquanto as nossas experiencias tenham sido realisadas principalmente com o de B. marinus e o de B. paracnemis, temos verificado os pontos mais importantes de nossas pesquisas com o veneno de B. arenarum e B. crucifer.

EXPERIENCIAS POR VIA PARENTAL NOS PRINCIPAES ANIMAES DE LABORATORIO:

Pombo:—por injecção endovenosa, no pombo, observa-se uma phase curta de estupor, depois o animal vacilla, deita-se e tomado de uma violenta crise de convulsões tetaniformes, com opisthotonus, rola muitas vezes sobre si mesmo e succumbe em alguns minutos. Si a dose é inferior a minima mortal, consegue ainda voar, ou pousar, entretanto, cambaleia, deita-se, é tomado de violentos accessos de tosse e de esforços para vomitar; depois, melhora aos poucos para se restabelecer em seguida.

Veneno fresco dissolvido em agua distillada completado o volume de 2 c. c. *por sôro physiologico*:

Pombo 89—Recebe 2,5 mg. em 2 c. c. por via venosa. Morte em 1 minuto.

Pombo 140—Recebe 1,25 mg. em 2 c. c. por via venosa. Vacilla e cahe quasi que immediatamente, nauseas, vomitos; começa a melhorar ao fim de 10 minutos, restabelecendo-se no fim de duas horas.

Pombo 27—Recebe por via intramuscular 2,5 mg.; não se observam symptomas immediatos; no dia seguinte apresenta forte edema hemorrhagico, fetido na região circumvisinha ao ponto de inoculação; morte em menos de 24 horas.

Com veneno secco, dissolvido em sôro physiologico, os resultados são perfeitamente comparaveis aos precedentes:

Pombo 99—Recebe 0,5 mg. em 2 c. c. na veia; violentas crises tetanicas, morre em convulsões em dois minutos.

Pombo 136—Recebe 0,3 de mg. em 2 c. c. na veia; logo depois cambaleia e deita-se; vomitos repetidos. Restabelece-se no dia seguinte.

Pombo 157—Recebe, 0,2 de mg. em 2 c. c. na veia; logo após a injecção deita-se, vomita restabelecendo-se no dia seguinte.

Pombo 102—Recebe 0,5 mg. em 2 c. c. por injecção intramuscular; nenhum symptoma immediato; na manhã seguinte grande edema local hemmorrhagico; morte.

Coelho—O coelho é igualmente muito sensivel a este veneno; os symptomas são muito semelhantes aos observados no pombo; depois de uma phase de estupor começa uma serie de violentas convulsões e crises tetaniformes, em que o animal deitado de lado, pode apresentar o corpo violentamente dobrado em arco de circulo; depois da emissão de gritos agudos, morre o animal.

Veneno fresco dissolvido em agua distillada:

Coelho 28—peso 1000 grs.—Recebe 2,5 mg. em 2 c. c., na veia. A principio triste e immovel; depois forte periodo de excitação, normalisando-se ao fim de duas horas.

Coelho 21—peso 1050 grs.—Recebe 5 mg. em 2 c. c. na veia; morte em 3 minutos.

Coelho 11—peso 950 grs —Recebe 1,5 mg. na veia; morte em 1 ½ minuto; forte constricção pupillar.

Veneno secco dissolvido em sôro physiologico:

Coelho 6—peso 1200 grs.—Recebe 2 mg. em 2 c. c. por injecção endovenosa. Convulsões muito violentas, morte em 2 minutos.

Coelho 88—peso 1000 grs.—Recebe 1 mg. em 2 c. c. na veia; paralytico, dyspneico, cahe sobre o flanco. Uma hora depois procura levantar-se; trez horas depois apenas paresia posterior; completamente restabelecido na manhã seguinte.

Coelho 52—peso 1800 grs.—Recebe 1,5 mg. na veia, em 2 c. c.; paralysia quasi que immediata; na manhã seguinte ligeira paresia posterior; normal em 48 horas.

Cobaio:—Animal assaz sensivel; depois da injecção intramuscular, dôr mais ou menos intensa, segundo a dose, dôr que o animal manifesta por gritos e por agitação; depois sobrevem edema consideravel, morrendo o animal em 24 horas com doses visinhas das m. mortaes.

Veneno fresco dissolvido em agua dixtillada:

Cobaio 9—peso 350 grs.—Recebe 2,5 mg. em 2 c. c. por injecção intramuscular na coxa, dôr intensa 5 minutos depois da injecção, acalmando-se lenta e progressivamente. O animal sobrevive, sem outro symptoma, além de um ligeiro edema local, sem ulceração.

Cobaio 15—peso 370 grs.—Recebe na coxa, por injecção intramuscular, 5 mg. em 2 c. c. Dôr seguida de ligeira asthenia. Encontrado morto na manhã seguinte, com um edema volumoso no lugar da injecção.

Veneno secco dissolvido em sôro physiologico:

Cobaio 27, peso 310 grs.—Recebe 1 mg. na coxa; gritos, forte agitação; na manhã seguinte edema notavel, reabsorvendo-se, sem ulceração.

Cobaio 121, peso 340 grs.—Recebe 2 mg. na coxa; edema muito forte, durante 48 horas curando-se sem necrose.

Ratos brancos e camondongos:—Os symptomas são semelhantes aos observados no cobaio: dôr forte, seguida de asthenia, edema consideravel e morte lenta.

Rato branco 3—peso 60 grs.—Recebe 0,5 mg. de veneno secco dissolvido em 2 c. c. de sôro physiologico, por injecção intramuscular; agitação immediata e pequeno edema local, sem necrose. Sobreviveu.

Rato branco 5—peso 54 grs.—Recebe 2 mg. de veneno secco em 2 c. c. de sôro physiologico, por injecção intramuscular; forte edema começando de 4 a 5 horas depois de injecção; morte em 48 horas.

Camondongo, peso 25 grs.—Recebe 0,5 mg. em 1 c. c. de sôro physiologico por injecção intramuscular; dyspnéa, paresia, e depois paralysia; normal na manhã seguinte. (1).

Os animaes de sangue frio; são igualmente sensiveis a este veneno por via intramuscular. Mencionaremos apenas duas esperiencias feitas com a cascavel—Crotalus terrificus.

Crotalus terrificus de 40 c. de comprimento.—Recebe 2 mgs. de veneno, em 1 c. c. por injecção intramuscular; ligeira phase de excitação, paresia; 3 minutos depois da injeccão convulsões violentas. O animal permanece todo contorcido, rigido, com a bocca aberta; o relaxamento muscular se produz; o coração bate ainda durante alguns instantes, parando definitivamente em 4 minutos.

C. terrificus de 40 c. de comprimento.—Recebe 1 mg. em 1 c. c. por injecção intramuscular; ligeira phase de excitação, fica calma, durante 5 minutos; paralysia a principio posterior; convulsões tonicas violentas em 15 minutos depois da injecção; relaxamento muscular; o coração pára em 26 minutos.

ACÇÃO SOBRE AS MUCOSAS:

Ao contrario dos venenos ophidicos e arachnidicos, o dos batrachios é como dissemos, dotado de uma facilidade extrema de penetra-

---

(1) Na nota previa sobre o veneno dos batrachios (Brazil Medico 26-9-925), deve-se corrigir a minima mortal para o camondogo que por erro typographico sahio um pouco superior a 5 mg. ao envez de um pouco superior a 0,5 mg.

ção atravez de todas as mucosas, penetração comparavel a do acido cyanhydrico e seus derivados pela rapidez e energia com que porduz a morte nos animaes em experiencia.

Esta rapidez de acção despertou desde logo nosso interesse, nos levando a fazer muitas series de experiencias, visando as differentes mucosas—buccal; gastro-intestinal, occular, nasal, em toda a serie zoologica.

Os factos, assim assignalados são muito interessantes, sendo para admirar, que não tenham sido, anteriormente, objecto de estudos mais aprofundados.

Encontra-se na litteratura a indicação, muitas vezes repetida, de que o veneno, de sapo e o de salamandra podem determinar a morte, por via digestiva, em algumas especies animaes, como o cobaio, o lagarto, o coelho, o cão e certos passaros, occasionando igualmente accidentes mais ou menos graves em alguns outros; que depositado sobre a cornea provoca uma ophtalmia mais ou menos duravel; isto, porém, sem que os experimentadores tenham prestado uma attenção especial ao assumpto, emprehendendo pesquisas na altura da importancia dos factos observados.

Os symptomas observados são assaz variaveis, segundo a mucosa em que se faz a applicação do veneno; pode-se, entretanto, affirmar que, em todos os casos dominam os phenomenos nervosos, como acontece nos envenenamentos determinados por via parental; excitação inicial, seguida de paralysia e de violentas convulsões tonicas; a estes symptomas, se vem juntar outros, quer de natureza reflexa ou devidos a acção directa sobre os centros nervosos, como nauseas, vomitos, tosse, salivação intensa, quer provocados pela vaso constricção local, ou a simples acção irritante do veneno, como ischemia, conjunctivite, keratite, edemas, etc. O facto, porem, mais impressionante é a rapidez de penetração do veneno e a exiguidade das doses capazes de fulminar os animaes. Assim, um coelho, que recebe por via oral de 80 a 90 milligrammas de veneno fresco, dissolvidos em 3 c. c. de agua distillada, morre em alguns segundos, muitas vezes, mesmo, antes de haver recebido as ultimas porções do toxico.

Uma tal rapidez de acção só nos parece comprehensivel, por uma grande affinidade de veneno para os elementos nervosos. Parece que depositado sobre a mucosa, o veneno, em consequencia de sua affinidade, se fixa immediatamente sobre os filetes nervosos atravez dos quaes alcança os centros nervosos, determinando os phenomenos graves e fulminantes que observamos.

A seguinte experiencia falla a favor d'esta explicação: sobre o globo ocular de um coelho, deposita-se uma certa quantidade de veneno fresco *in natura;* rapidamente o animal apresenta-se paretico, hemiplegico do lado correspondente ao globo ocular em que se depositou o veneno; e a paralysia se completa, morrendo o animal em convulsões tetaniformes em 30 ou 40 minutos.

Além desta, fizemos outras experiencias, em que ficou demonstrada a fixação do veneno sobre o tecido nervoso.

Dois cerebros de cobaio, pesando 6,275 grs, foram triturados com 12,50 mgs de veneno de *Bufo marinus;* proporção de veneno para o tecido nervoso 2 mgs. por gramma.

Durante 3 horas ficam, em contacto, veneno e substancia nervosa, depois do que junta-se 12 c. c. d'agua distillada e filtra-se. 1 c. c. do filtrado corresponde a 1 mg. de veneno. Com elle fizemos a seguinte experiencia:

Pequena Lachesis lanceolatus recebe 0, c. c. 2 por via gastrica. Não apresentou symptomas de envenamento. Pequena lachesis lanceolatus recebe 1 c. c. Não apresentou symptomas.

Testemunha.—Pequena Lachesis lanceolatus, recebe por via gastrica, 1 mg. do mesmo veneno, sem ter estado em contacto com o tecido nervoso. Convulsões dentro de 1 minuto, vomitos e morte em 50 minutos. ..

Pequena Lachesis lanceolatus recebe, por via gastrica uma pequena porção da substancia cerebral, que estivera em contacto com o veneno e fora separada do liquido por centrifugação.—Convulsões em 1 minuto e morte em uma hora.

Repetimos esta experiencia com cerebro de coelho, empregando veneno na proporção de 5 mgs. por gramma de tecido nervoso. N'esta proporção verificou-se que só em parte foi fixado o veneno.

Todos os animaes, tanto os de sangue quente, como os de sangue frio, em que temos experimentado o veneno sobre as mucosas, mostraram-se extremamente sensiveis: mesmo os ophidios, assignalados por Mme. Physalix, como particularmente resistentes, capazes de engolir impunemente volumosos sapos, revelaram-se, ao contrario, de uma tal sensibilidade, que chegamos a tomar certas especies de serpentes venenosas (pequenos Crotalus e Lachesis) muito abundantes nos nossos serpentarios, como reactivos vivos nas pesquizas que emprehendemos sobre este veneno.

MUCOSA DIGESTIVA. Nas primeiras experiencias que realisamos, por via digestiva empregamos o veneno, *in natura*, não tardando em verificar, o inconveniente do methodo que nos proporcionava resultados variaveis, segundo a consistencia muito variavel do producto de secreção.

Com os solutos de veneno, quer em agua distillada, quer em sôro physiologico, os resultados são muito regulares, tendo-se o cuidado de trabalhar com animaes em jejum. Com o estomago cheio, uma parte do veneno é absorvido pelo bolo alimentar, difficultando o contacto sobre a mucosa, falseando, consequentemente os resultados.

Na maior parte das experiencias, empregamos o veneno dissolvido em agua distillada, de modo que a dose a administrar estivesse contida em 2 a 3 c. c. de vehiculo depositando gotta a gotta o soluto na lingua do animal, em ordem a facilitar-lhe os movimentos de deglutição. Nos reptis e batrachios a solução de veneno era directamente levada, por meio de uma pipeta ao estomago do animal. A fixação ou absorpção do veneno, se faz naturalmente atravez de todas as mucosas com que entra em contacto, da bocca, pharynge e estomago.

Os symptomas começam muito rapidamente, mesmo com as doses muito visinhas da minima mortal; salivação abundante, tosse, secreção nasal, grande máo estar por espasmos localisados na gar-

ganta, que os animaes em experiencia denunciam, pelos esforços que empregam em retirar d'ahi um obstaculo imaginario; excitação violenta, dores muito fortes, manifestadas, segundo os meios peculiares a cada especie; depois nauseas, vomitos nas especies suceptiveis, vertigens, perturbações respiratorias e circutatorias, depressão extrema, paresia, crises convulsivas espasmodicas, com periodos de remissão durante os quaes o animal pode levantar-se e andar, finalmente paralysia e morte.

Eis alguns de nossos protocollos:

Cão—Especie muito sensivel.

Cão n.º 2—de 1 kilo, de 3 mezes de idade, recebe 200 mgs. de veneno pastoso; immediatamente começa a babar abundantemente; baba espessa e espumosa; vomitos, completamente paralytico em 4 minutos; crises convulsivas tetaniformes, opisthotonos, uivos inteiramente inérte 8 minutos depois da ingestão do veneno, com raros movimentos respiratorios; o coração, em 12 minutos a contar do inicio da experiencia, pára.

Gato—animal extremamente sensivel.

Gato n.º 1—peso 350 grs. com 6 semanas, recebe 20 mgs. de veneno em 2 c. c. d'agua distillada; baba abundante, vomitos repetidos; 10 minutos depois da ingestão do veneno começa uma serie de violentas convulsões tonicas, acompanhadas de opisthotenos e de tremores com intervallos de repouso, durante os quaes pode o animal levantar-se e andar; estas crises tornam-se cada vez mais frequentes morrendo o animal em uma d'ellas em duas horas e 15 minutos.

Gato n.º 2—peso 340 grs. com 6 semanas, recebe 10 mgs em 1 c. c. de agua distillada; mesmos symptomas que o precedente; 5 horas depois, as crises convulsivas começam a se espaçar e o animal se restabelece no dia seguinte.

Cobaio—Muito menos sensivel do que o cão e o gato. ..

Cobaio 210—peso 350 grs.—Recebe 150 mgs. de veneno pastoso; 5 minutos após accesso de tosse continua; paralytico 10 minutos depois; violentas convulsões ao fim de 1/4 de hora; completamente paralytico dentro de uma hora; morte em 6 horas.

Cobaio 140—peso 170 grs.—Recebe 100 mgs. de veneno pastoso, paraplegico em 40 minutos, paralytico em 1 hora e meia; morte durante a noite.

Cobaio 25—peso 360 grs.—Recebe 50 mgs. de veneno pastoso; forte paresia; completamente restabelecido no dia seguinte.

Cobaio 285—peso 320 grs.—Recebe 40 mgs. de veneno em 4 c. c. de agua distillada; 10 minutos mais tarde paresia, tremores violentos; paralytico em 20 minutos; uma hora depois recebe mais 20 mgs.; tremores cada vez mais violentos, sem convulsões; restabelecido no dia seguinte.

Cobaio 271—peso 390 grs.—Recebe 80 mgs. de veneno em 4 c. c. de agua distillada; violenta agitação immediata, dores, gritos, tremores, depressão; paralytico dentro de uma hora, morte 6 horas depois.

Coelho—Sensibilidade comparavel á do cobaio.

Coelho 6—peso 1350 grs.—Recebe 90 mgs. de veneno pastoso; paretico em 10 minutos, paralytico em 25 minutos, com fortes tremores espasmodicos;

dentro de hora e meia opisthotonos, seguido de crises tetaniformes; na manhã seguinte, paresia sem tremores; restabelece-se em 48 horas.

Coelho 24—peso 1500 grs.—Recebe 90 mgs. de veneno em 4,5 c. c. de agua distillada; violentas crises tetaniformes e morte em 2 minutos em opisthotonus.

Coelho 33—peso 1230 grs.—Recebe 90 mgs. em 4,5 c. c. de agua distillada; symptomas immediatos de paresia, depois de paralysia posterior e quadriplegia em 2 minutos; morte em sete minutos.

Coelho 434—peso 1200 grs.—Recebe 60 mgs. em 3 c. c. de agua distillada; 5 minutos depois forte agitação, paralytico em 30 minutos; restabelecido no dia seguinte.

Coelho 327—peso 1300 grs.—Recebe 50 mgs. em 2,5 c. c. de agua distillada; paresia passageira; parece normal depois de 16 horas; recebe então 30 mgs. em 1,5 c. c.; morte em 2 minutos.

Pombo—Muito sensivel ao veneno.

Pombo 12—Recebe 10 mgs. em 1 c. c. de agua distillada; agitação seguida de convulsões, de paralysia, de regidez tetanica no prazo de 5 minutos; morte em 17 minutos.

Pombo 16—Recebe 5 mgs. em 1 c. c. de agua distilada; 12 minutos depois vomitos repetidos, opisthotonus; convulsões e paralysia em 30 minutos; morte em uma hora.

Pombo 176—Recebe 5 mgs. de veneno em 1 c. c. de agua distillada; cahe em seguida paralytico; vomitos violentos em 12 minutos; regeitando todo o veneno, depois de que se restabelece rapidamente.

O camondongo branco é muito sensivel.

Camondongo de 24 grs.—Recebe 1 mg. em 0,2 c. c. de agua distillada; convulsões, opisthotonus, morte em 1 minuto.

Morcego—sp.—Recebe 2 mgs. em 0,4 c. c. de agua distillada; morte immedita em convulsões.

VIA RECTAL:

A administração do veneno por via rectal é muito menos severa do que o por via oral, provavelmente em consequencia das evacuações frequentes e não por uma sensibilidade menos pronunciada da mucosa rectal; os symptomas geraes são os mesmos que se observam nos envenenamentos determinados por outras vias; os symptomas locaes consistem em irritação intensa e prolapso do recto, tenesmos e dejecções diarrheicas.

Gato n.º 3—peso 391 grs.—Recebe por via rectal 10 mgs. em 1 c. c. de agua distillada; 10 minutos mais tarde, vomitos, diarrhea; uma hora mais tarde, recebe mais 10 mgs.; ligeira crise convulsiva tetaniforme, tremores, vomitos, diarrhea abundante, prolapso do recto. Restabelecido na manhã seguinte, recebe mais 10 mgs. de veneno; mesmos symptomas, restabelecendo-se em 24 horas; as fezes diarrheicas, porém, persistem durante dois dias.

MUCOSA OCULAR:

Com as soluções fracas de veneno facilmente eliminadas ou attenuadas pela secreção lacrimal, observam-se tão sómente phenomenos locaes, ischemia e irritação mais ou menos pronunciada da mucosa. Um pouco de veneno, *in natura*, collocado sobre o globo ocular determina rapidamente accidentes locaes e geraes, e morte.

Coelho 20—Recebe ás 9 horas e 50 minutos uma gotta de solução fraca de veneno no globo ocular direito; abundante secreção lacrimal immediata, seguida de ischemia da mucosa e de congestão da iris; a pupilla é retrahida, immovel e insensivel a luz; a cornea opaca, secca e despolida; 15 minutos depois da applicação do veneno, o animal está cego do lado direito. A's 10 horas e 5' nova applicação de uma gotta de veneno sobre o olho esquerdo; os mesmos symptomas; mas o animal fica immovel e paretico. A's 12 horas e 45', a pupila não está mais em myosis tão pronunciada. O animal restabelece-se lentamente, sem accidente local.

Coelho 40—peso 1235 grs.—Recebe, ás 10 horas, cerca de 100 mgs. de veneno pastoso sobre o globo ocular esquerdo; ás 10 horas e 45', elevação thermica (39° 4), pupilla muito contrahida, ligeira paresia, dyspnéa; ás 11 horas, hemeplegia esquerda completa, o animal procurando levantar-se sobre as patas oppostas cahe sempre sobre o lado paralytico; ás 12 horas paralysia generalisada, abundante salivação, emissão de urina; na manhã seguinte o estado geral está um pouco modificado para melhor, nota-se forte edema subconjunctival do olho esquerdo; a cornea está despolida e opaca; esta reacção accentua-se no dia seguinte, desenvolvendo-se uma kerato-conjuntivite intensa, que determinou a cegueira definitiva, do animal, do lado esquerdo. O olho do lado opposto não apresenta cousa alguma de anormal. No quinto dia de experiencia o animal succumbe subitamente, sem que o seu estado geral fizesse prever esse desenlace.

Coelho 275—peso 1115 grs.—Recebe sobre o globo ocular direito 160 mgr. de veneno pastoso, paresia do lado direito, seguida de hemiplegia (15 minutos), de quadriplegia (25 minutos) e de morte em 45 minutos.

Coelho 210—peso 1360 grs.—Recebe sobre o globo ocular cerca de 150 mgrs. de veneno pastoso; mesmos symptomas; morte em 50 minutos.

Coelho 176—Recebe, sobre o globo ocular esquerdo, uma pequena quantidade de veneno *in natura;* paresia, seguida de hemiplegia esquerda, paralysia geral e morte em uma hora e 30'. — *Experiencia realisada perante a Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo, em sessão de 8 de Maio de* 1925.

MUCOSA NASAL—A applicação do veneno sobre a mucosa nasal determina symptomas perfeitamente comparaveis aos observados pela applicação na mucosa ocular. Com as soluções muito diluidas, acção irritante local, espirros repetidos; hypersecreção; o mesmo effeito se produz por finas particulas em suspensão no ar, quando se tritura o veneno secco. A applicação de 100 a 150 mgr. de veneno pastoso determina no coelho symptomas geraes, paresia, hemiplegia, quadriplegia e morte rapida.

Coelho 282—Recebe cerca de 20 mgs. de veneno pastoso sobre a mucosa nasal; secreção local, movimentos repetidos de deglutição, espirros. Nenhum symptoma geral.

Coelho 59—peso 1000 grs.—Recebe cerca de 100 mgs. de veneno *in natura* na mucosa nasal; hemiplegia 35 minutos depois; paralytico em 45 minutos, com edema da mucosa nasal do lado da applicação; morte em uma hora e 15 minutos.

ABSORPÇÃO PELA PELLE—A pelle humana, bem como a pelle dos mammiferos, offerece solida resistencia a absorpção d'este veneno. Não conseguimos determinar symptomas geraes por fricções repetidas, muitos dias em seguida, feitas sobre a pelle, previamente epilada de diversos animaes. O mais que conseguimos foi uma ligeira reacção local.

Cão 10—Fricção sobre a pelle do ventre com 100 mgs. de veneno emulcionado em oleo de oliva. Nenhum resultado.

Coelho 156—Fricção com 200 mgs. de veneno pastoso sobre o dorso epilado 48 horas antes; ligeira reacção inflammatoria local no dia seguinte.

Do mesmo modo a injecção intradermica na orelha do coelho de pequenas doses de 1 a 2 mgs. não provoca senão uma fraca reacção local, sem necrose.

A pelle de alguns bactrachios absorve facilmente o veneno, observando-se a morte tão rapida por esta applicação, como a que se verifica pela deposição do toxico sobre as mucosas.

Paludicola signifera (Rã).—Duas P. signifera são collocadas em um tubo, a que se addicionam 4 gottas de um soluto de veneno, dose essa correspondente a 2 mgr.; paralysia immediata, convulsões e morte em 6 minutos.

Paludicola signifera; recebe sobre o dorso uma gotta do soluto de veneno (0,5 mg.) paralysia a principio posterior, completa em 5 minutos; restabelece-se em uma hora.

Hyla sp. (Pereréca).—Recebe uma gotta do soluto de veneno no dorso (0,5 mg.); paralysia no começo posterior, completa em 5 minutos; restabelece-se n'uma hora.

A concentração das soluções de veneno tem grande importancia sobre a actividade por via cutanea. Assim duas Paludicolas, depois de contacto, durante 15 minutos, com uma solução de veneno a 1 °/oo não apresentavam senão paralysia passageira.

ACCUMULAÇÃO DO VENENO NO ORGANISMO:

Uma das propriedades mais dignas de nota, do veneno dos batrachios, pela qual se differencia de outros de origem animal, é a de se accumular no organismo. Assim, quando se administra por via parental ou por via gastrica, a um animal qualquer, em experiencia, uma dose de veneno inferior a minima mortal, observam-se phenomenos mais ou menos graves, que desapparecem em curto prazo; si a este mesmo animal depois de um intervallo mais ou menos longo, dá-se uma segunda dose de veneno, que represente a differença entre a primeira e a minima mortal, o animal apresenta symptomas e succumbe, como se tivesse recebido de uma só vez a minima mortal. Si ao em vez de fraccionarmos, em duas doses, a minima mortal, o fizermos em cinco ou dez doses, o resultado final será o

mesmo; a ultima dose será sempre a gotta d'agua, que faz transbordar o calice, determinando a morte.

Como consequencia logica da propriedade, que acabamos de expôr, apresenta-se a incapacidade de determinar a formação de anticorpos ou de produzir a immunidade. Não conseguimos, de facto, por mais variados que fossem os methodos empregados, immunisar qualquer especie de animal, contra o veneno de sapo. Não encontramos, tambem, especie alguma, que possuisse immunidade natural contra esse veneno. O proprio sapo, o *B. marinus* succumbe a acção do seu veneno, mostrando-se sensivel a uma dose infinitamente menor do que a de que elle dispõe, em uma só das suas paratoides.

Eis o protocollo de algumas das experiencias que documentam os factos acima mencionados:

Gato n.º 2—Recebe por via gastrica 10 mg. de veneno, em 1 c. c. de agua distillada, symptomas graves; completo restabelecimento no dia seguinte; 24 horas mais tarde, recebe, pela mesma via 5 mg.; baba espessa, vomitos, paralysia, convulsões e morte em uma hora e 50 minutos.

Tentativas de immunisação:

Coelho 28, peso 1500 grs.—Recebe a 3-4-25, por via gastrica 40 mg.—forte paresia, elevação thermica, phenomenos estes que desapparecem.
" " " " " Recebe a 5-4-25, pela mesma via mais 20 mg.—mesmos symptomas.
" " " " " Recebe a 7-4-25, pela mesma via, mais 20 mg.—mesmos symptomas mais accentuados.
" " " " " Recebe a 9-4-25, pela mesma via, mais 20 mg.—morte em 1 minuto.

Total de veneno em doses accumuladas =100 mgs.

Pela necropsia observamos forte congestão de todos os orgãos; espessamento da parede estomacal; congestão do peritoneo, com abundante exedacto peritoneal, ligeiramente hemolitico.

Coelho 159, peso 1400 grs.—Recebe por via gastrica a 14-4-25, 80 mgs.—Symptomas graves.—Normal no dia seguinte.

" " " " " Recebe pela mesma via a 18-4-925, mais 10 mgs. Symptomas graves, paralytico e morte no dia 19-4-925.

Total do veneno administrado em duas doses=90 mgs.

Com uma só dose de 90 mgs. por via gastrica, mata-se o coelho de igual peso em 10 minutos.

As doses accumulativas podem ser administradas por vias differentes, com os mesmos resultados:

Coelho 9—peso 1300 grs.—Recebe:
a 14-4-25—30 mgs. por via gastrica; nenhum symptoma.
a 18-4-25—30 mgs. pela mesma via; paresia passageira.
a 22-4-25—10 mgs. por via intramuscular; forte paresia, que desapparece no dia seguinte.
a 25-4-25—10 mgs. por via intramuscular; paralytico, durante 36 horas; diarrhéa forte.

a 29-4-25—10 mgs. por intramuscular, ás 11 horas da manhã, paralytico ás 14 horas; diarrhéa muito abundante; morre a noite.

Doses accumuladas:

Por via gastrica, em 2 doses—60 mgs.
Por via intramuscular, 3 doses—30 mgs.

Total 90 mgs.

Pela necropsia, verificamos congestão de todo o tubo digestivo, principalmente do estomago, em cujas paredes encontramos largas placas em via de necrose. Figado com zonas de degeneração.

Com o cobaio tivemos resultado identico. Voltaremos ao assumpto a proposito das tentativas de immunisação, por meio de fricções sobre a pelle.

Como demonstração da sensibilidade do sapo ao seu proprio veneno registaremos algumas das nossas experiencias, cujos resultados vem infirmar a opinião de alguns autores, que o suppõe, ao contrario, muito resistente.

Bufo marinus pesando 70 grs.—Recebe por via oral 2 ½ grs. de veneno, *in natura*, que lhe fôra extrahido momentos antes; paresia posterior em uma hora; morte em 2 ½ horas.

Bufo marinus pesando 80 grs. — Recebe por via oral, 1 gr. de veneno *in natura*, paralytico em duas horas e morto em 4 horas.

Bufo marinus pesando 85 grs.—Recebe por via oral, 100 mgs. de veneno, dissolvido em 2 c. c. de agua distillada, tendo sido regeitada, a maior parte da dose, pelo que foi administrada, duas horas depois, pela mesma via, mais 100 mgs.; ligeira paresia posterior, que desapparece no dia seguinte, em o qual recebe do mesmo modo mais 100 mgs. de veneno; morte 4 horas depois da ultima ingestão.

A minima mortal, para um *Bufo marinus* de 100 grs. parece ficar entre 250 a 300 mgs. de veneno por via oral.

O *Bufo crucifer* e o *B. arenarum* são igualmente sensiveis ao proprio veneno e ao das especies visinhas:

B. crucifer, adulto de 45 grs.—Recebe por via oral 180 mgs. de veneno de B. marinus; paretico uma hora depois da ingestão; paralytico no dia seguinte, com a mucosa buccal muito congestionada e hemorrhagica; morte em cerca de 36 horas.

B. arenarum, adulto, recebe por via oral 100 mgs. de veneno de Bufo arenarum, morto na manhã seguinte.

ACÇÃO DO VENENO DE BUFO SOBRE OUTRAS ESPECIES DE BATRACHIOS:

As outras especies de batrachios são, em geral, dotadas de grande sensibilidade a este veneno, succumbindo a doses muito fracas, quer por via cutanea, como já vimos, quer por via hypodermica ou por via oral. A grande *Leptodactylus pentadactylus*, cujo tamanho pode

attingir o dos maiores Bufos, é de uma sensibilidade comparavel a destes ultimos. Os symptomas começam logo após a applicação do veneno, por phenomenos de excitação que se traduzem por saltos desordenados, até que apresente-se a paresia, a que succede paralysia posterior, seguida de contracções tonicas locaes, mais ou menos intensas, as quaes se generalisam posteriormente, sem comtudo transformarem-se em verdadeiras convulsões, depois do que o animal fica completamente paralytico e succumbe, em um prazo, mais ou menos longo.

Paludicola signifera, recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 2 minutos.

Paludicola signifera, recebe 0,1 mg. por via gastrica; paralytica em 5 minutos, restabelecida em 1 hora.

Paludicola signifera, recebe 1 mg. de veneno sobre o dorso, (2 gottas da solução), morta em 10 minutos.

Paludicola signifera, recebe 0,5 mg. veneno sobre o dorso, (uma gotta da solução, paralytica em 5 minutos, restabelecida em 1 hora.

Hyla sp?, recebe 0,5 mg. por via gastrica; morte em 3 minutos.

Elesia nasus, recebe 1 mg. por via gastrica; morte em 3 minutos.

Cyloramphus eleutherodactylus, recebe 1 mg. por via gastrica; morte em 3 minutos.

Leptodactylus occelatus, recebe 1 mg. por via gastrica; nenhum symptoma.

Leptodactylus occelatus, recebe 10 mgs. por via gastrica; morte em 20 minutos.

Leptodactylus fragilis, peso 50 grs., recebe 4 mgs. por via gastrica, paralytica em 1 hora, restabelecida no dia seguinte; de novo recebe 4 mgs., morte em 4 horas.

Leptodactylus fragilis, peso 40 grs., recebe 2 mgs., sob a mucosa buccal, paretica em 10 minutos; paralytica em 1 hora; morte em 36 horas.

Leptodactylus pentadactylus, peso 120 grs. recebe 40 mgs., por via gastrica, nenhum symptoma.

Leptodactylus pentadactylus, recebe por via gastrica, 55 mgs.; nenhum symptoma.

Leptodactylus pentadactylus, recebe por via gastrica, 200 mgs., morte em 6 horas.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE OS OPHIDIOS:

Já assignalamos, em outra parte d'este trabalho, a grande sensibilidade dos ophidios a etse veneno, em opposição ao que affirmaram alguns experimentadores. Passaremos agora a documentar, com o relatorio de algumas das experienciâs que realisamos, esse modo de ver.

Devemos porém, consignar em primeiro lugar que, n'este, como em outros grupos zoologicos, a sensibilidade é variavel com as especies. As *Crotalinae*, tanto as do genero Crotalus, como as do genero Lachesis, são as mais sensiveis. Nos outros generos encon-

tram-se differenças notaveis; não encontramos, porém, uma só especie refractaria a acção do veneno. Nossas experiencias foram realisadas, quer fazendo morder, directamente, o sapo, pela serpente, quer por injecção intramuscular ou por introducção do veneno no estomago ou na trachêa por meio de uma pipetta afilada. As doses minimas mortaes, por via intramuscular, mostraram-se, ao contrario, do que se poderia suppôr, notavelmente superiores as registadas para as duas outras vias de introducção do veneno. Por via oral ou tracheal, a morte é extremamente rapida e as minimas mortaes identicas na maior parte das especies; as Xenedon, entretanto, principalmente a X. merremi e a X. Guntheri, fazem excepção a esta regra como adiante veremos.

Os symptomas são identicos, qualquer que seja o modo de introducção do veneno; viva agitação immediata; o animal procura fugir, abrindo constantemente a bocca, sob acção, ao que parece, de fortes dores; sobrevem os vomitos, paresia, paralysia, a principio posterior; emfim violentas convulsões, depois das quaes o animal fica contorcido sobre si proprio; o relaxamento muscular se produz em seguida e o coração para por ultimo. Com doses proximas a minima mortal, as convulsões podem faltar ou não se apresentarem senão tardiamente; com doses mais elevadas são, ao contrario, muito violentas e precoces.

Experiencias directas:

Lachesis lanceolatus, exemplar adulto, de 95 c. de comprimento, é forçada a morder um B. marinus, sobre as paratoides; a mordedura não durou senão alguns segundos; apparecem immediatamente os primeiros symptomas,—paresia, convulsões fracas, paralysia; morte em 1 hora e 10'. O sapo não apresentou symptoma algum de intoxicação.

Esta experiencia foi repetida, com identicos resultados, perante a Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo.

Crotalus terrificus, de 45 c. de comprimento, obrigada a morder um *Bufo marinus*, sobre as paratoides; paralytica em 5 minutos, morte em 8 minutos. O sapo nada soffreu.

Via parental, gastrica e tracheal:

Especies particularmente sensiveis:

Crotalus terrificus, de 40 c., recebe por injecção intramuscular, 2 mgs. de veneno, convulsões em 3' e 30", morte em 4'.

Crotalus terrificus, de 45 c., recebe 1 mg. por injecção intramuscular, convulsões em 5', morte em 26'.

Crotalus terrificus, de 30 c., recebe por via tracheal, 1 mg., convulsões em 1' e 30", morte em 2'.

Crotalus terrificus, de 40 c., recebe 0,5 mgs. por via tracheal, convulsões em 2 minutos, morte em 3 minutos.

Crotalus terrificus, de 45 c., recebe 0,1 mg. por via tracheal, paralytica em 20', restabelecida em 2 horas.

Crotalus terrificus, de 35 c., recebe 1 mg. por via gastrica, convulsões em 4' e morte em 5'.

Crotalus terrificus, 40 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5'.

Crotalus terrificus, 40 c., recebe 0,2 mg. por via gastrica, morte em 7'.

Crotalus terrificus, 40 c., recebe por via gastrica, 0,1 mg. convulsões fracas em 5', restabelecida em duas horas.

Lachesis lanceolatus, 45 c., recebe por via tracheal, 0,5 mg. convulsões immediatas; morte em 1 minuto.

Lachesis lanceolatus, 45 c., recebe por via tracheal, 0,5 mg.; convulsões em 1' e morte em 2 minutos.

Lachesis lanceolatus, de 35 c., recebe por via gastrica, 0,5 mg.; convulsões em '3, morte em 2 horas.

Lachesis atrox, de 35 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 2 minutos.

Lachesis alternatus, de 40 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 4 minutos.

Lachesis cotiara, de 35 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5'.

Lachesis neuwiedii, de 25 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5'.

Lachesis jararacuçu', de 35 c., recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 4' e 30".

Drymobius bifossatus, de 1,^{m} 75 de comprimento pesando 720 grs., recebe 5 mg. por via tracheal; paralytica em 5' e morta em 55'.

Epicrates crassus, de 45 c. de comprimento, recebe 2 mgs. por via gastrica morte em 9 minutos.

Simophis rhinostoma, de 35 c. de comprimento, recebe 2,5 mg. por via gastrica, convulsões immediatas; morte em 2 minutos.

Elapomorphus nasutus, adulto, recebe 2 mgs. por via gastrica, paralytico em 10' e morte em 1 hora.

Especies sensiveis:

Elaps corallinus, de 80 c. de comprimento, recebe por via gastrica 10 mgs.; convulsões em 9' e morte em 15'.

Herpetodryas carinatus, de 1,^{m} 30, recebe 5 mgs. por via gastrica, convulsões em 4' e morte em 7'.

Herpetodryas sex-carinatus de 1 metro, recebe 5 mgs. por via gastrica, convulsões em 1' e morte em 5'.

Thamnodynastes natteri, recebe 5 mgs. por via gastrica, morte em 25 minutos.

Spilotes pullatus, de 2,^{m} 10 pesando 950 grs. recebe 20 mgs. por via gastrico, convulsões em 15' e morte em 45'.

Oxyrhopus haasi, de 50 c., recebe 5 mgs. por via gastrica, convulsões immediatas, se restabelece em 10 horas.

Oxyrhopus trigeminus, de 75 c., recebe 10 mgs. por via gastrica, morte em 4 horas e 50 minutos.

Philodryas estivus, recebe 15 mgs. por via gastrica, morte em uma hora e 15 minutos.

Philodryas serra de 40 c., recebe por via gastrica 1 mg., paralytica ao cabo de 1 hora, morte a noite.

Rhadinea merremii, adulta recebe 5 mgs. por via gastrica, morte em 2 horas.

Leptognathus turgidus, adulta, recebe 2 mgs, paralytica, morte em 1 hora.

Especies pouco sensiveis:

Constrictor constrictor, de 1,m 60, pesando 2 kilos 150 grs.; recebe por via gastrica 30 mgs., paresia forte, perde a aggressibilidade; ½ hora depois recebe mais 20 mgs.; paralysia posterior, abre constantemente a bocca, convulsões da parte anterior do corpo; na manhã seguinte recebe mais 40 mgs., fracas convulsões, vomitos e morte durante a noite. Recebeu ao todo 90 mgs. de veneno.

Liophis reginae, adulto, recebe por via gastrica, 10 mgs.; nenhum symptoma até a tarde; paralytica na manhã seguinte, morte em 24 horas.

Liophis poecilogyrus, adulto de 25 c., recebe por via gastrica 2 mgs. Apresentou apenas ligeiros symptomas.

Tomodon dorsatus, recebe 5 mgs. por via gastrica; convulsões fracas, paralysia. Restabelece-se.

Xenodon merremi.—Esta especie apresenta uma resistencia particular ao veneno granuloso por via gastrica, resistencia muito maior do que a do proprio sapo. Não se trata, entretanto, de uma verdadeira immunidade ao veneno e sim de uma condição especial da mucosa gastrica, que impede a absorpção d'este. Tanto esse modo de ver corresponde a verdade, que vencemos facilmente esta resistencia, empregando outra via de administração do veneno, a tracheal por exemplo, conseguindo matar facilmente a Xenodon com fracas doses. Ainda em favor d'esta interpretação depõe o facto de não possuir o sôro d'esta especie anti-corpo algum capaz de neutralisar o veneno, ainda mesmo depois de prolongado contacto.

Xenodon merremi, adulto, recebe 400 mgs. por gastrica; paralysia passageira.

Xenodon merremi, adulto recebe 1000 mgs. por via gastrica; paralytica em 4 horas; restabelece-se em 48 horas.

Xenodon merremii, adulto, por deglutição forçada, um pequeno *Bufo crucifer*, que é levado até ao estomago. Depois de duas horas este animal é regeitado. Introduzido de novo no estomago da Xenodon, é vomitado outra vez, ao fim de 5 minutos. Nota-se simplesmente paresia accentuada que desapparece rapidamente.

Xenedon merremi, recebe, por via tracheal, 20 milligrs. de veneno; morte em 15 minutos.

O sôro da *Xenodon merremi*, não neutralisa o veneno granuloso:

Lachesis lanceolatus, de 40 c. recebe por via gastrica 1 mg. de veneno mais 0, c. 5 de sôro de X. merremi, depois de contacto in vitro, durante 1 hora, morte em 4 minutos.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE OUTROS ANIMAES DE SANGUE FRIO:

Saurios.—Lygosoma, sp. (lagartixa).—Recebe 0,5 mg. por via gastrica, morte em 5 minutos.

Amphysbena alba.—Recebe 2,5 mg. por via gastrica; espuma abundante pela bocca, paresia, convulsões, paralysia e morte em 1 hora e 35 minutos.

Cheloneo.—Um jabuty, mostrou-se assaz resistente, restabelecendo-se depois de ter estado paralytico, em consequencia de administração por via gastrica de 10 mgs. de veneno.

OS INSECTOS SÃO MUITO RESISTENTES A ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO:

Diversos coleopteros (Cerambycides e Lamellicornes) ou suas larvas, mergulhados em uma solução a 10 °/° de veneno, durante 1/4 de hora, ou não apresentaram signal algum de intoxicação ou apenas muito fracos symptomas. Do mesmo modo larvas de moscas, de Sphyngidae e um Hymenoptero, supportaram perfeitamente este tratamento.

Larva de *Cerambycidae.*—10 minutos na solução do veneno.—Nenhum symptoma.

Cerambycidae adulto, 10 minutos na solução de veneno.—Paralytico 20 minutos depois de ter sido retirado da solução.—Restabelecido em 2 horas.

Larva de Sphyngidae.—10 minutos na solução de veneno.—Nenhum symptoma.

Hymenotpero (Mutila sp)—10 minutos na solução do veneno.—Nenhum symptoma.

Larvas de moscas, 24 horas na solução; nenhum symptoma.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE AS BACTERIAS E A ACÇÃO D'ESTAS SOBRE O VENENO:

Observamos desde logo que as soluções aquosas de veneno granuloso, conservaram-se bem, por muitos dias, sem esterilisação prévia, e sem cuidado algum particular, sugerindo-nos a ideia de verificar si o veneno teria alguma acção bacterecida ou impediente do desenvolvimento das bacterias, ou se consistiria apenas um meio impro prio ao desenvolvimento de germens, por falta dos elementos nutritivos. Uma outra questão que, com esta, se irmanava, era saber-se si o desenvolvimento de bacterias, em meio propicio, em presença do veneno, determinaria a alteração ou a attenuação d'este.

Visando a verificação d'estas duas questões realisamos a seguinte experiencia:

Em uma serie de tubos contendo doses decrescentes de um soluto de veneno a 1 °/°, addiciona-se quantidades crescentes de caldo commum semeando-se em seguida com B. coli e levando-se a serie de tubos a estufa a 37°.

Tubo n.° 1.—10 c. c. de soluto de veneno.
Tubo n.° 2.— 7 c. c. de soluto de veneno, mais 3 c. c. de caldo
Tubo n.° 3.— 6 c. c. de soluto de veneno, mais 4 c. c. de caldo
Tubo n.° 4.— 5 c. c. de soluto de veneno, mais 5 c. c. de caldo
Tubo n.° 5.— 4 c. c. de soluto de veneno, mais 6 c. c. de caldo
Tubo n.° 6.— 3 c. c. de soluto de veneno, mais 7 c. c. de caldo
Tubo n.° 7.— 2 c. c. de soluto de veneno, mais 8 c. c. de caldo
Tubo n.° 8.— 1 c. c. de soluto de veneno, mais 9 c. c. de caldo
Tubo n.° 9.— 0 c. c. de soluto de veneno, mais 10 c. c. de caldo.

Semeados com B. coli.

Depois de 48 horas na estufa a 37°, verifica-se que a cultura é progressivamente mais abundante do tubo n.° 2 ao do numero 9, sendo nulla no tubo n.° 1, exactamente em que se encontrava exclusivamente o soluto de veneno. De sorte que a conclusão foi facilima a tirar-se quanto a primeira parte da questão: o veneno não tem acção alguma bactericida ou mesmo impediente sobre o desenvolvimento do B. coli; as suas soluções não se prestam, entretanto, á cultura d'esse germen.

A toxicidade do soluto de veneno, a despeito do desenvolvimento abundante do B. coli nos tubos, em que se encontravam de mistura, veneno e caldo inoculado, conserva-se inalterada como podemos verificar, matando os germens pela ebulição da mistura e administrando, por via gastrica, a uma pequena jararaca (L/ lanceolatus) uma dose da mesma correspondente a 0,5 mg. de veneno. A morte verificou-se, como sempre, dentro de alguns minutos.

Tivemos além d'isso o cuidado de verificar que a cultura do B. coli nenhuma acção tem sobre a L. lanceolatus, quando administrada por via gastrica.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE OS INFUSORIOS:

Os infusorios não são tão insensiveis como as bacterias a acção do veneno de sapo. Desenvolvem-se mal e morrem, em alguns dias nas infusões a que se addicionem algumas gottas de veneno. Logo após a addição do veneno nota-se ao microscopio, viva agitação dos infusorios; 20 minutos mais tarde mostram-se pouco activos; 24 horas depois certas formas desapparecem; outras permanecem activas. A toxicidade tambem n'este caso não é alterada, como provamos por experiencias em animaes sensiveis.

A TOXICIDADE DO SORO DE SAPO:

Physalix e Bertrand que admittem o sapo, como muito resistente ao proprio veneno, verificaram, no sangue e nos tecidos d'este animal, propriedades toxicas, que attribuiam a passagem na corrente circulatoria, de elementos constituintes do veneno elaborados pelas glandulas. Nas primeiras experiencias que fizemos sobre este assumpto, os resultados foram completamente negativos, como consta da nossa nota previa, revelando-se o sangue ou o sôro d'este animal, completamente desprovido de acção toxica, pois, nos foi possivel injectar sem observar symptoma algum de envenenamento, até 1 c. c. de sôro de sapo na veia do pombo. Experiencias posteriores, vieram, entretanto, modificar sensivelmente estes resultados, pois, examinando, sob este ponto de vista, um maior numero de sapos, achamos que em alguns d'elles encontrava-se realmente o sangue com propriedades toxicas, e o que é mais, apresentando um gráo de toxicidade variavel de um para outro exemplar, o que nos levou a acreditar na passagem accidental, do veneno da glandula, para circulação, por uma condição, cujo mechanismo nos escapa, podendo-se, entretanto, logicamente, admittir-se a absorpção consecutiva a pequenas lesões vasculares, occorridas no tecido periglandular.

Verificamos, além disso, que a toxicidade do sangue, n'estas condições, corria por conta da presença n'elle de pequenas quantidades do veneno granuloso, facto este testemunhado por duas de suas principaes propriedades:—acção por via-gastrica e resistencia a ebulição.

Não se trata de uma secreção interna normal e continua, pois, não só pode faltar em absoluto, na circulação, como, quando existe, é em quantidades infinitamente pequenas e variaveis.

As experiencias do nosso collega Dr. Jayme Pereira, sobre a ação d'este veneno sobre o coração, e relatados n'este mesmo volume, demonstram que as fibras musculares lisas do sapo reagem de modo tão accentuado como a dos outros animaes, não podendo, consequentemente o veneno existir na circulação d'este animal senão em quantidades minimas e accidentaes.

Eis algumas de nossas experiencias sobre a toxicidade do sôro de sapo, obtido do sangue colhido por puncção da aorta e centrifugado depois da separação do coagulo:

Sôro de cinco *B. marinus*:

Pombo n.º 78—Recebe 0, c. c. 1 do sôro mais 0, c. c. 9 do sôro physiologico na veia; não apresentou symptoma algum.

Pombo n.º 50—Recebe 0, c. c. 5 do sôro mais 0, c. c. 5 do sôro physiologico na veia; não apresentou symptomas.

Pombo n.º 178—Recebe 1 c. c. do sôro na veia; não apresentou symptomas.

Sôro de 3 B. marinus, obtido por puncção do bulbo arterial.

Cobaio, pesando 454 grs.—Recebe 4 c. c. do sôro por injecção subcutanea; forte edema 8 horas depois da injecção, paralytico em 24 horas e morte em 27 horas.

Sôro obtido de 4 B. marinus:

Lachesis lanceolatus, de 30 c. de comprimento, recebe por via gastrica 2 c. c. do sôro; agitação immediata, seguida de vomitos, paresia, convulsões, paralysia e morte em 7 minutos.

Lachesis lanceolatus, de 40 c. c., recebe por via gastrica, 0,5 c. do sôro; mesmos symptomas e morte em 50 minutos.

Sôro de um Bufo marinus:

Camondongo de 22 grs., recebe por via gastrica, 1 c. c. do sôro. Não apresentou symptomas.

Sôro de um Bufo marinus:

Lachesis lanceolatus de 40 c. c., recebe por via gastrica, 1 c. c. de sôro Não apresentou symptomas.

Lachesis neuwiedii, de 30 c., recebe 1 c. c. por via gastrica. Nenhum symptoma.

Sôro de um Bufo marinus:

Lachesis lanceolatus, recebe 1 c. c. do sôro por via gastrica. Não apresentou symptomas.

Sôro de um Bufo marinus:

Pombo n.º 31—Recebe na veia 1 c. c. do sôro. Apenas nauseas e vomitos.

Pombo n.º 25—Recebe na veia 2 c. c. do sôro. Apenas nauseas e vomitos.

Sôro de um Bufo marinus:

Lachesis lanceolatus, de 35 c., recebe 1 c. c. de sôro por via gastrica. Morte em 7 minutos.

Pombo n.º 22—Recebe na veia 2 c. c. do sôro. Morte em 30 minutos.

Camondogo de 25 grs.—Recebe por injecção subcutanea, 1 c. c. do sôro. Não apresentou symptomas.

Coelho n.º 342—Recebe na veia 2 c. c. do sôro. Não apresentou symptomas.

Mesmo com o ultimo sôro, o mais toxico, que encontramos, só as serpentes e os pombos, animaes extremamente sensiveis, apresentaram phenomenos de envenenamento.

ACÇÃO DO VENENO GRANULOSO SOBRE O CORAÇÃO:

A administração d'este veneno, quer por via gastrica, quer por via parental, provoca notavel acceleração e reforço dos movimentos cardiacos. Tanto no cobaio, como nas serpentes, o coração é o ultimo orgão paralysado, não parando, senão quando os musculos voluntarios tornam-se inertes e desapparecem completamente os movimentos respiratorios. Nos ophidios pode o coração continuar a bater até 40 ou 50 minutos, depois da cessação de outra qualquer manifestação de vida, parando sempre em systole ventricular.

Eis uma das nossas experiencias:

Em um cobaio, fixado em decubito dorsal, introduzimos uma pequena haste de aço, de modo a transfixar a pelle e a camada muscular do thorax, até attingir a parede ventricular do lado esquerdo. Contamos logo depois de terminada a operação 100 batimentos fracos por minutos.

A's 13 horas e 5′, injecção de 5 mgs. de veneno.
A's 13 horas e 6′, 100 pulsações mais amplas por minuto.
A's 13 horas e 10′ 120 pulsações forte por minuto.
A's 13 horas e 20′, 110 pulsações fortes por minuto.

Estes resultados foram confirmados pelos traçados obtidos pelo Dr. Jayme Pereira e publicados no presente numero d'estas Memorias.

Uma só gotta de soluto d'este veneno, depositada directamente sobre o coração do Bufo ou de um Leptodactylus, provoca, immediatamente, violentas contracções do ventriculo, que se torna quasi exangue.

ACÇÃO SOBRE A SECREÇÃO URINARIA:

O veneno de sapo é, como vimos, em outra parte d'este trabalho, indicado, pelo empirismo, como possuidor de acção diuretica. Resolvemos por isso instituir algumas experiencias afim de verificar o que de verdade havia sob esse ponto de vista.

Operamos successivamente sobre varios coelhos e cobaios, que eram collocados, cada um isolado em gaiola, apropriada, sobre uma plataforma metalica, com declividade para um orificio central, ligado por meio de um tubo, com um vidro collocado na parte inferior, que servia de collector de toda urina emittida pelo animal. Estabelecemos uma ração alimentar conveniente, mixta, constando de couve e cenoura, a qual sendo a mesma para cada especie animal em experiencia era diariamente pesada. Começamos nossas observações pelo registo da quantidade de urina, em 24 horas, durante trez dias seguidos, afim de estabelecer a media para cada animal. Depois, durante trez dias seguintes, administravamos o veneno quer por meio de fricções oleosas, quer por injecções, continuando a medir diariamente a quantidade de urina, afim de determinar a respectiva media.

Os resultados, comquanto indicassem um ligeiro augmento de diurese, na primeira experiencia, não foram constantes, em ordem a nos autorisar a tirar uma conclusão definitiva. Em todo o caso, podemos affirmar que, si a acção diuretica existe, no veneno de sapo, é ella muito pouco pronunciada.

1.ª Experiencia: —

Coelho de 1600 grs. Media da urina emittida nos dias 27, 28, 29 de Agosto de 1925. = 270 grs.

A 29 de 8, fizemos a primeira fricção com 1 c. c. de solução oleosa de veneno, no dorso do animal epilado um dia antes.

A 30-8, fizemos a fricção com 2 c. c. do mesmo oleo; quantidade de urina emittida nas primeiras 24 horas depois da primeira fricção. = 325 grs.

A 31-8, fizemos a fricção com 4 c. c. de oleo; quantidade de urina emittida 24 horas depois da segunda fricção. = 420.

A 1.º de 9, quantidade de urina emittida 24 horas depois da 3.ª fricção. = 280 grs.

Resultado final:

Media da urina 3 dias antes da administração do veneno. = 280 grs.
Media dos 3 dias depois da administração. = 342 grs.

Na segunda experiencia, os resultados foram completamente discordantes dos primeiros:

Coelho de 1300 grs.—Media de urina emittida nos dias 3, 4, 5 de 9 de 1925. = 283 grs.

Nos dias 5, 6, 7, 8, de 9; fricção com 2 c. c. de oleo.

Urina emittida nos dias 6, 7, 8 e 9 = 300, 280, 225; 320 grs. o que dá uma media de 281 grs.

Media da urina emittida nos dias 10, 11, 12 = 273 grs.

3.ª experiencia: — Resultado igualmente pouco claro.

Coelho pesando 1500 grs.—Media da urina nos dias 21, 22, 23 de 9=308 grs.

A 23-9, recebe por via intramuscular 2 c. c. de oleo.

A' 24-9, urina=310 grs.; nova injecção de 2 c. c. de oleo; completamente paralytico 2 horas depois da injecção.

A 25-9, restabelecido; urina 350 grs.

A 26-9, urina 260 grs.—Media de urina durante os trez dias 306 grs.

O veneno administrado, por via oral, tanto no coelho, como no cobaio, nos deu resultados identicos aos que ahi ficam registados.

ALGUMAS LESÕES ASSIGNALADAS PELAS NECROPSIAS DE ANIMAES MORTOS PELO VENENO DE SAPO:

Quando a morte é determinada, por injecção de dose massiça na veia, não se observam lesões, pela necropsia, a não ser congestão mais ou menos intensa dos orgãos internos, principalmente do pulmão, em que se podem assignalar pontilhados hemorrhagicos. Por injecção de doses proximas a minima mortal, observa-se congestão notavel das mucosas; os pulmões, fortemente congestos, apresentam com o figado e o baço numerosos fócos hemorrhagicos; nos rins notam-se grandes zonas de degeneração, quando a morte é consecutiva a um envenenamento prolongado ou determinado por doses repetidas ou progressivas.

A ingestão determina congestão intensa da mucosa gastrica, acompanhada de collecção sanguinea, mais ou menos importante e muitas vezes de necrose e perfuração da parede do estomago e por vezes do intestino delgado.

A injecção intramuscular de solutos de veneno, mesmo esterilisados, provoca enorme edema hemorrhagico e fetido no ponto da inoculação.

A presença do veneno é facilmente denunciavel no caso dos envenenamentos, por via gastrica, pelas reacções já indicadas do sulfato de ferro e do acido azotico, feito no conteudo estomacal ou no extracto obtido pela coação das paredes do estomago. Nos envenenamentos chronicos, pode-se pesquisar, do mesmo modo, o veneno no encephalo e no figado.

ACÇÃO HEMOLYTICA:

O veneno de sapo é completamente destituido de acção hemolytica. Este resultado foi confirmado, por todas as experiencias realisadas, tanto com os globulos vermelhos do carneiro, como com os de coelho, mesmo depois de um contacto, por 24 horas, na estufa a 37°.

ACÇÃO COAGULANTE E PROTEOLYTICA:

O veneno granuloso não é dotado nem de acção coagulante, nem de acção proteolytica. Este facto, que já haviamos estabelecido por experiencias feitas com o plasma citratado a 2 °|° e com a gelatina a 20 °|°, foi plenamente confirmado a luz da nova technica, (1), que descrevemos a proposito de um estudo sobre a coagulação e proteolyse. Com a nova technica verificamos que o veneno do sapo, em doses altas, possuia acção anti-coagulante, revelada no retardamento da coagulação normal do plasma fluoretado, pelo sôro, quando á mistura addiciona-se veneno granuloso em proporção conveniente.

(1) Drs. Vital Brazil e J. Vellard. — Contribuição ao estudo da coagulação e da proteolyse.—(Brazil Medico n.° 18—1.° de Maio de 1926.

RESISTENCIA DO VENENO GRANULOSO:

Um dos caracteres, d'este veneno mais digno de nota, e sobre o qual ja chamamos a attenção, em outro ponto d'este estudo, é constituido pela sua resistencia aos agentes physico-chimicos mais energicos, emprestando-lhe uma caracteristica inteiramente differente da de outros venenos de origem animal, taes como o das serpentes, o do escorpião e das aranhas, os quaes são facilmente destruidos ou alterados pelos agentes exteriores.

Assim é que este veneno resiste á luz, ao calor, aos reagentes chimicos mais energicos, taes como os acidos fortes, o alcool, o ether, a acetona, o chloroformio. Os solutos concentrados ou diluidos, podem ser esterilisados a 120° na autoclave sem que soffram a minima diminuição de actividade. Os solutos em oleo de oliva resistem, sem modificação de actividade, á temperatura de ebulição d'este vehiculo a 160°. Sob a influencia da luz, os solutos aquosos, escurecem lentamente, tomando uma coloração pardacenta, sem que, entretanto, haja modificação das suas propriedades toxicas. A glycerina e a formalina não exercem influencia alguma sobre a sua toxicidade. Do mesmo modo são inactivas: a agua oxygenada, a tintura de iodo, o soluto de hyposulfito de sodio a 50 °|°, a solução deci-normal de soda, soluto de nitrato de prata, etc.

Com os solutos de perchlorureto de ferro, dá o veneno um precipitado abundante; tanto o filtrado, como o precipitado se conservam toxicos.

Com o acido chromico, observa-se igualmente um precipitado; o filtrado continua toxico, emquanto que o precipitado suspenso em agua distillada é inactivo.

As soluções de veneno tratadas pelo acido sulfurico concentrado, dão após a ebullição um abundante precipitado branco, que colhido em filtro e lavado, com agua distillada ou solução fraca de soda e retomado em suspensão em agua distillada, determina a morte de animaes sensiveis, quando administrado por via gastrica.

Com o acido chlorhydrico, o mesmo facto pode ser observado.

Com o acido azotico não ha precipitado.

Em contacto com o succo gastrico o veneno conserva toda a actividade. Verificamos esse facto pelo exame da toxicidade do veneno introduzido directamente, quer no estomago de ophidios quer no estomago de batrachios.

As soluções de permanganato de potassio, são promptamente reduzidas pelo veneno, exercendo uma acção attenuante de sua toxicidade.

Para verificação da alteração ou attenuação de toxicidade dos solutos de veneno, depois de sobre elles fazer actuar os agentes em ensaio, empregamos pequenas serpentes venenosas, Lachesis ou Crotalus, muito sensiveis ao veneno por via gastrica, prestando-se optimamente para este fim.

PRINCIPIOS ACTIVOS DO VENENO GRANULOSO:

Como vimos anteriormente, varios autores, que se occuparam com o estudo chimico d'este veneno, isolaram, d'elle, principios acti-

vos, a que attribuiram propriedades caracteristicas, quer do ponto de vista chimico, quer do ponto de vista de sua acção physiologica.

Na impossibilidade de verificar todos estes trabalhos, tratamos de pesquizar si por meio do emprego de differentes dissolventes, seria possivel separar substancias com propriedades toxicas diversas.

1.ª *experiencia*: — Em uma primeira experiencia, tratamos 100 mgs. de veneno secco pelo alcool; 100 mgs. pelo ether; 100 mgs. pela acetona; 100 mgs. pelo chloroformio. Depois de 14 dias de contacto com os dissolventes, foram estes differentes solutos filtrados, separadamente e evaporados na estufa. O residuo de cada um d'elles, retomado por agua distillada, para ser ensaiado, por via gastrica em pequenas serpentes.

O residuo da parte soluvel em *alcool*, é escuro, resinoide sob a forma de laminas corneas, escuras. Reação pelo acido azotico e pelo sulfato de ferro positivas. Acção toxicologica sobre os pequenas serpentes, perfeitamente comparavel a do veneno total.

O residuo, da parte soluvel no *ether*, é amarellado, de aspecto untoso e muito pouco soluvel em agua distillada. Reacção pelo acido azotico positiva, pelo sulfato de ferro negativo. Revelou-se igualmente activa sobre as serpentes.

O residuo da parte soluvel na *acetona* é amarellado, completamente soluvel n'agua distillada. Reacção positiva tanto com acido azotico, como com o sulfato de ferro. Igualmente activo sobre as serpentes.

O residuo da parte soluvel no chloroformio é pardacento, dissolvendo-se lenta mas completamente em agua distillada. Reacção positiva com o acido azotico e com o sulfato de ferro. Mesma actividade para os animaes.

2.ª *experiencia*: — 176 mgs. de veneno secco foram dissolvidos em agua distillada; soluto filtrado e evaporado; o residuo tratado successivamente pela acetona, pelo chloroformio, pelo ether, pelo alcool e pela agua distillada.

Examinada cada uma d'estas fracções sob o ponto de vista de sua toxicidade para as pequenas serpentes, verificamos em todas ellas a mesma acção do veneno total com a sua caracteristica symptomatologia, variando tão sómente dentro de certos limites a minima mortal.

3.ª *experiencia*: — Cincoenta mgs. de veneno secco são tratados por 100 c. c. de cloroformio; depois de um contacto de 15 dias, filtra-se; a parte soluvel, depois de evaporada, é retomada pela agua distillada e ensaiada ao mesmo tempo que a parte insoluvel. Uma e outra mostraram-se igualmente activas para as pequenas serpentes, matando-as em poucos minutos. Do mesmo modo agimos, empregando a acetona como dissolvente. Tanto a parte soluvel, como a insoluvel eram igualmente activas.

D'estas experiencias e de outras muitas que realisamos, com o mesmo fim, nos ficou a convicção de que, pelo methodo de dissolventes, era impossivel isolar-se o veneno no seu estado de pureza, ou os seus principios activos, na hypothese de ser elles de constituição multipla ou complexa como querem os já citados autores.

CAPITULO IV

VENENO MUCOSO OU VENENO ABDOMINAL DO BUFO MARINUS:

Já assignalamos, anteriormente, que certos autores sustentam que as glandulas cutaneas da pelle do abdomen do sapo elaboram uma secreção differente da das glandulas de veneno granuloso, localisadas principalmente no dorso e que esta secreção denominada mucus ou secreção mucosa é tambem toxica. *Physalix e Bertrand*, *Dehaut e M.me Physalix*, emprestam-lhe propriedades muito differentes das do veneno granuloso, affirmando que a mesma existe só, com exclusão da do veneno propriamente dito na face abdominal dos batrachios.

Estas conclusões estão em desacordo com os resultados de nossas experiencias feitas com o veneno abdominal do *Bufo marinus*. Assim é que verificamos que o extracto obtido da pelle abdominal, tanto por maceração em agua, como pelo tratamento de alcool-ether, possuia acção toxicologica analoga a do veneno granuloso, não differenciando-se d'este senão por ser muito mais fraco, exigindo uma dose muito maior para produzir os mesmos effeitos. Quanto as propriedades principaes ou, por assim dizer, fundamentaes do veneno granuloso são as mesmas que caracterisam a secreção que estudamos: a mesma facilidade de penetração atravez da mucosa, a sua resistencia consideravel ao calor e a todos os agentes exteriores, as reações coloridas com diversos agentes chronicos e a propriedade caracteristica de se accumular no organismo, matando por doses cumulativas.

As propriedades do veneno mucoso, que os autores assignalam para os batrachios bem como as que observamos para secreção mucosa de um Cystignathidae, o Leptodactylus pentadactylus, são completamente differentes das que encontramos na pelle abdominal do *Bufo marinus*, o que nos induz a crer que a toxicidade da secreção abdominal do Bufo seja devida a presença de um pouco de veneno granuloso secretado por glandulas rudimentares existentes na pelle do ventre. Assim se explica que o veneno de mistura com a secreção mucosa, consequentemente muito diluido ou impurificado, se apresente muito menos energico, do que o colhido directamente das paratoides.

TERCEIRA PARTE

VENENO DE ALGUMAS OUTRAS ESPECIES DE BATRACHIOS

Os outros batrachios, cujo veneno procuramos estudar, pertencem a um grupo completamente distincto dos Bufonidae, que primeiro nos chamou a attenção; subordinam-se ao dos *Cystignathidae*, caracterisado externamente pela presença de dentes no maxillar superior e ausencia de discos adhesivos nos dedos. Este grupo encerra numerosas especies, entre as quaes, o fallado *Intanha* ou *Sapo boi* e a grande ran, sul-americana, o *Leptodactylus pentadactylus*, ou gia. Segundo o genero a que pertencem, variam muito, os caracteres exteriores destes batrachios. Alguns tem a pelle completamente lisa, outros apresentam saliencias, ou asperezas glandulares mais ou menos desenvolvidas; outros finalmente tem a pelle tão granulosa, como a dos sapos, com numerosos e volumosos conglumerados de glandulas, analogas as paratoides dos Bufos.

Algumas d'estas especies possuem veneno bastante activo; outras, ao contrario são completamente desprovidas de secreção toxica.

CAPITULO I

CERATOPHRYS DORSATA. WIED.—INTANHA, SAPO BOI OU SAPO DE CHIFRE.

O sapo *Intanha*, animal bem conhecido dos sertanejos, entre os quaes gosa de uma reputação detestavel é um grande batrachio, de aspecto completamente caracteristico. Tem o corpo relativamente curto, muito largo, a cabeça muito desenvolvida, a bocca enorme, occupando cerca de um terço do comprimento do corpo; as patas anteriores são curtas, muito fortes; as posteriores um pouco mais desenvolvidas. A cabeça coberta de cristas osseas salientes; na parte dorsal anterior apresenta um escudo dermico ossificado, soldado anteriormente aos ossos do craneo. As palpebras superiores, apresentam, na sua parte mediana, um longo prolongamento membranoso em forma de ponta, que lhe dá apparencia de cornos, quando as pal-

pebras estão levantadas, originando-se d'este appendice os nomes vulgares de *sapo boi* ou *sapo de chifres*. Os tegumentos dorsaes, assim como os da face superior dos membros, são cobertos de dobras e excrescencias, duras, corneas, de formas variaveis. O desenho e o colorido variam muito de um a outro exemplar. O fundo dos tegumentos é de um pardo roxeado; a parte mediana dorsal é occupada por um largo desenho irregular, de tom variando do verde claro ao verde escuro, prolongado anteriormente por uma faxa da mesma côr até a ponta do focinho e dividindo-se posteriormente em um certo numero de ramos divergentes sem regularidade ou symetria, passando gradualmente do verde ao amarello; os lados são amarellos, raramente verdes; os membros são amarellos ou verdes na face superior com faxas transversaes da côr do fundo e com algumas manchas vermelhas; a face ventral é esbranquiçada.

Eis as dimensões de um exemplar femea, de tamanho medio (estampa I). Comp. do corpo 160 m. m.; comp. da cabeça 60 m. m.; largura maxima da cabeça 60 m. m.; patas ant. 102 m. m.; patas post. 195 m. m. Os machos são um pouco menores do que as femeas. Esta especie tem uma larga zona de distribuição, mas não é muito abundante. Temos recebido exemplares do Estado do Paraná, de Santa Catharina, de S. Paulo e do Rio de Janeiro.

Poucas informações colhemos sobre os seus habitos. *O sapo intanha* habita as florestas ou as plantações feitas em terrenos recentemente desbravados. E' essencialmente noturno; fica durante o dia enterrado na terra humida, deixando a descoberto, apenas a parte superior da cabeça. Exemplares conservados vivos, muitos mezes no Museo do Instituto, ficaram occultos assim durante todo o dia. Para enterrar-se no solo, faz, girando sobre si mesmo, um buraco de forma conica. A noite sahe para caçar. Gosta muito da agua, ficando de tempos a tempos muitas horas dentro d'agua, como tivemos occasião de observar. Sua voz, que se faz ouvir principalmente á noite ou de dia quando é irritado, é estridente e forte muito differente do coaxar de outros batrachios, podendo ser ouvida a grandes distancias. E' carnivoro, alimentando-se de toda a sorte de animaes, insectos, batrachios, pequenos mammiferos, etc. Em alguns paizes é accusado com *a gya*—Leptodactylus pentadactylus—de attacar os pintos. Aos nossos exemplares demos camondongos que foram mortos e engolidos com facilidade. A digestão, assaz lenta, levando de 4 a 7 dias se faz de modo completo, não poupando nem os ossos; só as substancias corneas resistem.

O sapo intanha tem muita força nas maxillas e quando, irritado, apresenta-se-lhe um pedaço de pau ou um objecto qualquer, elle morde-o com violencia, não abandonando facilmente a preza, podendo ser assim transportado a grande distancia, agarrado ao objecto em que mordera. Esta observação justifica a tradição popular que diz que este sapo quando morde, nem depois de morto abandona a victima.

Tentamos extrahir o veneno do intanha pelo mesmo processo, que empregamos para os bufos, fazendo pressão sobre as excrescencias corneas do dorso, onde nos pareciam estar localisadas glandulas cutaneas. Não conseguimos nenhuma gotta de liquido.

Procuramos, então, obter, por maceração da pelle dorsal, durante 10 dias, em uma mistura de alcool-ether, o veneno cutaneo, d'esta

especie. Pela evaporação do liquido de contacto com a pelle, obtivemos 65 mgs. de um residuo soluvel em agua distillada, completamente atoxico, mesmo na dose de 20 mgs. por via venosa no pombo ou por via gastrica nas pequenas serpentes muito sensiveis. Os mesmos resultados negativos foram registados para a pelle do abdomen, tratada pelo alcool, ether ou pela agua distillada.

Para verificar si a secreção abundante fornecida por toda mucosa buccal, muito rica em glandulas, possuia acção toxica, permettindo a este animal matar rapidamente as suas victimas, procuramos colhel-a quer directamente, depois da anesthesia chloroformica, quer fazendo o sapo morder um chumaço de algodão hydrophylo. Com o material colhido por um ou por outro d'estes processos, não conseguimos verificar nem acção toxica geral nem phenomenos locaes.

Fizemos, finalmente, *o intanha*, morder directamente diversos animaes sobre os membros, como ratos e cobaios, os quaes não apresentaram signal algum de intoxicação, si bem que os dentes do sapo tenham penetrado profundamente nos tecidos e que a mordedura tenha durado de 5 a 10 minutos.

CAPITULO II

PYXICEPHALUS CULTRIPES

O *Pyxicephalus cultripes*, é um pequeno batrachio cavador, de aspecto muito differente dos Ceratophrys, entre os quaes, entretanto, foi incluido por Boulenger e Nieden. Günther estabelecera anteriormente o genero pyxicephalus, baseado na presença de esporas nos tarsos posteriores, a lingua arredondada, a presença de paratoides, a ausencia de prolongamento das palpebras, etc., para uma unica especie, o *Pyxicephalus americanus* do qual separou-se posteriormente o *P. cultripes*.

Mais tarde *Espada* descreve o *P. leyboldi* do Chile e Berg o *Ceratophrys occidentalis* da Argentina, que pertencem ao mesmo grupo.

Em razão do aspecto do Pyxicephalus, bem differente do Ceratophrys, dos principaes caracteres discriminativos indicados por Günther e principalmente pela presença de numerosos grupos glandulares, fornecendo um veneno leitoso, preferimos voltar a antiga denominação, a reunir estas quatro especies ao intanha e aos outros Ceratophrys visinhos, que formam um grupo muito homogeneo.

O *P. cultripes*, se reconhece por seu corpo empelotado, curto, a cabeça pouco distincta do thorax, as patas anteriores muito curtas, as posteriores mais longas, fortes, tendo, ao longo do bordo interno do tarso, uma saliencia cornea, dura, servindo para cavar o solo, d'onde o seu nome cultripes; os dedos têm todos fortes granulações corneas; todos os tegumentos dorsaes são semeadores de glandulas mais ou menos desenvolvidas; atraz da cabeça existem dois grupos

maiores de glandulas, que pela forma e localisação correspondem ás paratoides dos Bufos, cercados de 3 ou 4 grupos menores; o grupo tibial posterior é muito desenvolvido. A côr geral é de um preto esverdeado, com algumas manchas irregulares de tom amarello claro; apresenta as vezes uma faxa lateral e outra mediana, de côr amarellada, mais ou menos visiveis que podem faltar completamente; o ventre é negro marchetado de branco azulado.

Dimensões de uma femea adulta: com. total 63 m. m.; com. da cabeça 22 m. m.; largura 30 m. m.; pata ant. 42 m. m.; pata post. 79 m. m. Os machos são um pouco menores com um sacco vocal bem desenvolvido.

Não conhecemos quasi nada de sua biologia. E' uma especie cavadora, vivendo enterrada no solo. Os exemplares que recebemos estavam sempre cobertos de terra secca. Quando é agarrado ou tocado, encurva-se sobre si mesmo, empelotando-se de tal forma que chega a tomar a apparencia de uma bola. Não se defende, nem procura morder, como os *Ceratophrys*. Nunca ouvimos a sua voz.

A distribuição geographica d'esta especie é bastante extensa.

Recebemos exemplares dos Estados de São Paulo, Paraná, Goyaz e Matto Grosso.

VENENO:

Obtem-se facilmente o veneno d'esta especie por pressão directa das glandulas. De côr branca azulada, inodor, de consistencia mucilaginosa, de reacção neutra ao tournesol, secca-se facilmente em contacto do ar. Um só exemplar de cultripes pode fornecer de 40 a 80 mgs. de veneno fresco. Este é muito lentamente soluvel na agua distillada, e ainda mais difficilmente soluvel nas soluções salinas fracas; parcialmente soluvel no alcool, no ether, no chloroformio e na acetona. O veneno secco na estufa a 37.° é tão activo como o recentemente colhido, abstracção feita da perda de peso. Não dá precipitado algum, nem coloração com o acido azotico, com o acido sulfurico e com o sulfato de ferro; com o acido chlorhidrico, dá um precipitado branco; finalmente tem uma acção reductora muito inferior a do veneno do bufo.

Distingue-se principalmente d'este ultimo veneno, pela presença de quantidade notavel de substancias albuminoides, que dão um precipitado abundante com o reactivo de Esbach e a reacção do biureto.

A existencia de uma parte albuminoide n'este veneno é ainda confirmada pela attenuação progressiva que o mesmo soffre, quando é submettido a acção de temperatura elevada e a menor actividade da parte soluvel no alcool-ether, quando comparado a do veneno total.

Parece tratar-se aqui de um veneno complexo, formado de duas partes activas,—uma albuminoide, thermo labil, outra não albuminoide, de natureza identica ao veneno do bufo, thermoresistente, soluvel no alcool e no ether.

Como o veneno de bufo, o de cultripes age por via parental e atravez das mucosas. E' pouco convulsivante e muito paralysante, exercendo sua acção primeiro sobre os musculos da vida de relação; o coração é ainda o ultimo orgão atacado. Determina forte reacção

local, por injecção subcutanea ou por applicação sobre a mucosa ocular.

Algumas experiencias com veneno fresco dissolvido em agua distillada:

Por via parental:

Pombo 81.—Recebe 1 mg. de veneno na veia; estupor, paresia, vomitos, morte durante a noite.

Pombo 10.—Recebe 2 mgs. na veia; abre o bico e morre em seguida, sem convulsões.

Cobaio 79.—Recebe 5 mgs. de veneno, por injecção intramuscular na coxa. Na manhã seguinte enorme edema hemorrhagico occupando todo o membro e a parte inferior do abdomem. No terceiro dia esphacelo dos tecidos, com eliminação de um liquido extremamente fetido e desnudamento dos ossos da pata. Morte no quarto dia depois da injecção.

Coelho 284.—Recebe 5 mgs. de veneno na veia. Paralysia passageira.

Coelho 6.—Recebe 7 mgs. de veneno na veia; forte paresia 1 minuto depois da injecção, paralysia, cahe sobre o flanco, debate um pouco e cahe inerte; o coração bate ainda durante 2 minutos; temperatura no momento da morte 39.º 7; dilatação pupillar muito accentuada.

As minimas mortaes são pois: cerca de 1 mg. para o pombo, e 5 mgs para o coelho de 1 kg. por via venosa; e 5 mgs., por via intramuscular, para o cobaio de 300-400 grs.

Por via gastrica: ..

Lachesis lanceolatus, de 30 c., recebe por via gastrica 5 mg.; forte paresia, seguida de paralysia e morte dentro de uma hora.

Lachesis lanceolatus, com 30 c., recebe 2 mgs. de veneno, por via gastrica, paresia accentuada; restabelecida na manhã seguinte.

Pombo 22—Recebe por via gastrica, 5 mgs. de veneno; ligeiros vomitos, sem outros symptomas.

Por applicação na mucosa ocular:

Coelho 2.—Recebe um pouco de veneno fresco, *in natura*, sobre o globo ocular; 1/4 de hora depois, paretico, uma hora mais tarde, forte edema da palpebra, seguida de conjunctivite e de keratite, persistentes ainda cinco dias depois da applicação. No 2.º dia o estado geral era normal.

Resistencia ao calor:

a) *Veneno aquecido cinco minutos a* 98º.

Lachesis lanceolatus, de 30 c.—Recebe 2 mgs. de veneno aquecido; symptomas ligeiros; restabelccido na manhã seguinte.

Pombo 3.—Recebe 4 mgs. de veneno aquecido, por injecção endovenosa; morte immediata sem convulsões.

b) *Veneno aquecido, durante* 20 *minutos, a* 120º.

Lachesis lanceolatus de 30 c.—Recebe por via gastrica 4 mgs. de veneno aquecido; nenhum symptoma.

Pombo 84.—Recebe por injecção endovenosa, 2,5 mgs. de veneno aquecido; paresia fica deitado; mantem-se com difficuldade sobre as patas; curtos periodos de agitação; normal na manhã seguinte.

Pombo 40.—Recebe por via venosa 5 mgs. de veneno aquecido; forte agitação immediata; o animal parece embriagado, cambaleia sobre as patas; curva-se emfim paretico; normal na manhã seguinte.

Cobaio 4.—Recebe 5 mgs. de veneno aquecido, por injecção intramuscular; forte edema na manhã seguinte, mas muito menos accusado do que no animal testemunha, desapparecendo ao fim de 4 ou 5 dias. Nenhum outro symptoma foi observado.

Ha, pois, sensivel attenuação do veneno a 98.° cuja toxicidade, entretanto, não é completamente abolida, nem a 120°.

Parte do veneno soluvel no alcool:—90 mgs. de veneno de cultripes são tratados por 200 c. c. de alcool absoluto, durante alguns mezes; depois de filtração e evaporação obtem-se cerca de 18 mgs. de um residuo escuro pulverulento, muito menos toxico do que o veneno total.

Pombo 72.—Recebe 6 mgs. por via venosa; nenhum symptoma.

Lachesis lanceolatus, de 30 c.—Recebe 6 mgs. d'este veneno por via gastrica; paralysia em 5 minutos, ligeiras convulsões e morte em 20 minutos.

Tratamos igualmente 55 mgs. de veneno por 200 c. c. de ether, obtendo por evaporação do fitrado, 10 mgs. de uma substancia amarellada e de toxicidade comparavel a substancia soluvel no alcool absoluto.

Tentativa de immunisação: — A presença de substancias proteicas podia deixar crer na possibilidade de obter-se uma immunidade solida contra este veneno. Os resultados de nossas tentativas, nesse sentido, foram, entretanto, contrarios a essa espectativa. Um animal tendo recebido em doses progressivamente crescentes sem accidentes, duas minimas mortaes do veneno total, sucumbe, entretanto, muito mais rapidamente do que o animal testemunha, não immunisado, ao receber a minima mortal do veneno aquecido a 120°. Houve, pois, immunidade sómente contra a parte albuminoide do veneno, não se dando o mesmo com relação a parte thermoresistente, que longe de determinar a formação de anti-corpos, accumulou-se no organismo, determinando a morte rapida do animal, ao receber uma só minima mortal de veneno aquecido, consequentemente sem a parte albuminoide.

Eis o protocollo de uma das tentativas de immunisação, feitas no coelho, com solução de veneno fresco em agua distillada; injecções sub-cutaneas:

Coelho 121, peso 1820 grs.:

5-11-25—recebe	1,25 mg.	13-11-25—recebe	10 mgs.
6-11-25—recebe	2,50 mg.	14-11-25—recebe	11,25 mgs.
7-11-25—recebe	3,75 mg.	16-11-25—recebe	12,50 mgs.
8-11-25—recebe	5,0 mg.	17-11-25—recebe	13,25 mgs.
10-11-25—recebe	6,25 mg.	19-11-25—recebe	7,50 mgs.
11-11-25—recebe	7,50 mg.	21-11-25—recebe	15,0 mgs.
12-11-25—recebe	8,75 mg.	24-11-25—recebe	30,0 mgs.

Total do veneno recebido até 24-11-25, 134,50 mgs. Peso do coelho 1,780 grs.

Testemunha: Coelho 27, recebeu 15 mgs. do veneno total, por injecção subcutanea; morte em 20 horas.

Prova de immunidade com o veneno aquecido durante 30 minutos a 120°.

1-12-25: —

Testemunha: — Coelho 32.—Recebe na veia 25 mg. de veneno secco dissolvido em agua distillada e esterilisada, durante 30 minutos a 120°, na autoclave; morte em 22 horas.

Coelho 121. — Immunisado, de accordo com plano anterior, tendo supportado na ultima injecção duas minimas mortaes do veneno total.—Recebe 20 mgs. do veneno aquecido a 120°; morte em 14 minutos.

Secreção abdominal:—Por maceração aquosa ou alcoolica da pelle do abdomen do P. cultripes, filtração e evaporação obtivemos uma substancia soluvel em agua distillada completamente desprovida de acção toxica, tanto por via gastrica como por via parental, nos animaes sensiveis.

CAPITULO III

LEPTODACTYLUS PENTADACTYLUS

Laur.—Ran ou Gia.

O *Leptodactylus pentadactylus*, é uma das especies de batrachios que a maiores dimensões pode attingir, egualando ao tamanho dos grandes sapos (Bufos), com os quaes por vezes, é confundida, pelo vulgo, apezar de seus caracteres differenciaes perfeitamente distinctos.

Além de suas proporções avantajadas, ha a registar, nesta especie, os seguintes caracteristicos: cabeça achatada, sem crista ossea, focinho alongado; presença de dentes no maxillar superior; membrana do tympano bem apparente; as palpebras não prolongadas em ponta como nos Ceratophrys; os braços e principalmente as coxas attingem um desenvolvimento extraordinario, notadamente nos machos; estes ultimos, no periodo de actividade sexual, apresentam fortes excrescencias corneas nas mãos e dois pontos peitoraes muito duros; a pelle é sempre humida, coberta de mucus de acção urente, quando penetra nas soluções de continuidade dos tegumentos; na face dorsal, sobre os membros existem pequenissimas granulações glandulares mais ou menos numerosas assim como em duas series de cada lado do dorso. Os exemplares velhos podem attingir a 17 centimetros de comprimento. Eis as dimensões do macho adulto: comp. 170 m. m.; comp. da cabeça 56 m. m.; largura maxima da base 64 m. m.; patas ant. 100 m. m.; patas post. 220 m. m.; espessura do braço 26 m. m.; espessura da coxa 46 m. m. *W*

A côr é variavel de um para outro individuo; o fundo da face dorsal é geralmente de um cinzento esverdeado, mais ou menos escuro, as vezes manchada de negro. Os membros são da côr do fun-

do, com faxas transversaes mais escuras; a face interna das coxas é vermelha, com um desenho negro; a face ventral é branca com um desenho negro mais ou menos carregado. Alguns exemplares são quasi negros no dorso, outros avermelhados.

E' uma especie aquatica, muito espalhada e muito commum em certas regiões.

Temos recebido exemplares de um grande numero de localidades do Estado de S. Paulo, de Santa Catharina, do Paraná, de Minas Geraes e de Goyaz. *Lutz* assignala o facto de não ser encontrada no Districto Federal.

Não tivemos opportunidade de fazer observações precisas sobre os seus habitos. *Lutz* diz que ella pode engulir facilmente outras rans de regular tamanho e pintos. No interior gosa da reputação de attacar os pintos, conforme nos informou um correspondente ao nos enviar um exemplar, que classificou de "*sapo devorador de pintos*". Por nossa parte observamos, que um exemplar guardado, com um Leptodactylus gracilis, engoliu este ultimo.

As larvas e o desenvolvimento d'esta especie foram observadas por *Lutz*.

ESTUDO DO VENENO:

Não sendo possivel obter, directamente, o producto das secreções cutaneas d'esta especie, recorremos ao processo de maceração tanto em agua distillada, como em alcool ou ether.

Extracção pelo alcool:—Pelles inteiras tratadas, pelo alcool absoluto, não abandonaram substancia alguma toxica; o residuo obtido, depois de filtração e evaporação do alcool, redissolvido em agua distillada, apresentava reacção fracamente acida ao tournesol; pela addição de acido chlorhydrico, de acido azotico, de ammoniaco, de sulfato de ferro, não dá precipitado algum ou mudança de coloração; com um grande excesso de acido sulfurico, coloração azul palido, tornando-se negro pela ebulição; a solução de permanganato de potassio a 1°/°° é rapidamente descorada.

A injecção de 10 mgs. na veia do pombo ou no tecido subcutaneo do coelho ou a administração da mesma dose, por via gastrica a uma pequena Lachesis lanceolatus, não determina phenomeno algum de envenenamento, nem reacção local.

Extracção pela agua distillada:—Pelles inteiras, da parte abdominal, tratadas pela agua distillada, fornecem, ao contrario, uma substancia toxica de propriedades bem differentes das do veneno do Bufo. Para obtel-a basta deixar as pelles em contacto com agua distillada, durante duas ou trez horas, filtra-se, em seguida o producto d'esse macerado, obtendo-se um soluto opalescente, viscoso, neutro ao tornesol, com cheiro forte *suigeneris*, muito semelhante ao do animal vivo. Este soluto coagula pela addicção de alcool e dos acidos fortes. Não é toxico por via gastrica, nem mesmo para os mais sensiveis ophidios. Por via venosa mata o pombo rapidamente. Os solutos evaporados na estufa a 37° e retomados pela agua distillada, perdem a toxicidade.

1.° de Junho de 1926.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VENIN DES BATRACIENS

PAR LES DRS.

VITAL BRAZIL ET J. VELLARD.

1. — Les traditions de différents peuples attribuent aux crapauds des propriétés venimeuses et en de nombreuses regions ces animaux sont employés empiriquement dans la cure de diverses maladies.

De nos jours des accidents locaux ou généraux, parfois même mortels, ont été signalés par divers observateurs, tant chez les animaux, que chez l'homme á la suite de l'ingestion de ce venin ou dapplication sur la peau ou les muqueuses.

2. — Les recherches expérimentales réalisées sur les diverses sécrétions des batraciens, principalement des crapauds, ont abouti à des conclusions très differéntes les unes des autres soit sur leur origine, soit sur leur nature chimique, leur action physiologique ou leur degré de toxicité.

3. — Dans le travail actuel les Auteurs ont étudié les sécrétions cutanées de plusieurs batraciens du Brésil: *Bufo marinus*, L., *B. paracnemis*, Lutz, *B. arenarum*, Hensel, et *B. crucifer* Wied, de la famille des *Bufonidae* ou crapauds proprement dits; et du *Ceratophrys dorsata* Wied ou Intanha, du *Pyxicephalus cultripes*, Rhet et Ltk. et du *Leptodactylus pentadactylus*, Laur. grande grenouille ameri-caine ou gia, de la famille des *Cystignathidae*.

4. — La sécretion laiteuse fournie par les nombreuses glandes dorsales des *Bufo*, groupées en petites papules ou en amas volumineux (paratoides etc.) constitue un venin extrêmement actif, semblable, sauf de légères variations dans les propriétés chimiques, chez tous les Bufo étudiés et très différent des venins ophidiques ou arachnidiques.

5. — Se desséchant rapidement à l'air, il se redissoud lentement mais complétement dans l'eau distillée et les solutions salines faibles, partiellement dans l'alcool, l'éther, le chloroforme et l'acétone; il résiste sans altération à la tempèrature de 160°, à l'action de la lumiére, du temps, des acides forts et des alcalis avec plusieurs des quels il donne des réactions colorées; il ne contient pas de substances albuminoides permettant le développement des germes, sans posséder de propriétés antiseptiques.

6. — Doué de pénétration extraordinaire à travers toutes les muqueuses, il agit aussi rapidement par cette voie que par voie parentale; il détermine d'abord une période d'agitation acompagnée de nausées, de vomissements, d'hypersécrétion, suivie de parésie et de paralysie à début postérieur entre coupée de violentes convulsions toniques; le coeur s'arrête après la respiration; hyperthermie et mydriase notables; localement, ischémie initiale des muqueuses, puis forte irritation locale, pouvant déterminer des ophtalmies graves, ou même la cécité définitive, des perforations stomachales, des édèmes hémorragiques énormes.

7. — Sur le coeur son action se traduit d'abord par le renforcement et l'augmentation des battements, suivis d'arythmie; il parait dépourvu d'action diurètique mais possède une affinité spéciale pour les éléments nerveux.

8. — Dépourvu d'action protéolytique ou hémolytique, il retarde in vitro la coagulation. Il ne provoque pas la formation d'anti corps mais s'accumule dans l'organisme, la mort survenant quand le total des doses fractionnées injectées est équivalent à la dose minima mortelle d'emblée.

9. — Tous les animaux sont sensibles à son action et le propre crapaud succombe à une dose 200 ou 300 fois moindre que celle qu'il peut fournir.

Les minimas mortelles par diverses voies ont été determinées pour des représentants de toute l'échelle zoologique. Les ophidiens sont particulièrement sensibles à ce venin.

10. — La sécrétion abdominale des Bufo, beaucoup moins active que le venin granuleux parait devoir ses proprietés à la présence de petites quantités de ce dernier ou d'un corps très semblable.

11.—Accidentellement des traces de venin peuvent passer dans la circulation communicant ainsi une toxicité très faible et passagère au serum des crapauds.

12. — Le *ceratophrys dorsata* ou Intanha, gros batracien des forêts brésiliennes, très redouté des gens de l'intérieur est dépourvu de sécretion venimeuse; mais il possède de fortes dents et une très grande force musculaire qui lui permettent d'infliger des morsures douloureuses et de tuer les petits animaux (souris, batraciens, etc). dont il se nourit.

13. — Le *pyxicephalus cultripes*, au contraire possède un venin laiteux, de nature mixte, formé d'une partie albuminoide et d'une autre partie analogue au venin des bufo; le partie albuminoide est susceptible de provoquer la formation d'anti corps correspondants, qui ne protégent pas contre la partie non albuminoide.

14. — Le *Leptodactylus pentadactylus*, ou gia, est une très grosse grenouille dépourvue de venin proprement dit; elle sécrète cependant un mucus cutané irritant, déterminant la mort du pigeon par injection endoveineuse, inactif par voie gastrique et perdant toute tocicité après dissécation.

1.er Juin 1926.

BIBLIOGRAPHIA

1 — *Faust* (*Edwin S.*) — Ueber Bufonin und Bufotalin, die wirksamen Bestandtheile des Krôtenhautdrüsensecretes:—*Archiv für exp. Path. und Pharm.*—Bd. 47, 1902.

2 — *Ambroise Paré*—(Les oeuvres de.....) 1575.

3 — *Piso et Marcgrav*—*Historia naturalis Brasiliae*—1648.

4 — *Novaro*—Action toxique du venin de crapaud pour l'homme et les animaux. *C. R. Soc. Biologie*, 2.° 1922—pag. 824-26.

5 — *Rondelet.*—(1507-1566), citado por Ambroise Paré.

6 — *Delamazière.*—Observation sur le venin du crapaud.—*Journ. de Médecine, chirurgie et pharmacie.*—XV, p. 220—Paris 1761.

7 — *Laurentius.*—Specimen medicum exhibens synopsis reptilium Vienna 1768.

8 — *Gemminger.*—Tôdtliche Vergiftung eines Sperbes durch eine Kröte—*Illust. Medic. Zeitung.*—1-1852.

9 — *Lataste* a) Essai d'une faune herpétologique de la Gironde, Bordeaux—1876.

b) Observation relative à l'action sur l'homme de la sécrétion cutanée des Batraciens.—*Ass. française pour l'avancement des sciences.*—1876.

10 — *Bringard.*—Curieux cas d'empoisonnement d'un chien par l'absorption buccale de la sécrétion des glandes cutanées d'un crapaud.—*Arch. med. d'Angers.*—IX-1905.

11 — *Boulenger.*—The tailless Batrachians of Europe.—London.

12 — *Staderini.*—a) *Ann. di Ottalmologia*—XVII, fasc. V-VI-1889.

b) *Bol. Ac. de Fisol. de Sienna*—1888-IV. fasc. 7.

13 — *Novaro.*—Action pharmocodynamique du venin de crapaud.—*C. R. Soc. de Biologie.*—LXXXVIII, p. 371-1923.

14 — *Davy* (*J*).—Observation of the poison of the common Toad. *Phil. Trans.*—1826.

15 — *Duméril et Bibron.*—Erpétologie générale ou histoire naturelle compléte des reptiles.—Vol. I, pag. 205.—Paris, 1835.

16 — *Gratiolet et Cloetz.*—a) Note sur les propriétés venimeuses de l'humeur latescente que sécrétent les pustules cutanées de la Salamandre terrestre et du crapaud commum.—*C. R. Ac. des Sciences.*—XXXII-1851

b) Nouvelles observations sur le venin contenu dans les pustules cutanées des batraciens.—*C. R. Ac. des Sciences.*—XXIV.-1882.

17 — *Vulpian.*—a) Sur le venin du crapaud commun.—*C. R. Soc. Biologie.*—VI-1854.

b) Absorption du curare et du venin du crapaud commun..... *C. R. Soc. de Biologie.*—1855, pag. 90-91.

c) *Gazette medicale* de Paris, p. 559-560-1855.

d) Étude physiologique du venin du crapaud, du triton et de la Salamandre terretre. *C. R. Soc. Biologie*—2.ª série III-18 6.

e) Note relative à l'action du venin des Batraciens sur les animaux qui le produisent.—*C. R. Soc. Biologie*—XVI-1865

18 — *Cuvier.*—Leçons d'anatomie comparée (2.° édition)—III, pag. 613-1855.

19 — *Rainey.*—On the structune of the cutaneous follicles of the Toad,.....—*Quartely jorn. of minoscopic sc.*—III-1855.

20 — *Claude Bernard.*—a) Leçons sur les substances toxiques et médicamenteuses.—Paris, 1857, pag. 255.

b) Leçons de pathologie expérimentale.—Paris, 1857—pag. 154-155.

21 — *Fornara* (Domenico).—a) Studi sperimentali sopra l'azione dell'upas antiar e del veleno del Rospo... Monogr.—Genova, 1872.

b) Sur l'effet physiologique du venin de crapaud.—*Journ. de Thérapeutique*—IV, 1877, pag. 882.

22 — *Pugliese, A.*—a) Sull'azione methemoglobinogena del veleno de Rospo.—Arch. de Farm. e Terapeut. II-1894.

b) Archiv. Ital. Biol. XXII-1895.

23 — *Phisalix C.*—a) Propriétés immunisantes du venin de la Salamandre du Japon contre le venin de vipère—C. R. Soc. de Biologie. XLIX-1897.

b) Nouvelles expériences sur le venin de la Salamandre terrestre.—*C. R. Ac. de Sciences.* CLX-1899.

c) Corrélations fonctionelles entre les glandes à venin et l'ovaire chez le crapaud commun.—C. R. Ac. des Sciences. CXXXIII-1903.

d) Les venins considérés au point de vue de la Biologie générale et de la Pathologie comparée.—*Rev. Générale des sciences.* 30 juillet 1903

e) Influence de l'émanation de radium sur la toxicité des venins.—*C. R. Ac. de Sciences.* CXL-1905.

Phisalix et Bertrand.—a) Sur le venin des batraciens.—*C. R. Ac. des Sciences.*—XCVIII-1884.

b) Recherches sur la toxicité du sang du crapaud commun.—*Archives de Phys. normale et Pathologique.*—5.ª série, V, Paris 1893.

c) Sur les principes actifs du venin de crapaud commun.—*C. R. Ac. Sciences.*—CXXXV-1902.

Phisalix et Contrejean.—Nouvelles recherches sur les glandes à venin de la salamandre terrestre.—*C. R. Soc. de Biologie.*—XLIII-1891.

24 — *Heuser* (*O*).—Arch. intern. de pharmacodyn., et thérap.—X 1902.

25 — *Krakow* (*N*).—Russky Wratsch—1904 n. 21 (citado por H. Wieland).

26 — *Kobert* (*R*). — a) Gift absonderung der Kröten. — *Sitzungsberichte des Dorpates Naturforschergesellchaft.*—Apr. 1889.

b) Lehrbuch der Intoxikationen.—2.ª ed. 1906 II, p. 467-470; ibid. pag. 1221.

27 — *Pröscher.* — Zur Kenntniss des Krötengiftes.— *Beitr zur Chem. Phys. und Path.*—1902.

28 — *Pierotti.*—Recherches expérimentales sur le venin de crapaud et son action physiologique. Monographia Pisa. Resumido in Arch. ital. de Biol.—XLVI-1906.

29 — *Fühner* (*Herm.*) — *Archiv. Exp. Path. e Pharmak.* — LXIII 1910.

30 — *Wielamd* (*Hermann*).—Ueber die Bedeutung des Calciums für die geringe Empfindlichkeit der Kröte gegen Herzgifte — *Bioch Zeitschrf.* — CXXVII-1921.

31 — *Dehaut.* — Les venins des batraciens et les batraciens venimeux.—Paris, 1910.

32 — *Phisalix* (*Marie*).—a) Recherches embryologiques, histologiques et physiologiques sur les glandes à venin de la salamandre terrestre. Paris, 1900.

b) Immunité naturelle des vipères et des couleuvres contre le venin des batraciens et en particulier contre la salamandrine. *Journ. de Physiologie et Path. générale.*—1909.

c) Animaux venimeux et venins, II, Paris, 1922.

d) Le venin cutané muqueux du bombinator pachipus. Fitz. Var. brevipes—*Bull. Mus. Histoire naturelle.*—Paris 1923, n.° 1.

e) Le venin cutané granuleux du Bombinator pachipus.—*Bull. Mus. Hist. nat.* Paris, 1923, n.° 7.

33 — *J. Baptista de Lacerda.*—Algumas experiencias com o veneno de Bufo ictericus. Spix.—*Archivos do Museu Nacional.* III Rio de Janeiro, 1878.

34 — *Abel e Macht.*—2 ctystalline pharmalogical agents from the Bufo agua.—*Journ. of pharm. and exp. ther.*—III p. 320-322 1912.

35 — *Acrisio Bezerra.*—O sapo.—These da Bahia, 1915.

36 — *Pelletier.*—Note sur le venin des crapauds.—*Journal de Médecine, chirurgie, pharmacie, etc.*—XL pag. 75—Paris, 1817.

37 — *Davy (J).*—On the acrid fluid secreted by the common Toad.—*Res. Phsy. and Anat.*—I Londres, 1839.

38 — *Casali e Fornara.*—Il veleno del Rospo e la Bufidina.—Studi sperimentali del Dott. Domenico Fornara, con una nota sopra la esperienza chimica relativa del Prof. Adolfo Casali.—*Revista clinica de Bologna,* n.° 10, 1873.

39 — *Calmels.*— Sur le venin des batraciens.—*C. R. Ac. des Sciences* XCVIII, 1885.

40 — *Bufalini.*—Sopra una reazione del veleno del rospo.—*Ann. de chim. e farmac.*—ser. 2.°, IV, 1885.

41 — *Hewlet.*—The venom of the Toad and Salamander.—*Science Progress.*—I, 1897.

42 — *Bertrand.*—Sur la nature de la Bufonine.—*C. R. Ac. des Sciences.*—XXXV, 1902.

43 — *Shipley and Wislocki.*—*Publication n.° 123 of the carnegie Institution of Washington.*—(Citado por Swale Vincent).

44 — *Hautz (Oswald).*—Harnstoff im Harne der Krôte (Bufo cinereus). Ann. de Chemie und Pharm.—LXXXIV, 1852.

45 — *Phisalix (Mme.) e Dehaut.*—Action physiologique du venin muqueux d'um batracien le Discoglossus pictus.—*Bull du Mus. d'hist. nat.*—XIV, Paris, 1908.

46 — *Phisalix (Mme.) e Dehaut.*—Action physiologique du venin muqueux d'um batracien anoure, le Pelobates cultripes.—*Bull du Mus. d'hist. nat.*—XLVI, Paris, 1909.

47 — *Sauvage.*—Sur l'action du venin de quelques batraciens de France.—*Ass. française pour l'avancement des Sciences.*—Montpellier, 1879.

48 — *Gidon.*—Venins multiples et toxicité humorale chez les batraciens indigènes.—These de Paris, 1897.

49 — *Camis.*—Sur la résistance au curare du Leptodactylus occellatus et sur d'autres points de la physiologie générale des muscles.—Archiv. Ital. de Biol.—LXVI, 1917.

50 — *Houssay y Hug.*—a) Toxicidade de curare para la Rana y el sapo americano y el cobayo.—*La semana medica,* Buenos Ayres 1916 e *Revista de la Associacion medica argentina,* 1916.

b) La curarizacion del Leptodactylus occellatus. — *La semana medica,* Buenos Ayres 1916 e *Revista de la Associacion medica argentina.* 1916. C. R. Soc. de Biologie, Paris, 1916.

51 — *Lutz (Adolpho)*.—a) Observações sobre os Batrachios brasileiros. 1.ª parte:—O genero Leptodactylus.—*Instituto Oswaldo Cruz*, 26 de Abril de 1926.

b) Nota previa sobre especies novas de batrachios brasileiros.—*C. R. Soc. de Biologie*, XC, 1924.—XCIII, 1925, e *Instituto Oswaldo Cruz*, 10 de Março de 1926.

52 — *Bert (Paul)*.—Venin cutané de la grenouille.—*C. R. Soc. de Biologie*.—1885, pag. 524.

53 — *Dutartre (Abel)*.—*C. R. Ac. des sciences*.—CX, p. 199, 1890.

54 — *Leroy*.—Rana temporaria posséde-t-elle comme Bufo vulgaris un poison cutané.—*Archi. inter. de Physiologie*—IX, fasc. 3, 1910.

55 — *Pagenstecher (Alex.)*.—Allgemeinen Zoologie.

56 — *Escobar*.—Sur une rainette de la Nouvelle Grenade qui sécrète un venin dont les Indiens se servent pour confectionner leurs flèches.—*C. R. Ac. des Sciences*.—LXVIII.—1869.

57 — *Posada Arango*.—Le poison de la rainette des sauvages du Choco.—*Arch. de Médecine navale*.—XCI, 1871.

58 — *Nieden Fr*.—Amphibia.—Anura I.—*Das Tierreich*.—Leipzig, 1923.

59 — *Leydig*.—Ueber die allgemeinen Bedeckungen der amphibien.—*Archiv. für mikr. Anat*.—XII, 1876.

60 — *Calmels*.—E'tude histologique des glandes à venin du crapaud et recherches sur les modifications apportées dans leur évolution normale par l'excitation électrique de l'animal.—*Archiv. de Phy. normale et Path*.—I 1883.

61 — *Eckhard*. — Ueber den Bau des Hautdrüsen des Krôten. — *Muller's Archiv. für Anat*.—Jahrgang, 1849, p. 425-428.

62 — *Ranvier*.—Morphologie du système lymphatique; de l'origine des lymphatiques dans la peau de la grenouille.—*C. R. Ac. Sciences*.—CXX, 1895.

63 — *Weiss (Otto)*.—Ueber die Hautdrüsen von Bufo cinereus.—*Archiv. für mikr. Anat*.—LIII, 1899.

64 — *Swale Vincent*.—An introduction to the Study of Secretion. London, 1924.

65 — *Engelmann*.—Die Hautdrüsen des Frosches.—*Pflüger's Archiv. f. d. ges. Phys*.—V, 1872.

66 — *Schultz (P)*. — Ueber die giftdrüsen der Krôten und Salamander.—*Archiv. f. mikr. anat*.—XXXIV, p. 11-57, 1889.

67 — *Seeck (Oscar)*.—Ueber die Hautdrüsen einigen amphibien.—*Inaug. Diss. Dorpat*.—1891.

68 — *Maurer*.—Die epidermis und ihre abkömmlinge.—Leipzig, 1895.

69 — *Ancel*.—Etude du développement des glandes de la peau des Batraciens et en particulier de la salamandre terrestre.—*Archiv. de Biol. de Van-Ben. et Bambeke*.—XVIII, 1901.

70 — *Vital Brazil e J. Vellard*.—Contribuição ao estudo do veneno dos Batrachios do genero Bufo. Nota previa publicada no Brazil Medico 26 de Setembro de 1925.

71 — *Jayme R. Pereira*.—Sobre a acção physiologica do veneno de Sapo.—Jornal dos Clinicos, n.º 8—Rio de Janeiro, 1926.



Ceratophrys dorsata, Wied

Nome vulgar: Intanha ou Sapo de chifre

$\frac{4}{5}$ do tamanho natural

RUD. FISCHER, ad nat.



Pyxicephalus cultripes Rhdt. et Ltk. ♂

Tamanho natural



Bufo marinus L. ♂
(= B. agua Seba)
Tamanho natural



Bufo marinus L. ♀
(= B. agua Seba)
Tamanho natural



Bufo paracnemis Lutz ♂

Tamanho natural



Bufo paracnemis Lutz ♀

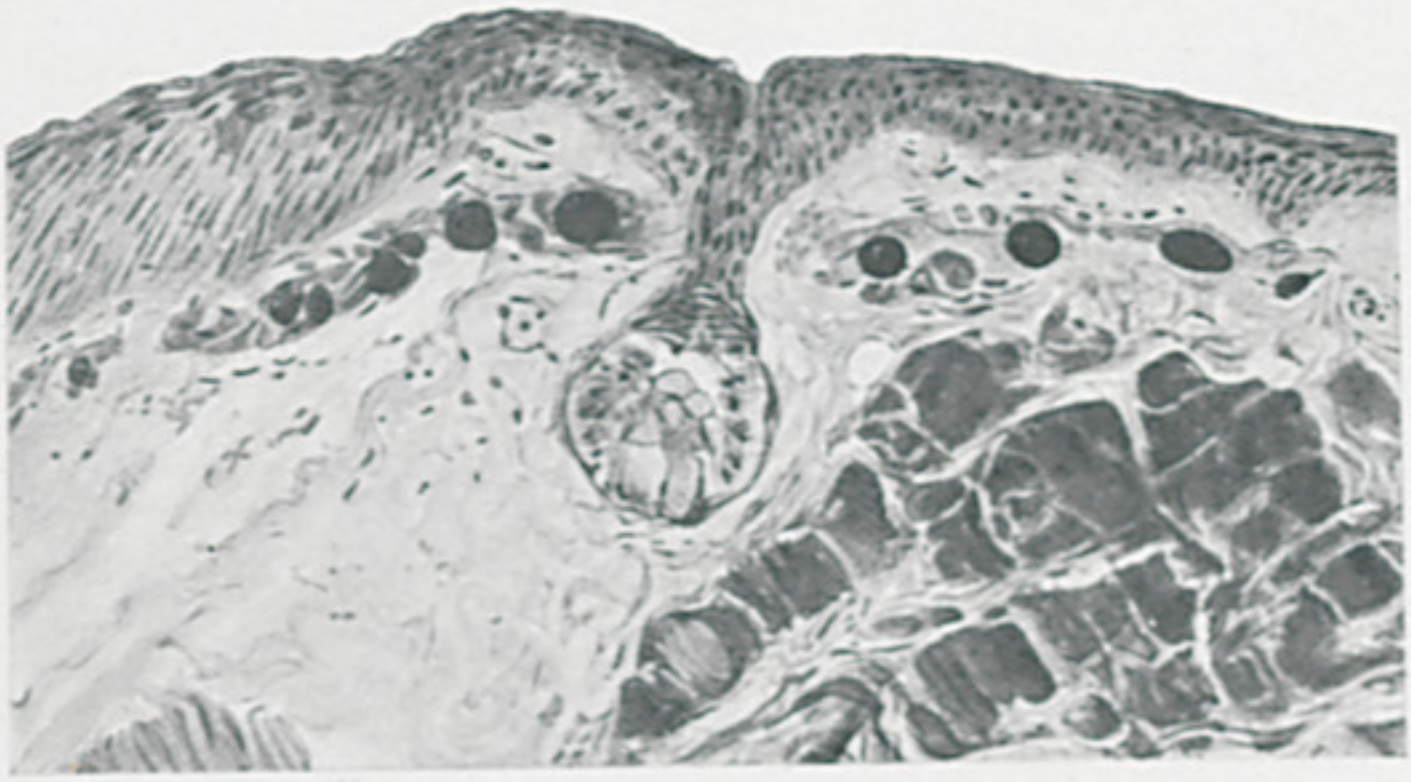
¾ do tamanho natural





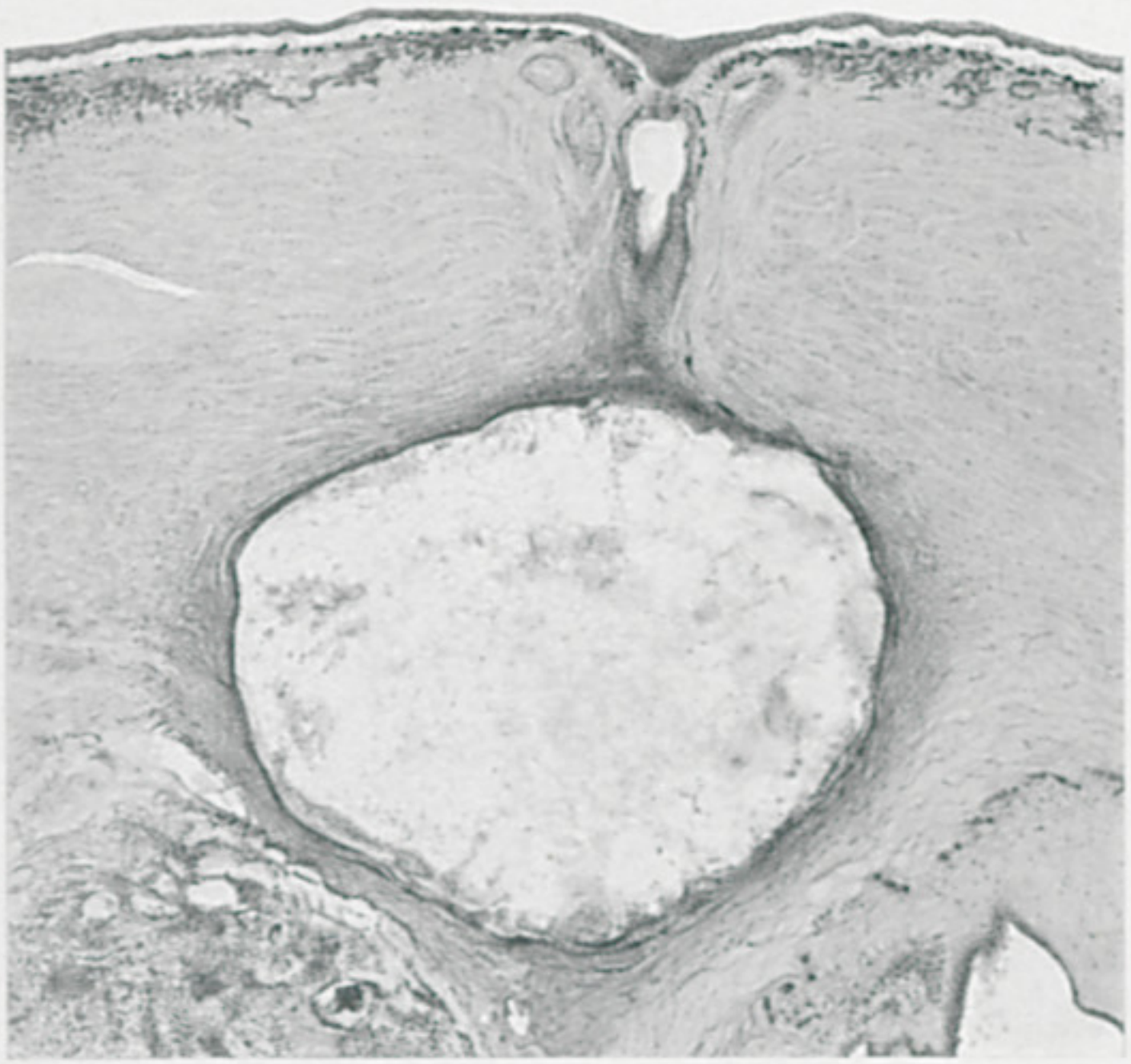
Bufo crucifer Wied

Tamanho natural



Glandula mucosa de Bufo marinus
Glande à mucus de Bufo marinus

augm. 200 ×



Glandula de veneno de Bufo marinus
Glande de venin de Bufo marinus

augm. 40 ×

RUD. FISCHER, del.



Leptodactylus pentadactylus Laur. ♂

$^{2}/_{3}$ do tamanho natural

Trabalho do Instituto de Hygiene de S. Paulo

NOTAS SOBRE OS OXYURUS PARASITAS DAS BARATAS DOMESTICAS, COM A DESCRIPÇÃO DE UMA NOVA ESPECIE: OXYURUS AUSTRALASIAE N. Sp.

PELOS

DRS. SAMUEL B. PESSOA E CLOVIS CORREA

(Assistente) (Aux. academico)

A flora e a fauna das baratas domesticas foram bem estudadas entre nós, principalmente pelo eminente parasitologista brasileiro P. S. de Magalhães. Encetando nós em meiados do anno passado estudos semelhantes, pudemos observar quanto tinha razão Magalhães quando dizia que a "Periplaneta americana peut fournir des materiaux bien plus abondants et variés par des recherches interessantes et riches em renseingnements". Ao contrario deste autor que se limitou ao estudo da fauna da Peripanleta americana L., tivemos a opportunidade de além dessa, estudar, de preferencia os nematoides, da Periplaneta Australasiae Fab., Phyllodromia germanica L. e Panchlora Maderae, Fab., que são as especies que mais commumente se encontram nas casas no E. de S. Paulo.

Dissecamos centenas destes arthropodos, de varios logares do Estado e mesmo de alguns estados visinhos, e as notas que aqui hoje trazemos sobre os Oxyurus parasitas destas baratas são baseadas nas observações feitas nestas dissecções.

As especies de Oxyurus encontrados foram as mesmas já descriptas por outros observadores (Butsckli, Hammerchmidt, O. Galeb e Magalhães); adiante porém, damos a descripção de uma especie encontrada em uma nympha da P. Australasiae, e que julgamos ser nova, pois que não encontramos descripção della, nos autores que se occuparam do assumpto.

A P. Americana e a P. Australasiae, são infectadas principalmente pelo Oxyurus Diesing, Hammersch., e Oxyurus Bulhõesi, Magalhães; mais raramente encontramos nella o Oxyurus blattae orientalis Hammersch. Quanto ao Oxyurus Künckeli, O. Galeb, que Magalhães diz que jámais o encontrou no Rio, ainda que suas observações tenham sido feitas em um numero consideravel de P. americana e em todos os mezes do anno, conseguimos encontral-o em uma nym-

pha da P. americana, 3 vermes adultos todos femeas, e duas outras femeas n'uma P. Australasiæ adulta. Estas baratas foram capturadas em uma choupana em um dos bairros de S. Vicente.

A Phyllodromia germanica, tão commum nas nossas residencias, foi encontrada infectada sómente pelo Oxyurus blatticola Galeb. Quanto a Panchlora Maderæe, especie mais commum nas casas no interior de S. Paulo e no littoral, rara na Capital, encontramos em uma dezena de especies dissecadas o Oxyurus blattae orientalis.

Desta especie só dissecamos as encontradas nas casas; é possivel que no seu estado selvagem apresente fauna diversa das especies caseiras. As especies domesticas que estudamos apresentavam adaptação tão perfeita á mudança do meio, que além dos Oxyurus que adquiriram das especies domesticas estavam infectadas pela Gregarina blattarum, v. Sieb.

Galeb nas suas pesquizas sobre os entozoarios dos insectos diz que ha uma relação estreita entre o numero dos nematoides existentes em um insecto e o numero dos infusorios; mais os Oxyurus são numerosos, mais o numero destes protozoarios é numeroso, e quando o intestino não contém helminthos os infusorios tambem faltam. Presume este autor que cada especie de nematoide têm por commensal um infusorio de especie particular. Este commensalismo presumivel não o constatamos absolutamente quanto ás baratas; assim encontramos baratas apresentando numero consideravel de infusorios sem estar parasitadas por vermes; assim como o caso contrario se verificou de baratas infectadas por numerosos vermes sem encontrarmos infusorios. Achamos, pois que não ha relação entre infusorios e os nematoides parasitas das baratas.

Como já fizemos notar atraz, a P. Americana e a P. australasiae, podem albergar até 3 especies differentes de oxyurus ao mesmo tempo; as outras especies geralmente albergam uma unica. Galeb diz que no caso de se encontrar o insecto parasitado por mais de uma especie de oxyurus, estabelece-se entre os habitantes do mesmo intestino uma luta pela existencia das mais curiosas; uma especie prospera em detrimento da outra, apoderando-se de todo alimento; um dos dois nematoides abandona a luta e desapparece.

Nossas observacões estão em completo desaccordo com a maneira de ver deste notavel biologista. Assim em uma P. Americana infectada com 45 oxyurus, encontramos tres especies diversas em numeros proporcionaes, e todos vivendo bem; uma outra estava infectada por 3, O. Diesing, 2, O. Bulhõesi, e 2, O. Blattæ—orientalis; outra por 2, O. Künckeli, 3, O. Blattae—orientalis e 2, O. Diesing; uma P. Australasiæ apresentava 3, O. Diesing; e 2 O. Bulhõesi, e como estas poderiamos multiplicar as observações.

Quanto á acção pathogenica destes vermes sobre o seu hospedador parece ser nulla, pois mesmo as baratas mais fortemente infectadas, nada apparentemente apresentavam de anormal, e mesmo mantivemos em captiveiro durante muitos mezes baratas que após eram dissecadas sendo em muitas dellas encontrado grande numero de parasitas.

OXYURUS AUSTRALASIAE n. sp.—Pequenos nematoides de corpo cylindrico, bastante transparentes, regularmente adelgacados nas suas duas extremidades, terminando-se na extremidade poste-

rior por appendice caudal muito pequeno, reduzido a um simples aguilhão, semelhante ao do O. Blatticola—Galeb. Cuticula finamente estriada transversalmente, apresentando anneis estreitos; ella é desprovida de expansões lateraes.



1

A femea adulta mede 2,70 a 2,75 m. m. de comprimento; a maior largura do corpo é de 0,22 m. m. Bocca munida de 3 labios; o esophago é longo, estreito e cylindrico, medindo 0,27 a 0,31 m. m. de comprimento; não possue membranas, nem bulho anterior. O bulbo dentario é construido segundo o typo commum dos Oxyurideos; o orificio pylorico está situado a 0,40 m. m. da bocca. Intestino começando por uma ligeira dilatação na sua origem, e é sinuoso; o intestino não apresenta nenhuma bifurcação ou bolsa lateral. Orificio anal abrindo-se á 0,27 m. m. da ponta da cauda apresentando fibras divergentes que do contorno do anus dirigem-se para o lado dorsal do corpo. Ovario unico, envolvendo em semi-circulo a porção inferior do intestino. Orificio vulvar muito proximo da bocca, situado á distancia de 0,20 a 0,22 m. m. das papillas buccaes. Ovo achatado de um só lado medindo quando maduro 0,075 a 0,078, m. m. de comprimento por 0,045 a 0,047 m. m. de largura. Tem duas membranas sendo a interna muito delgada. A' época da maturação o liquido previtellino cora-se em ama-



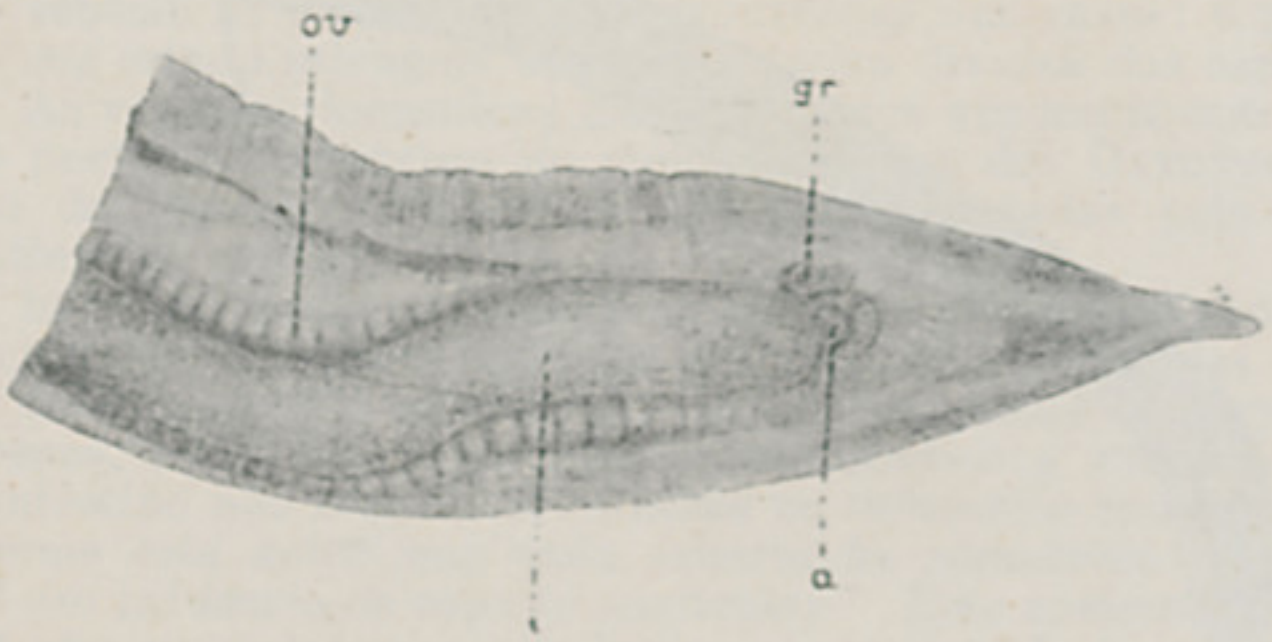
2

rello ouro, assemelhando-se ao ovo de O. Künckeli. A segmentação começa após a desova.

O macho é desconhecido.

Este Nematoide foi encontrado em numero de duas femeas no intestino de uma nympha da P. Australasiæ, apanhada no quintal de uma casa em Ubatuba.

E' possivel que este verme parasite outras especies de baratas selvagens.



3

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS:

a —anus
gr.—cellulas granulosas peri-anal
ov.—ovario
o —ovo
i —intestino
t —trompa
bd.—bulho dentario
u —utero
vg.—vagina
v —vulva
e —esophago
b —bocca

Fig. 1—Oxyurus Australasiæ—augmento de 40 diametros.
" 2—Extremidade anterior do O. Australasiae — augmentado 100 diametros.
" 3—Extremidade posterior do O. Austrlasiæ, augmento de 120 diametros.

AUTORES CITADOS

1 — *Magalhães*—P. S.—Archives de Parasitologie—1899—II pag. 361—1900—III pg. 34.
2 — *Galeb*—Osman—Archives de Zoolog. Exp. et Générale—1878—VII pg. 283.
3 — *Bütschli*—O. Zeitschrift für wiss. zool.—1875—XXI pag. 252.
4 — *Hammerschmidt*—Helminthologische Beitraege—Isis, 1838.

Maio de 1926.

NOTES SUR LES OXYURES DES BLATTES DOMESTIQUES AVEC LA DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE ESPÉCE OXYURUS AUSTRALASIAE SP. NOV.

PAR LES

DRS. SAMUEL PESSOA ET CLOVIS CORRÊA.

(TRAVAIL DE L'INSTITUT D'HYGIÈNE DE S. PAULO)

SOMMAIRE

Les blattes domestiques étudiées appartiennent aux espéces suivantes: Periplaneta Australasiæ Fab. et P. Americana L. Phyllodromia germanica L. et Panchlora Maderae Fab.; sauf une espéce jngée nouvelle tous les oxyures les parasitant ont déja été signalés par d'autres auteurs; ce sont: O Diesing Hammersch, et 2 fois seulement, O. Kunckeli chez P. Australasiæ et P. Americana; Phyllodromia germanica ne présente qu'O. blatticola Galeb, et Panchlora Maderae seulemen O. blattae orientalis.

Certaines blattes peuvent être parasitées par plusieurs espéces d'oxyures; il n'y a pas de relation entre l'abondance des infusoires et le nombre des vers parasites; enfin ceux-ci ne paraissent avoir ancun effet pathogéne pour leur hôte.

OXYURUS AUSTRALASIAE N. SP.

Petits nématoides de corps cylindrique, assez transparent, réguliérement effilé aux deux extrémités, la postérieure terminée par un appendice caudal trés petit, réduit á un simple aiguillon semblable á O. blatticola Galeb. Cuticule finement striée transversaiement présentant des anneaux étroits; elle est dépourvue d'expansions latérales.

La femelle adulte mesure 2,70 á 2,75 m. m. de longueur; la plus grande largeur du corps est de 0,22 m. m. Bouche munie de 3 lêvres; l'oesophage est long, étroit et cylindrique mesurant 0,27 á 0,31 m. m. de longueur; il ne possède ni membranes ni bulbe antérieur. Le bulbe dentaire est construit suivant le type commun des Oxyures; l'orifice pylorique est situé á 0,40 m. m. de la bouche. L'intestin commence par une lègére dilatation á son origine, est sinueux et ne présente ancune bifurcation ou bourse latérale.

L'orifice anal s'ouvre á 0,27 m. m. de la pointe de la queue présentant des fibres divergentes qui se dirigent vers la face dorsale du corps après avoir contourné l'anus; ovaire unique enveloppant dans un demi cercle la portion inférieure de l'intestin. Orifice vulvaire trés près de la bouche, situé á 0,20 ou 0,22 m. m. des papilles buccales. Oeuf aplati d'un seul côté, mesurant á maturité 0,075 á 0,078 m. m. de longueur sur 0,045 á 0,047 m. m. de largeur; il possède 2 membrannes dont l'interne est la plus fine. A' l'époque de la maturité le liquide prévitellin se colore en jaune d'or, ressemblant beaucoup á l'oeuf d'O. Künckeli. La segmentation commence aprés la ponte.

Mâle inconnu. Deux femelles de ce nématoide ont été trouvées dans l'intestin d'une nymphe de P. Australasiæ capturée dans la cour d'une maison d'Ubatuba.

Il est possible que ce ver parasite d'autres espéces de blattes sauvages.

(*Travail reçu pour publication le* 8 *de Maio de* 1926).

"IMMUNIZAÇÃO PER OS"

ESTUDO SOBRE AS DIFFERENÇAS DE PODER PATHOGENICO, TOXICO E IMMUNIZANTE DE 4 AMOSTRAS DE B. DE SHIGA.

PELOS

DRS. PAULO MARREY E EDUARDO VAZ.

(Assistentes do Instituto de Butantan).

Uma vaccina requer sempre duas condições essenciaes: efficacia, o que equivale a alto poder immunizante, e innocuidade.

A segunda condição não foi bem preenchida, para a vaccina dysenterica, por via sub-dermica, dada a toxicidade do germe morto.

Por via buccal, no coelho, o inconveniente foi verificado. Grande numero succumbe no decurso da immunização, com manifestações e lesões dysentericas.

Se bem que, no homem, ainda não tenham sido registados phenomenos reaccionaes, seria util verificar o que um de nós (1, 2 e 3) deixára entrever em trabalhos anteriores: o encontro de uma amostra menos toxica e mais vaccinante, *per os*, que outras, capaz de immunizar contra a prova infectuosa com essas outras, ainda que mais activas.

Para trabalharmos, com segurança, estudamos 4 amostras de b. de Shiga, encontrando caracteristicas todas as suas reacções.

Pelo mesmo plano, em circunstancias analogas, procurámos estabelecer as relações entre os seus diversos poderes: pathogenico (germe vivo), toxico (germe morto) e immunizante (germe morto).

AMOSTRA 1, *provinda do Instituto Bacteriologico de S. Paulo, com a indicação original—Ficker*, 1916.

Alguns protocollos que testemunham a sua actividade.

Cultura em agar inclinado, de 24 hs., suspensa em soluto physiologico esteril.

---

(1) Vaz (E)—"Dysenteria e immunização anti-dysenterica por via buccal"—Arch. Inst. Vital Brazil, 1924, t. II, fasc. 2.º, p. 191.

(2) Vaz (E)—"Immunidade local"—Dissertação inaugural.—Rio de Janeiro, 1924.—Typ. Rev. dos Tribunaes, p. 142, 143.

(3) Vaz (E)—"Immunização *per os* contra o b. de Shiga"—Contribuição ao estudo da natureza da immunidade.—Mem. Inst. Butantan, 1925, t. II. fasc. unico, pag. 99.

Coelho 174 (1.200 grs.)—0,1 de tubo na veia.—2 dias após par. membros ants. Peso 1.060 grs. Morte.

Coelho—318 (1.400 grs.)—0,1 de tubo na veia. No dia subsequente, paralysia e morte. Lesões intestinaes dysentericas, paralysia vesical.

Coelho—199 (1.100 grs.)—0,2 de tubo sob a pelle. No dia seguinte—fórte reacção local. Com 2 dias, installou-se paralysia, seguida de mórte. A' necropse—lesões intestinaes dysentericas e paralysia vesical.

Coelho—145 (1.250 grs.)—0,5 de tubo pela bocca.—Com dois dias, paralysia dos membros posteriores. Na noite do segundo para o terceiro dia, morte. Lesões intest. dys., par. vesical.

Podemos dizer que esta amostra mata coelho com symptomas e lesões dysentericas, nas dóses de:

0,1 *de tubo de cult. em agar inclinado, por via venosa, em média de* 1 *a* 2 *dias;*

0,2, *por via sub-dermica, em média—2 dias e meio.*
0,5, *per os, média—3 dias e meio.*

Dessa amostra bem pathogenica, procurámos conhecer a toxicidade das culturas em agar, suspensas em soluto physiologico, mortas pelo calor de 60°, durante uma hora.

Coelho—115 (1.400 grs.)—0,5 tubo pela bocca. Na manhã do 3.° dia, paralysia dos membros anteriores. A' tarde—morte—necropse—lesões intestinaes dysentericas e par. vesical.

Assim, nos ensaios de immunização, fomos prudentes, fraccionando e medindo bem as dóses, a ver da possibilidade de evitar os phenomenos toxicos.

Coelho—270:—

A 12 V. 25, pesando 1.450 grs., recebe a 1.ª dóse de 2 bilhões de germes.
A 14 V. 25, pesando 1.320 grs., recebe a 2.ª dóse de 4 bilhões de germes.
A 16 V. 25, pesando 1.200 grs., recebe a 3.ª dóse de 8 bilhões de germes.
A 18 V. 25, pesando 1.150 grs., recebe a 4.ª dóse de 15 bilhões de germes.

Decorridos 15 dias da ultima ingestão, foi feita a próva de immunidade com 0,1 de tubo de germe vivo (amostra 7), na veia. Morte na noite do 3/4 dia. Necropse—fócos hemorrhagicos no ceco, paralysia vesical.

A diminuição progressiva e sensivel do peso do animal, no decurso da immunização, mostra que as dóses foram fórtes, intoxicando-o, diminuindo-lhe a resistencia geral. A inoculação de germe vivo veiu ainda engravescer o seu estado. A morte do animal, sem symptomas e sem as lesões bem cunhadas e caracteristicas da infecção, originava duas interpretações: ou diminuição de resistencia geral, effeito da intoxicação, ou falta de immunidade especifica.

Para deslindar, bastaria diminuir as dóses de vaccina, afim de attenuar os effeitos toxicos. Se se obtivesse immunidade com estas

dóses menores, ficaria de pé, com maior razão, a hypothese da intoxicação, prevalecendo sobre a de falta de immunidade.

Assim sendo, demos a ingerir a 4 coelhos, de 2 em 2 dias, 2-4-6 e 8 bilhões de cultura morta. Com 15 dias, próva identica á do coelho 270.

Nesse dia, verificámos ter havido perda de pezo:

Coelho 307 perdeu 267 grs.
Coelho 22 perdeu 225 grs.
Coelho 470 perdeu 246 grs.
Coelho 82 perdeu 82 grs.
Resultado—Sobrevivencia de todos.

CONCLUSÃO: —

A amostra n. 1 é bem pathogenica, é toxica, mas capaz de immunizar sem perigo, quando dada a ingerir em pequenas dóses, progressivamente crescentes, contra prova infectuosa parenteral com amostra heterologa, muito pathogenica.

AMOSTRA 2, *provinda do Instituto Oswaldo Cruz, sem indicação de origem.*

Poder pathogenico:

Coelho—230 (1.450 grs)—0,1 tubo na veia. No segundo dia, pela manhã, tetraplegia. A' tarde—mórte.

Coelho—492 (1.350 grs.)—egual—Mórte na noite do 2.º para o 3.º dia. Lesões intestinaes dysentericas, par. vesical.

Coelho—392 (1.300 grs.)—0,2 tubo sob a pelle—No dia seguinte, reacção local intensa. Com dois dias, paralysia. Mórte na noite do 2.º para o 3.º dia. Lesões ints. dysentericas e paralysia vesical.

Coelho—475 (1.450 grs.) 0,5 tubo pela bocca. Mórte do 3.º para o 4.º dia. Lesões muito caracteristicas de dysenteria: edema, hemorrhagia do grosso intestino, congestão do delgado, conteúdo liquido e bolhas de ar. Paralysia vesical.

Resumo: —

0,1 — veia † média 2 dias
0,5 — bocca † média 3 dias
0,2 — pelle † média 2 dias e meio.

Poder toxico da cultura morta:

Coelho—150 (1.450 grs.) — 0,5 tubo pela bocca. Nada de anormal. Séte dias após, nova inoculação, mas de 1 tubo,. Mórte sem manifestações da syndrome do 5.º para o 6.º dia.

Toxicidade pequena, no entanto, por prudencia, ensaiámos immunizar como com a amostra 1, isto é, 4 ingestões de 2-4-6 e 8 bilhões de 2 em 2 dias, tendo o cuidado de pesar sempre os coelhos (104, 9, 358 e 474).

De um apenas, houve perda sensivel de peso (coelho 104) que succumbiu na noite do dia da inoculação de próva (0,1 Shiga 7 na veia). O coelho 9, no dia da 4.ª e ultima ingestão, amanheceu com par. m. posteriores, não recebendo a 4.ª dóse. No dia subsequente —tetraplegia. A 26 (3 dias)—diarrhéa—A 27—melhor. A' noite—mórte—Necropse fócos hemorrhagicos no ceco e par. vesical. Os 2 outros (358 e 474) venceram a prova de immunidade.

CONCLUSÃO: —

A amostra n.º 2 é pathogenica, é toxica, immuniza, sendo inferior á amostra 1, *que é menos toxica e mais immunizante, em dóses fraccionadas.*

AMOSTRA 7, *da collecção de B. dysenteriae, Shiga, do Instituto de Butantan. Proveniencia—Inst. Vital Brazil. Ind. orig.—Fujimoto (Osaka, Japão)* —Receb.—1922.

Poder pathogenico: —

Coelho—176 (1.500 grs.)—0,1 tubo — veia. Com 2 dias—par. m. ants. Na noite do 2.º para o 3.º — mórte.

Coelho—353 (1.430 grs.) egual—No dia seguinte—paralysia. Mórte na noite do 1.º para o 2.º dia—Lesões int. dys., par. vesical.

Coelho—475 (1.300 grs.)—0,2 tubo—Sub-derma — Em 24 hs. reacção local intensa. Em 2 dias—tetraplegia. Morte no 3.º. Lesões intestinaes dysentericas. Par. versical.

Coelho—277 (1.500 grs.)—0,5 tubo—*per os*. Sem symptomas, mórte do 2.º para o 3.º dia. Necropse—lesões intestinaes dysentericas e paralysia vesical.

EM RESUMO: —

0,1 na veia mata, em média em 2 dias.

0,2 sob a pelle mata, em média em 3 dias.

0,5 *per os* mata, em média em 2 dias e meio.

Com germe morto, esta mesma dóse (0,5), por via buccal, matou em prazo maior (4 dias), mas com lesões caracteristicas de intoxicação dysenterica.

Em experiencia mais delicada, com dóses fraccionadas e progressivamente crescentes, de 2 em 2 dias (2-4-8 e 15 bilhões), ainda se evidenciou a alta toxicidade desta amostra—mórte na noite da ultima ingestão.

Repetimos a experiencia, diminuindo as dóses (2-4-6 e 8 bilhões) em mais quatro coelhos (334, 406, 29 e 61). Este ultimo morreu um dia antes da próva de immunidade. A prova foi feita com a amostra

homologa, 15 dias a contar da ultima ingestão, na dóse mortal (em 2 dias) de 0,1 por via venosa.

O 334 resistiu 9 dias sem symptomas, quando se declarou tetraplegia e mórte na noite do 9.º para o 10.º dia. O 406 sobreviveu.

O 29 morreu no 10.º dia, sem manifestação da syndrome.

CONCLUSÃO: —

Esta amostra é muito pathogenica, é bem toxica, immuniza. Se não houve sobrevivencia por espaço maior de tempo, não foi por falta de immunidade (sabrevivencia de 9 dias, em confronto com o testemunha que succumbe com o cortejo classico, dentro de 2 dias). Muito provavelmente a intoxicação foi o factor da mórte. Immunidade houve.

AMOSTRA 8, *provinda do Laboratorio Parke Dawis, com a indicação de amostra* 651.

Poder pathogenico: —

O *coelho* 75 (1.270 grs.) com 0,1 de tubo na veia, em 2 dias— diarrhéa, tetraplegia, mórte. Necropse, lesões intestinaes dysentericas.

O *coelho* 244 (1.450 grs.)—com 0,2 de tubo no sub derma, em 24 hs.—edema local. No 2.º dia, pela manhã—paralysia; á tarde— mórte. Lesões intestinaes e paralysia vesical.

Coelho—244 (1.450 grs.)—0,5 tubo, *per os*, succumbe ao cabo de dois dias e meio, revelando a necropse as lesões classicas da dysenteria.

Poderes immunizante e toxico: —

Coelho—85 (1.750 grs.)—0,5 tubo (g. morto), por via buccal, no 3.º dia, pela manhã apresentou paralysia dos membros posteriores, vindo a succumbir á tarde. Lesões intestinaes dysentericas, enorme distensão vesical.

Fraccionando as dóses, immunizámos um primeiro coelho (125) com ingestões de 2, 4, 8 e 15 bilhões. Houve mesmo augmento de peso (1.650 grs. no inicio da vaccinação, 1.750 no término). Próva de immunidade, com a amostra 7 (heterologa), por via venosa. Sobrevivencia.

Não obstante este animal haver supportado bem estas dóses que foram fataes com as amostras 1 e 7, na serie seguinte, para o estudo comparativo do poder immunizante, abaixámo-las para 2-4-6 e 8 bilhões. Immunizamos, deste módo, os coelhos:

340 (1.925 grs), 490 (1.130 grs.), 34 (1.640 grs.) e 383 (1.555 grs.). O primeiro succumbe, sem symptomas, na noite da ultima inoculação. A' necropse—nada mais que poucos e pequenos fócos hemorrhagicos no ceco. Os outros supportam bem a próva da immunidade, identica á do 125.

Assim, em resumo, esta amostra revelou-se bem pathogenica, não muito toxica e bem immunizante, mesmo contra amostra heterologa, bem pathogenica, por via parenterica.

Embóra já conhecida a acção do b. dysenterico, Shiga, amostra 7, na dóse e via empregadas nas próvas de immunidade, fizemos mais um testemunha:

Coelho—10 (1.460 grs.)—0,1 de tubo, via venosa. No dia seguinte—tetraplegia e mórte. Edema do ceco, paralysia vesical.

Pela severidade da próva, deduz-se a solidez da immunidade que a vaccinação *per os* confere.

CONCLUSÕES: —

1.—Quanto ao *poder pathogenico*, seja a veia, o sub-derma ou a bocca a via empregada, não houve differença de nota de uma para outra amostra, em se levando em conta: dóses, symptomas, lesões e prazo lethal.

2.—Quanto á *toxicidade* das culturas, em agar, mortas pelo calôr, dadas por via oral, as amostras 1 e 8 mostraram-se mais inoffensivas, mais propicias a uma vaccinação sem perigo. A 7—a mais toxica.

3.—Quanto ao *poder immunogenico*, em primeiro plano, apparecem as amostras 1 e 8, capazes de vaccinar contra amostra heterologa, de grande actividade, em próva infectuosa, por via venosa. Immunidade segura e solida. A 7 immuniza bem. A falta de solidez observada, como já dissémos, possivel e razoavelmente, córre por conta da sua alta toxicidade.

4.—Dest'arte, dispõem-se em ordem de superioridade para a vaccinação segura e sem perigo, por via buccal, as amostra 1 e 8, 7 e 2.

Estas conclusões, tiradas do estudo do protocóllo das experiencias, levam a tecer algumas considerações.

Se no animal, póde verificar-se differença de uma amostra de germe para outra, quanto aos poderes vaccinante e toxico, é de suppôr que as mesmas differenças se verifiquem para o homem, e dahi a necessidade de estudo das amostras a entrar no preparo da vaccina, destinada á prophylaxia especifica da dysenteria, por via oral.

De interesse ainda ha a considerar a possibilidade do divorcio entre toxicidade e poder immunogenico.

Finalmente, estas experiencias vieram resaltar o valôr do processo vaccinante e a possibilidade immediata, com base experimental, de passar-se, entre nós, á applicação ao homem, do unico processo exequivel de protegê-lo da infecção dysenterica, pela immunidade activa.

IMMUNISATION "PER OS"

ETUDE SUR LES DIFFÉRENCES DE POUVOIR PATHOGÉNIQUE, TOXIQUE ET IMMUNISANT DE 4 ÉCHANTILLONS DE B. DE SHIGA PAR LES DRS. PAULO MARREY ET EDUARDO VAZ.

SOMMAIRE

De l'étude de 4 échantillons de divers provenances de B. de Shiga, au triple point de vue de leur pouvoir pathogènique (germe vivant), toxique (germe mort) et immunisant (germe mort) les Auteurs tirent les conclusions suivantes:

1.° Quelque soit la voie employée, endoveineuse, sous-dermique ou oral, il n'y êut pas de différence notable de *pouvoir pathogènique*.

2.° *La toxicité* des cultures en agar, tuées par la chaleur et administrées par voie oral est très variable, certaines étant plus inoffensives, d'autres plus toxiques, plus propres a être utilisées sans danger dans la vaccination.

3.° *Le pouvoir immunisant* est également variable; 2 échantillons se révélèrent hautement immunisants capables de vacciner contre l'échantillon hetérologue de grande activité dans l'épreuve d'infection par voie veineuse; un autre échantillon immunise mais l'immunité n'est pas solide, probablement par suite de la haute toxicité de cet échantillon.

4.° Si pour les animaux on observe de telles variations des pouvoirs vaccinants et toxiques, des variations analogues doivent exister pour l'homme d'où la nécessité d'etudier les échantillons destinés à la préparation de vaccine anti-dysentérique par voie buccale.

5.° Il n'y a pas de relation absolue entre le toxicité et le pouvoir immunisant, un échantillon peu toxique pouvant être doué d'une action vaccinante élevée et vice versa.

6.° De ces expériences ressort la valeur de ce procédé de vaccination et la possibilité de son application immédiate à l'homme dans notre milieu.

SOBRE O PREPARO DA VACCINA ANTI-DYSENTERICA "PER OS"

(*Primeira memoria*)

POR

EDUARDO VAZ

(Assistente do Butantan)

(Com a estampa 10)

(Trabalho apresentado á 4.ª Conferencia Sul Americana de Hygiene e Microbiologia, reunida em Buenos Aires, em Julho do corrente anno).

Rebuscando na literatura o que ha sobre vaccinação, "per os", do homem contra a dysenteria, tem-se muito longe, com cerca de vinte annos, a noticia do emprego (1) no Japão, em asylos, onde o mal era endemico.

Não obstante o bom resultado, só se vêm encontrar trabalhos de laboratorio e de hygienistas, no mesmo sentido de proteger o homem, agora, depois que os factos foram aproveitados para a construcção da theoria moderna de immunidade local.

Enquanto não foi architectada a explicação dos bons resultados, o processo vaccinante não mereceu as attenções a que tinha direito. No momento elle se vae impondo, apezar mesmo da explicação nova, que, pela amplitude das idéas encerradas, já vae soffrendo restricções.

Os trabalhos recentes (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), apparecidos sob influencia do novo impulso theorico, confirmam o valor do methodo, primeiro empregado por *Shiga*, em dysenteria. Sobre o preparo da vaccina, trabalho já de minucia, no laboratorio pouco se tem feito. Alguns tem empregado o germe secco, em comprimidos, seguindo os conselhos de *Besredka*, outros vaccina liquida, ou o proprio caldo da cultura, ou germes suspensos em agua.

Sem base, resolveu-se que para a vaccinação bastasse tanto de germe secco pesado, ou quanto de vaccina liquida, com bilhões por centimetro cubico.

Éra empirico, mas éra preciso começar. Com o passar do tempo, sequencia logica do inquerito das primeiras applicações, surgiria a necessidade de augmento por insufficientes, de reducção dada a toxicidade, das dóses empregadas. E, quem sabe, o aperfeiçoamento da technica de preparo, pelo apuro da substancia vaccinante, pela diminuição da toxicidade.

Ahi o motivo destes ensaios tendentes a conhecer o valor vaccinante e a propriedade toxica de diversas vaccinas.

O coelho, animal mais sensivel que o homem, foi escolhido para o estudo. Com segurança, poder-se-ia dahi passar á pratica, na prophylaxia especifica.

Dos nossos trabalhos anteriores (11, 12 e 13), em que manejamos com culturas em agar, suspensas em soluto physiologico, ficou evidenciada a sensibilidade dos animaes á ingestão de cultura morta, capaz de provocar as manifestações da syndrome dysenterica, lesões caracteristicas e morte.

Agora, relatamos os ensaios com vaccinas preparadas em meio de cultura liquido.

PRIMEIRA SERIE DE EXPERIENCIAS

Vaccina I—Cultura de B. de Shiga [amostra 7, (*) a mais toxigenica da collecção (15)], de 21 dias, a 37°, em caldo alcalino, aquecida a 60°, por uma hora, conservada em geladeira.

Immunização — Três coelhos—439 (1080 grs.), 491 (1140 grs.) e 363 (1050 grs.)—ingerem 1 c. c. Seis dias após—a 2.ª dóse—2 c. c. Intervallando de 6 dias, as outras dóses—3.ª—4 c. c., 4.ª—8 c. c., 5.ª—16 c. c. O espaço grande entre as ingestões encontra justificativa no interesse da observação dos possiveis effeitos toxicos. Apezar das dóses altas, nenhuma manifestação, nem mesmo perda sensivel de peso.

Próva de immunidade—Quando decorridos 15 dias da ultima ingestão, foi feita a próva, com germe vivo, por via sub-cutanea, com a amostra homologa, de mistura com 3 outras heterologas (500 milhões de cada).

Resultado—Coelho 439—Três dias após, diarrhéa e paralysia dos membros posteriores. Mórte á tarde. Necropse—edema consideravel do intestino grosso, com muitos fócos hemorrhagicos, principalmente no ceco. A photographia na estampa 10 dá idéa das lesões.

Coelhos 491 *e* 363—Sobrevivencia. Com 10 dias a observação foi interrompida. Estavam pesando mais que no inicio da experiencia, o 491—1220 grs. e o 363—1085 grs. *Coelho testemunha* (1510 grs.), com 2 dias—tetraplegia. A' tarde, mórte.

Necropse—Lesões intestinaes dysentericas, paralysia vesical.

Conclusão:—Quando ministrada pela bocca, a cultura de 21 *dias, em caldo, mórta pelo calôr, não é toxica, sendo capaz de vaccinar solida (coelhos* 491 *e* 363), *mas não seguramente (coelho* 439) *contra a próva infectuosa, por via parenterica, com a amostra homologa, bem como com heterologas (próva muito severa, v. coelho testemunha).*

SEGUNDA SERIE DE EXPERIENCIAS

Afim de indagar do papel immunizante do corpo microbiano e do caldo toxico, nas experiencias da primeira série, centrifugámos 250 c. c. da vaccina 1.

(*) Germe enviado por Fukuhara, de Ozaka, no Japão, com a indicação de Shiga Fujimoto, utilizado no preparo de toxina (14).

Assim preparamos a .....

Vaccina II—O liquido sobrenadante, bem decantado e depois filtrado em papel fino.

Immunização—Coelho 226 (1080 grs.) e 100 (1820 grs.), nas mesmas condições de numero, dóse e espaço que as experiencias da primeira série.

Próva de immunidade—Identica.

Resultado—Sobrevivencia sem symptomas.

Conclusão:—*Quando ministrados pela bocca, os productos do b. dysenterico, em caldo de* 21 *dias, são desprovidos de toxicidade, e capazes de, por si sós, immunizar contra a próva infectuosa, segura e solidamente.*

TERCEIRA SÉRIE DE EXPERIENCIAS

Se se conseguiu vaccinar com o caldo, isento de germe, seria interessante saber se o corpo microbiano, que ficou depositado pela centrifugação, teria o mesmo poder. Fizemos a.....

Vaccina III—Deposito, suspenso em 250 c. c. de soluto physiologico esteril (volume primitivo do caldo).

Immunização—Três coelhos—134 (1050 grs.), 283 (1170 grs.) e 337 (1810 grs.)

Condições identicas ás das séries anteriores.

Próva de immunidade—Identica.

Resultado—Deccorridos 3 dias, o 283 e o 134, paralyticos dos membros posteriores. Na tarde do mesmo dia, tetraplegia do 283: paresia dos anteriores e paralysia dos posteriores do 134 e paresia dos posteriores do 337. No dia subsequente, o 134 com diarrhéa e tetraplegia. A' noite mórte do 283 e 134. No 5.º dia, o 337 amanhece diarrheico, no entanto com a paresia menos accentuada, estado que persiste até o 8.º dia. Ao cabo de 10 dias, ao interromper a observação, estado bom.

Conclusão:—*O poder immunizante, "per os", do corpo microbiano, da cultura de* 21 *dias, em caldo, é inferior ao desse caldo, onde se diffundiram substancias vaccinantes sahidas do germe. Inferior, quanto á solidez da immunidade conferida* (*coelho* 377), *quanto á segurança* (*coelho* 134 *e* 283).

QUARTA SÉRIE DE EXPERIENCIAS

Ficou visto, pelos resultados obtidos, que o aquecimento da cultura foi desfavoravel aos corpos microbianos, e talvez dahi um enriquecimento maior do caldo em substancias vaccinantes. Nesta quarta série, quizemos por em claro a questão. Experimentamos esteri-

lizar a cultura de 21 dias, com toluol, como de habito procedemos no preparo da toxina dysenterica. Do modo seguinte obtivemos a

Vaccina IV—Caldo toxico de 21 dias, esterilizado com toluol, centrifugado, decantado, filtrado em papel, conservado em geladeira.

Immunização—Três coelhos, 456 (1050 grs.), 137 (1500 grs.) e 223 (1250 grs.) ingerem em 3 dóses—19 c. c. (nas exps. anteriores as condições foram mais favoraveis)—31 c. c. em 5 dóses).

Próva de immunidade—Identica.

Resultado—Sobrevivencia sem symptomas. Observação interrompida após 10 dias.

Conclusão:—*Esta vaccina é dotada de alto poder immunizante, pois, em dóse menor que as outras, conferiu immunidade solida e segura.*

QUINTA SÉRIE DE EXPERIENCIAS

Este optimo resultado teria sido obtido em detrimento da propriedade vaccinante do corpo microbiano? Teria o toluol, como se suppôz para o calor, contribuido por acção sobre o germe, para maior diffusão no caldo da substancia immunizante?

Para responder preparamos a.....

Vaccina V—Deposito da centrifugação da *vaccina IV*, suspenso no mesmo volume de solução physiologica.

Immunização—Três coelhos, 37 (1500 grs.), 113 (1100 grs.), 301 (1150 grs.) ingerem em 5 dóses—35 c. c. de antigenio (4 c. c. mais que nas séries I, II e III). Na 4.ª inoculação, o 301 succumbiu a accidente.

Próva de immunidade—Identica. Nesse dia, a julgar pelo peso, o estado dos 2 animaes éra bom—o 37, 1440 grs. e o 113, 1225 grs.

Resultado—Sobrevivencia, sem manifestações da syndrome.

Cônclusão:—*O poder immunizante, "per os", do corpo microbiano, da cultura de 21 dias em caldo, mórta pelo toluol, é superior ao do corpo microbiano da cultura aquecida (vaccina III). A conservação da propriedade vaccinante do corpo microbiano, toluado, não desmerece na qualidade immunizante do caldo, isento de germe. O toluol conserva bem as propriedades immunogenicas das duas fracções. O valor do caldo-vaccina não depende da desvalorização do corpo microbiano-vaccina.*

Considerações:—E' certo que, nesta ultima série com corpo microbiano, se favoreceu um pouco a vaccinação, augmentando de 4 c. c. o total das dóses (35 em logar de 31). Não é de suppôr que, o que tivesse influido essencialmente na diversidade dos resultados obtidos com a vaccina aquecida e toluada, fossem esses 4 c. c.

Illação—Na esphera da immunidade, com muita vantagem se poderá utilizar, como vaccina, um caldo de 21 dias, morto pelo toluol, pouco importando o numero de germes ahi existentes.

SEXTA SÉRIE DE EXPERIENCIAS

Da comparação dos resultados destas séries, vae-se concluir pela superioridade do liquido sobrenadante, isento de germe, mesmo sobre a vaccina inteira—o caldo de cultivo. Esta superioridade já tinha sido posta em evidencia, quanto á capacidade de produzir anticorpos, nos trabalhos de *Ferry* e *Fischer*, (16, 17) em que elles estudam as propriedades antigenicas de vaccinas bacterianas empregadas por via parenterica, preparadas por methodos diversos. Da comparação entre o caldo de cultura (1000 milhões de germes por c. c.), e germes (1000 milhões por c. c.), crescidos em agar, suspensos em soluto physiologico, o caldo ficou em plano superior. Tambem num plano mais elevado ficaram os liquidos sobrenadantes á centrifugação, relativamente aos depositos, suspensos em soluto physiologico. Em todas as séries de experiencias realizadas, o corpo microbiano se mostrou inferior ao caldo em que cresceu ou á agua em que foi lavado.

A agua de lavagem de pneumococco, crescido em agar, produziu uma immunidade activa tal, no camondongo branco, que o protegeu de um milhão de dóses mortaes.

A passagem em vela diminue de muito as propriedades antigenicas. Neste ponto, encontramos quem divergisse.

Foram os trabalhos de *Avery* e *Dochez*, (18), de 1917, sobre a substancia soluvel, com propriedades antigenicas, extrahida por filtração dos meios liquidos de cultura de pneumococco. Substancia que *Perlzweig* e *Keeper* (19) purificaram, separando-a, por meio de ultra-filtração atravéz de collodio sob pressão, da parte desprovida de acção antigenica.

Pois bem, em dysenteria, procurámos conhecer a influencia da passagem em véla, com a seguinte série de experiencias.

Vaccina VI—Cultura de 21 dias, em caldo, toluolada, filtrada em papel e em vela, conservada sob toluol, a temperatura baixa.

Immunização—de 3 coelhos, (14, com 1320 grs., 15, com 1200 grs., 932, com 1800 grs.), como na quarta série—19 c. c. em 3 ingestões.

Próva de immunidade—Identica.

Resultado—Depois da injecção, mórte do 15. Ausencia de lesões. O 14 e o 932, bons. Observação interrompida, após 10 dias.

Conclusão:—Póde concluir-se que o caldo, completamente isento de germe, por filtração em vela, conserva a propriedade de immunizar contra o germe vivo.

Com esta mesma vaccina, fizemos a .....

Immunização—de 3 coelhos (50, com 1240 grs., 242, com 1250 grs., 210, com 1300 grs.), em 4 dóses, de 2 em 2 dias, do modo seguinte: 1.ª—2 c. c.; 2.ª—4 c. c.; 3.ª—6 c. c.; 4.ª—8 c. c.

A julgar pela ausencia de manifestações dysentericas, e pelo peso, os animaes nada soffreram com a ingestão de tão altas dóses approximadas de toxina (0,05 c. c. matam por via venosa).

Próva de immunidade—identica. O estado dos animaes era bom. Comparação dos pesos, no decurso da experiencia.

Inicio da immunização	Fim da immunização	Dia da prova
Coelho 50 — 1.240 grs.	1.220 grs.	1.370 grs.
» 242 — 1.250 »	1.270 »	1.350 »
» 210 — 1.300 »	1.330 »	1.500 »

Resultado—Cinco dias após a próva, o 210 com ligeira paresia do membro posterior esquerdo. Aos 10 dias, bom. Os outros nada apresentaram. No decimo dia a observação foi interrompida, tirando-se a ....

Conclusão:—A passagem em vela não tira ao caldo-vaccina a propriedade immunizante. Em rigor, levando em conta a ligeira paresia do m. post. esq. do 210, *póde dizer-se que ha uma pequena diminuição no valor da vaccina.*

SETIMA SÉRIE DE EXPERIENCIAS

Na esphera da immunidade já se tinha obtido muito—vaccinar, segura e solidamente, animal muito sensivel, sem nenhum symptoma de intoxicação. Mas, para passar ao homem, era preciso afastar o inconveniente do uso do toluol, como esterilizante, em vista do cheiro e sabor desagradaveis, e difficuldades de retirá-lo depois.

Conhecida a acção attenuadora da formalina sobre a toxina dysenterica, sem prejuizo das suas propriedades immunogenicas (20, 21, 22, 23, 24, 25), resolvemos utilizá-la como esterilizante, na proporção de 0,25 °/°. Deste modo, tivemos a

Vaccina VII—Caldo de 21 dias, formolizado a 0,25 °/°.

Immunização—Visto a ingestão de uma toxina activa, como a da série anterior, não ser prejudicial ao coelho, quando dada de 2 em 2 dias, em dóses progressivamente crescentes e considerando ainda a acção attenuadora do formol, fizemos esta série, com os mesmos intervallos e dóses das ultimas experiencias.

Tomamos 10 coelhos. Um delles, o 34, morre depois da 2.ª ingestão. A' necropse—ausencia de lesões.

Um dia após a 3.ª ingestão, morre o 265, sem lesões de natureza dysenterica.

Próva de immunidade—Identica. Sempre 15 dias após a ultima ingestão.

Resultado—Sobrevivencia de todos.

Peso dos animaes no decurso da experiencia:

	IMMUNIZAÇÃO		PROVA	
COELHO	INICIO	FIM	INICIO	FIM
116	1.590 grs.	1.540 grs.	1.520 grs.	1.600 grs.
115	1.580 »	1.585 »	1.450 »	1.360 »
129	1.620 »	1.560 »	1.560 »	1.550 »
222	1.420 »	1.500 »	1.370 »	1.470 »
51	1.700 »	1.560 »	1.485 »	1.500 »
142	1.800 »	1.790 »	1.640 »	1.750 »
208	1.160 »	1.060 »	1.090 »	1.000 »
153	1.470 »	1.595 »	1.630 »	1.800 »

Conclusão:—O formol conserva a propriedade vaccinante do caldo de 21 dias. E' superior ao calor, pela facilidade de esterilização é superior ao toluol, por não modificar as propriedades organolepticas da vaccina.

Experiencias em curso:

Resolvido satisfactoriamente este ponto, procurámos diminuir o tempo de permanencia de estufa, para 48 hs.. Talvez, o resultado fosse o mesmo, bom, baseado no que *Ferry* e *Fisher* (17) obtiveram com pneumococco: superioridade da cultura de 24 hs., sobre as mais recentes e sobre as mais velhas (exps. com culturas de 5 dias). Assim, lhes parece que se não trate de uma verdadeira secreção do germe, exotoxina, que tenderia a melhorar com o tempo maior, nem productos diffusiveis no caldo pelo esphacelamento dos germes, o que occorreria com bem mais razão nas culturas velhas.

Sobre a conservação do poder immunizante dos filtrados de cultura de 1-4 dias, formolizados, quando injectados debaixo da pelle, *Kraus* e *Imai* (24) tinham já observação favoravel.

Do ponto de vista pratico, seria valiosa a demonstração de que o cultivo em prazo curto não desmerecia no poder immunizante da vaccina dada *per os*.

Assim, temos em curso experiencias nesse sentido.

Se ainda se poderá obter mais, na pratica, quanto ao preparo, o que é certo é que, com os resultados a que chegamos, muito já se ganhou. Nem ha duvida que é mais facil cultivar o germe aos litros, em caldo, esterilizar pela simples addicção de formol, e logo ter promptas grandes partidas de vaccina, sem preoccupação de tantos ou quantos centigrammos ou bilhões de germes, do que o cultivo em garrafas de gelosa, suspensões, seccamento, pesagens, comprimidos.

Se no dominio da pratica, ainda podemos desejar; no que respeita á immunidade, o laboratorio nos deu 100 °/°.

Deste modo, em que se póde avantajar o germe secco?.

Basta, além do mais, considerar que, mesmo sem o corpo microbiano, o caldo de sua cultura vaccina solidamente contra a infecção. Este facto está sobejamente comprovado.

Dumas e *Combiesco* (26) já tinham obtido, por via buccal, algum resultado (50 °/°), quanto á immunização com toxina dysenterica, em coelhos. *Kabeshima* (27) tambem traz sua contribuição. Assim, *Lesbre* (28, 29) e tantos outros.

Se se quizesse estender mais em considerações sobre o valor immunizante dos filtrados, bastaria lembrar os pensos microbianos, as vaccinações com anatoxinas, e o que, no momento, se passa quanto ás fórmas filtraveis dos microbios.

Queremos frisar que não ha uma relação directa entre poder antigenico de uma vaccina e o numero de corpos microbianos que ella encerre.

CONCLUSÕES:

1) Os caldo-vaccinas são menos toxicos, por ingestão, que as vaccinas preparadas com germes crescidos em agar, e suspensos em soluto physiologico.

2) O liquido sobrenadante á centrifugação do caldo-vaccina, em que o processo de esterilizar foi o calor, mostrou-se melhor immunizante que o deposito de germes.

3) O poder immunizante, "per os", do corpo microbiano, da cultura de 21 dias em caldo, mórta pelo toluol, é superior ao do corpo microbiano da cultura aquecida (vaccina III). A conservação da propriedade vaccinante do corpo microbiano, toluado, não desmerece na qualidade immunizante do caldo, isento de germe. O toluol conserva bem as propriedades immunogenicas das duas fracções. O valor do caldo-vaccina não depende da desvalorização do corpo microbiano-vaccina.

4) Parece que a passagem em vela diminue de pouco a propriedade immonogenica dos caldo-vaccinas.

5) A cultura em caldo, de 21 dias, é immunizante, qualquer que seja o processo de esterilizar (calor, toluol, formol).

6) A formalina, a 0,25 °/° esteriliza bem e conserva as propriedades immunizantes dos caldo-vaccinas.

7) Considerando: a) a inocuidade para coelho, animal mais sensivel que o homem; b) a efficacia, provada por inoculação de diversas amostras, homologa e heterologas, de germe vivo, por via subdermica; c) a facilidade de preparo em grande escala... concluimos, por ultimo, *que deve e póde ser empregada no homem, a vaccina preparada com caldo de cultura de b. de Shiga, de* 21 *dias, a* 37°, *mórta pela formalina, na proporção de* 0,25 °/°.

S. Paulo, 21-5-26.

RESUMO

O autor em trabalhos anteriores sobre immunização de coelhos, por via buccal, contra o bacillo de Shiga, tem frisado a necessidade de encontrar um meio de diminuir a toxicidade da vaccina de germes mortos, para com bastante segurança applicá-la ao homem.

Neste trabalho, modificou o preparo da vaccina, sempre com esse intuito. Conseguido o desejado, orientou as suas experiencias de modo a facilitar o preparo em grande escala, sem prejuizo das propriedades immunizantes.

Pôde verificar, em summa, que o caldo de 21 dias de B. de Shiga, então formolizado a 0,25 °/°, na dóse de 20 c. c., immuniza o coelho, sem perigo, segura e solidamente, na proporção de 100 °/°, contra próva infectuosa, parenterica, com amostras homologa e heterologas.

Assim ,do ponto de vista pratico, salienta que é mais facil cultivar o germe em caldo, aos litros, esterilizar pela simples addicção de formol, e ter prompta a vaccina, sem preoccupação de tantos ou quantos centigrammos ou bilhões de germes, do que o cultivo em garrafas de agar, suspensões, seccamento, pesagem, comprimidos.

TRABALHOS CITADOS

1 — *Shiga* (*K*)—"Ueber die aktive Immunisierung *per os*". Saikingaku, 1908, N.° 138. Apud Cent. f. Bak., 1909, I Abt., Bd. 42, N.° 1/3, S. 419.

2 — *Nicolle* (*C*)-*et Conseil*—"Vaccination preventive par voie digestive chez l'homme". Compt. Rend. Ac. Sc., 1922, t. 174, n. 11, p. 724.

3 — *Anglade*—"Note concernant un essai de vaccination locale de l'intestin contre la dysenterie, d'après le procedé de Besredka"—Compt. Rend. Soc. Biol., 1924, T. 90, N. 6, p. 395.

4 — *Antonowski* (*A*)—"Essai de vaccination antidysénterique *per os* d'après le procedé de Besredka". Comp. Rend. Soc. Biol. T. 90, N. 8, p. 564.

5 — *Gauthier* (*A*)—"Vaccination et vaccinothérapie par voie digestive contre la dysenterie bacillaire". Bul. Ac. Med., 1924, T. XCI, N. 3, p. 72.

6 — *Troude* (*M*)—"Etude épidemiologique sur la dysenterie á l'armée du rhin"—Revue d'Hygiene, 1925, T. 47, N. 6, p. 490.

7 — *Zlatagoroff*—"Acerca de uma vaccina preventiva de la disenteria"—Revue franco-russe de Medicine et Biol., 1925, N. 3. Apud Rev. Sud-Amer., 1926, A. IX, N.°1.

8 — *Pascal (C)*—"Vaccination antidysenterique par voie buccale"—Compt. Rend. Soc. Biol., 1924, T. XCI, p. 874.

9 — *Costa (S)—Boyer (L) et Deisne (F. Van)*—"Vacunation disenterica (b. de Flexner), collectiva, por via buccal.—Soc. Biol. Marseille, Maio 26-1925. Apud Rev. Sud-Amer. 1925, A. VIII, N.° 9, p. 647.

10 — *Hoof (L. van)*—"Au sujet d'une epidemie de dysenterie bacillaire dans le Mayombe. (Congo belga). Bul. de la Soc. Path. Exotique, 1925, T. XVIII, N.° 7, p. 532.

11 — *Vaz (E)*—"Dysenteria e immunização anti-dysenterica por via buccal". Arch. Inst. Vital Brazil, 1924, T. 2, Fasc. 2, p. 191.

12 — *Vaz (E)*—"Immunidade local"—Dissertação inaugural. Fac. Med. Rio de Janeiro, 1924.

13 — *Vaz (E)*—"Immunização *per os* contra o B. de Shiga. Contribuição ao estudo da natureza da immunidade. "Mem. Inst. But. 1925, T. II, fasc. Unico, p. 99.

14 — *Fukuhara (Y)*—"A new method of testing antitoxic dysentery Serum" The J. of Immunology, 1919, N.° V, p. 299.

15 — *Marrey (P)* e *Vaz (E)*—"Immunização *per os*. Estudo sobre as differenças de poder pathogenico, toxico e immunizante de 4 amostras de B. de Shiga. Mem. do Inst. But. 1926, T. III. fasc. unico, p. 77.

16 — *Ferry (N. S.)-and Fisher (L. W.)*—"Studies of the immunizing properties of Bacterial antigens prepared after various methods. I. "Brit. Journ. Exp. Path., 1924, vol. V, N.° 3, p. 185.

17 — *Ferry (N. S.) and Fisher (L. W.)*—"Studies on the immunizing properties of bacterial antigens prepared after various methods.—"Brit. Journ. of Exp. Path., 1924, t. V., p. 205.

18 — *Dochez (A. R.) and Avery (O. T.)*—"The elaboration of Specific soluble substance by pneumococcus during growth". J. Exp. Med., 1917, V. 26, n.° 4, p. 477.

19 — *Pelzweig and Keeper*—"The immunizing antigenen of the pneumococcus. III. The purification of the water—soluble antigenen". J. of Exp. Med., 1925, XLII, N.° 6, p. 747.

20 — *Dumas (J) Ramon (G) et Said Bilal*—"Les propriétes immunisantes de l'anatoxine dysenterique"—Acad. des sciences, 27. VII. 25—Prèsse Med., 1925, n.° 73, p. 1224.

21 — *Durand (P.)*—"Action du formol sur quelques microbes toxiques"—Compt. Rend. Soc. Biol., 1925, t. XCII, n.° 3, p. 159.

22 — *Assis (A. de)*—"Da acção do formol sobre a toxina dysenterica". Arch. Inst. Vital Brazil, 1925, t. III, fasc. I, p. 3.

23 — *Lesbre (Ph.) et Verdeau (A.)*—"Quelques particularités de l'anatoxine dysenterique—Compt. Rend. Soc. Biol., 1925, t. 92, n.° 3, p. 165.

24 — *Kraus (R.) et Imai (K.)*—"De l'immunisation active au moyen de cultures filtrées atoxiques" Klien. Woch., 1925, n.° 14. Bull. Inst. Past., 1925, XXIII, n.° 18, p. 815.

25 — *Dumas, Ramon et Said Bilal*—"Anatoxine dysentérique"—An. Inst. Past., 1926, n.° 2, p. 134

26 — *Dumas (J) et Combiesco (D)*—"L'intoxication dysentérique du lapin et l'intoxication cholerique du cobaye par ingestion de toxines dysenteriques et cholérique solubles". Compt. Rend. Ac. Sc., 1922, t. 175, p. 652. Apud Bul. Inst. Past., 1923, XXI, 4, p. 159.

27 — *Kabeshima (T)*—"Recherches expérimentales sur la vaccination préventive contre le bacille dysenterique de Shiga.—C. R. Ac. Sciences, 1919, 169, p. 1061. Apud. Bul. Inst. Past., 1920, t. 28, n.° 2, p. 76.

28 — *Lesbre (Ph.)*—"Immunisation expérimentale par anatoxines contre le Bacille de Shiga".

29 — *Lesbre (Ph.)*—"Bactériophage et anatoxine dans la vaccination antidysentérique par voie buccale"—Comp. Rend. Soc. Biol., 1925, 93, p. p. 612 et 614.



Coelho 439

SUR LA PRÉPARATION DE LA VACCINE ANTI-DYSENTÉRIQUE "PER OS"

PAR LE

DR. EDUARDO VAZ.

(Planche 10)

SOMMAIRE

1.° Dans des travaux antérieurs sur l'immunisation de lapins par voie buccale contre le B. de Shiga. l'Auteur a montré la nécessité d'arriver à diminuer la toxicité du germe mort afin de pouvoir appliquer cette méthode chez l'homme.

2.° Dans le travail actuel, la préparation de la vaccine a été modifiée dans ce sens; ce résultat ayant été obtenu, l'Auteur s'est eforcé d'en faciliter la préparation en grande échelle sans préjudice des proprietés immunisantes.

3.° Em résumé il a verifié que le bouillon de culture de B. Shiga de 21 jours, formolisé à 0,25 °/°, à la dose de 20 c. c., immunise le lapin sans danger, solidement, dans la proportion de 100 °/° contre l'épreuve d'infection par voie parentale avec des échantillon homologues ou hétérologues.

4.° Au point de vue pratique il est beaucoup plus facile de cultiver le germe en bouillon et de stériliser par simple addicion de formol que de le cultiver em carrafes d'agar, faire des suspension, sécher, peser et préparer les comprimés; on obtient ainsi la vaccine par litres sans avoir à se préoccuper du nombre de centigrammes ou de billions de germes.

ANATOXINA DIPHTERICA E SEU VALOR PRATICO

PREPARO, PODER ANTIGENICO, EMPREGO NA PRODUCÇÃO DE ANTITOXINA E NA PROPHYLAXIA DA DIPHTERIA,

PELO

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO

(Assistente do Instituto)

INTRODUCÇÃO

Pode-se dizer hoje que a medicina se encontra scientificamente apparelhada para a luta contra a diphteria; a clinica no que diz respeito ao tratamento e a hygiene, quanto a sua prophylaxia.

E a solução deste problema que visa principalmente a protecção da humanidade no que ella possue de mais esperançoso, a sua infancia, é obra incontestavel sahida do silencio e da calma dos laboratorios.

Desde que Bretonneau, em 1821, affirmou a *especificidade* da diphteria e mostrou a identidade de natureza da angina e do croup; que seu discipulo Trousseau sustentou a existencia de um *principio morbido unico*,, um *virus especial*, e depois, principalmente, da descoberta do agente causador da infecção, por Klebs, em 1883 e da sua cultura obtida por Loeffler no anno seguinte, o estudo deste flagello da infancia entrou verdadeiramente no terreno scientifico.

Seguindo os trabalhos de Loeffler, apparecem os de Roux e Yersin, com a descoberta da toxina diphterica; os de Behring e Kitasato, que evidenciaram as propriedades anti-toxicas dos sôros dos animaes immunisados e finalmente, a sensacional communicação de Roux, feita 10 annos depois da descoberta de Loeffler, em Budapest, sobre o sôro anti-diphterico.

Com o decorrer dos annos, o preparo do sôro anti-diphterico foi se aperfeiçoando e hoje, graças principalmente aos trabalhos americanos, se consegue o sôro concentrado, purificado, constituido quasi que exclusivamente pela porção (pseudo-globulina) que encerra a antitoxina especifica, cujo valor é medido com rigor, orientando seu emprego e cuja efficacia se acha perfeitamente demonstrada.

Sem tratar dos outros meios de prevenção á diphteria, tambem de valor comprovado, depois dos trabalhos de G. Ramon, sobre a anatoxina diphterica, suas propriedades e emprego, o problema da pro-

philaxia desta infecção parece ter tambem attingido á sua solução pratica e a hygiene com uma nova e poderosa arma de combate.

O trabalho que segue e que dividimos em 5 partes, representa o resultado de estudos experimentaes que fizemos com a anatoxina diphterica, da sua applicação na producção do sôro anti-diphterico e do seu emprego na prophylaxia desta infecção.

I Preparo — Influencia da composição do meio de cultura para producção de toxina, na transformação desta em anatoxina, pela addição de formol.

Juntando á toxina diphterica uma pequena quantidade de formalina com o fim de preserval-a durante as manipulações para a dosagem da antitoxina por meio da floculação, G. Ramon verificou que esta não era perturbada. Augmentando a proproção de formalina a 3 ou 4 c.c. por 1.000 e deixando na estufa durante 30 dias, constatou que o poder floculante continuava intacto e que todo o poder toxico da toxina havia desapparecido, persistindo suas propriedades immunisantes.

A este producto capaz de "flocular em presença da antitoxina como a toxina de que provem, dotado de perfeita inocuidade para os animaes, que póde produzir uma immunidade solida e uma abundante formacão de anti-toxina", Ramon denominou *anatoxina*. (').

Nas suas numerosas publicações sobre a anatoxina diphterica, com a qual vem obtendo tão animadores resultados, Ramon não nos dá com detalhes a technica do seu preparo. Apenas se sabe que emprega toxinas preparadas com caldo Martin e addiciona formalina na proporção de 3,5 por 1.000 deixando a mistura na estufa a 37.°, 38.° durante cerca de 30 dias.

A falta de ennumeração de todos os detalhes de technica, póde, perfeitamente, explicar resultados diversos obtidos por outros experimentadores no estudo da anatoxina e de suas propriedades (floculação, poder antigenico, etc.).

Em muitos institutos se emprega outros meios, além do caldo Martin, para o preparo da toxina diphterica.

Como já haviamos verificado para os toxoides (anatoxina) tetanicos (") a influencia que apresenta a composição do meio de cultura na sua formação pela addicção de formalina á toxina obtida, resolvemos, preliminarmente, fazer identica verificação quanto a transformação da toxina diphterica em anatoxina, quando obtida de meios de cultura de composição diversa.

Lançamos mão de toxinas de actividades (D. M. M. para cobayas de 250 grs.) mais ou menos iguaes e oriundas de caldo não fermentado e de caldo fermentado pelo bacillo coli.

Juntamos formalina (formol a 40 °/°) em differentes proporções e deixamos as misturas na estufa a 37.°, verificando sua actividade para a cobaya de tempos em tempos.

Nos protocollos de experiencia que seguem, mostraremos os resultados obtidos com a toxina preparada com caldo não fermentado.

(') Empregamos no decorrer deste trabalho o termo anatoxina, reconhecendo, porém, a maior propriedade do de "toxoide", proposto por Ehrlich nos seus ainda hoje admiraveis trabalhos sobre a constituição da toxina diphterica. (Berl. klin. Woch. 1903, n. 35 e 37).

(") Dr. J. Lemos Monteiro — Preparo de toxoides tetanicos pelo methodo da formalina. Annaes Paulistas de Med. e Cir. N. 1 Vol. XII, 1921.

Toxina 8 (’), de 7-11-924, preparada com caldo duplo, de carne de vitella, peptona de Witte, Ph=7, 6. (”) Bacillo diphterico Park 8. D. M. M.=<0,0025 e >0,0016 cc..

1—Toxina 8+formalina a 1 por 1000—estufa a 37.°.

Dias de permanencia a 37.°	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n.°	Peso - grms.	RESULTADO
3	1 cc.	10/11/24	255	245,0	† 13 h. de 11/11/24
10	5 cc.	17/11/24	243	250,0	» n. 18/19/11/24
61	1 cc.	7/1/55	383	250,0	» n. 8/9/1/26
93	5 cc.	9/2/25	344	250,0	» 10 h. 10/2/25
159	5 cc.	6/4/25	60	240,0	» 16 h. 7/4/26
235	5 cc.	22/6/25	296	250,0	» 14 h. 23/6/25

Não foi feita nova verificação depois deste elevado numero de dias de permanencia a 37.°.

II — Toxina 8+formalina a 2 por 1000 — Estufa a 37.°.

Dias de permanencia a 37.°	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n.°	Peso - grms.	RESULTADO
3	5 cc.	10/11/24	325	250,0	† n. 10/11/11/24
10	5 cc.	17/11/24	179	240,0	» 14 h. 18/11/24
34	5 cc.	11/12/24	107	235,0	» 9 h. 12/12/24
61	1 cc.	7/1/25	137	250,0	» n. 8/9/1/25
93	5 cc.	9/2/25	350	250,0	» 10 h. 10/2/25
159	5 cc.	6/4/25	367	240,0	» 9 h. 7/4/25
235	5 cc.	22/6/25	58	250,0	» 14 h. 23/6/25

Não foram feitas verificações em datas posteriores.

III — Toxina 8+formalina a 3 por 1000 — Estufa a 37.°.

Dias de permanencia a 37.°	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n.°	Peso - grms.	RESULTADO
1	5 cc.	8/11/24	82	250,0	† n. 9/10/11/24
3	5 cc.	10/11/24	276	240,0	» 15 h. 11/11/24
5	5 cc.	12/11/24	25	240,0	» n. 13/14/11/24
10	5 cc.	17/11/24	286	250,0	» n. 18/19/11/24
15	5 cc.	22/11/24	49	240,0	» n. 23/24/11/24
24	5 cc.	1/12/24	78	250,0	» n. 2/3/12/24
34	5 cc.	11/12/24	86	250,0	» n. 12/13/12/24
40	2,5 cc.	17/12/24	359	250,0	» 13 h. 19/12/24
61	2,5 cc.	7/1/25	417	250,0	» 15 h. 9/1/25
93	5 cc.	9/2/25	411	250,0	» n. 10/11/2/25
124	5 cc.	2/3/25	61	250,0	» 16 h. 4/3/25

Não foram feitas verificações em datas posteriores.

(’) Todas as toxinas, depois das culturas serem filtradas apenas em papel filtro, são conservadas na geladeira, sob uma camada de toluol, sem addicção de outro qualquer antiseptico.

(”) Reacção determinada pelo methodo de A. Godoy.

IV — Toxina 8+formalina a 4 por 1000 — Estufa a 37.°.

Dias de permanencia a 37.°	Quantidade inject	Data da injecção	Cobaya n.°	Peso - grams.	RESULTADO
1	5 cc.	8/11/24	37	250,0	† n. 9/10/11/24
3	5 cc.	10/11/24	274	250,0	» 8 h. 12/11/24
5	5 cc.	12/11/24	65	250,0	» n. 13/14/11/24
10	5 cc.	17/11/24	285	250,0	» n. 19/20/11/24
15	5 cc.	22/11/24	429	250,0	» n. 24/25/11/24
24	5 cc.	1/12/24	97	240,0	» 16 h. 2/12/24
25	5 cc.	2/12/24	207	240,0	» n. 4/5/12/24
34	5 cc.	11/12/24	63	240,0	» n. 13/14/12/24
40	5 cc.	17/12/24	400	250,0	» n. 20/21/12/24
40	2,5 cc.	17/12/24	150	250,0	» n. 21/22/12/24
40	1 cc.	17/12/24	239	250,0	viva por mais 20 d. observação.
50	5 cc.	27/12/24	153	255,0	† n. 29/30/12/24
50	2,5 cc.	27/12/24	161	250,0	form. de escarra e † n. 41 511125
61	5 cc.	7/1/25	262	250,0	† 8 h. 12/1/25
61	2,5 cc.	7/1/25	213	250,0	» n. 11/12/1/25
93	5 cc.	9/2/25	177	250,0	oed. escarra e † n. 14115121125
124	5 cc.	2/3/25	356	250,0	oed. escarra, cicatrização e † n. 17118131125
124	2,5 cc.	2/3/25	199	250,0	oed. escarra, cicatrização e † 14 h. 214125

Nota-se sempre, após as inoculações, a formação de oedema no ponto de inoculação, abrangendo as zonas visinhas. A morte da cobaya prolongado-se alguns dias, observa-se a formação de necrose e de uma escarra; muitas vezes esta lesão se cicatriza antes que a morte se dê, se a attenuação não foi completa para a evitar.

Nestes ensaios, todos os animaes eram necropsiados para a verificação dos phenomenos da intoxicação diphterica.

As cobayas numeros 356 e 199, do protocollo IV, inoculadas respectivamente com 5 e 2,5 c. c. da anatoxina preparada com 4 °/°° de formalina e mantida na estufa a 37.° durante 124 dias, pela necropsia não apresentavam signaes de intoxicação diphterica; haviam tido oedema após a inoculação, escarra, que se cicatrizou e aparentavam bom estado de saude, sendo que, provavelmente, a morte tenha sido devida a causa diversa.

Nestas condições, pode-se concluir que a attenuação, embora incompleta em virtude das lesões locaes que provoca, se tenha dado no fim de 124 dias de permanencia a 37.° de uma toxina preparada com caldo duplo, não fermentado, pela addicção de formalina na proporção de 4 °/°°.

Mostraremos agora os resultados obtidos empregando-se toxinas preparadas com caldo fermentado pelo bacillo coli communior e cuja technica assim póde ser resumida: carne de vitella, 500,0 grs., agua 1000 c. c.. Maceração durante a noite na geladeira. Passar no panno. Ajustar a reacção para + 1 a phenolphtaleina. Juntar 10 c. c. de uma cultura em caldo, de 24 horas, de bacillo coli communior para cada

litro. Deixar na estufa durante 48 horas. Juntar uma clara de ovo batida para cada 2 litros (tempo dispensavel) e ferver durante 20 minutos. Justar a reacção a +0,5 a ph.. Juntar peptona de Witte: 2 °/° e chloreto de sodio: 0,5 °/°. Ferver para dissolver. Verificar a reacção final e ajustar para Ph.=7, 8 ou 8. Filtrar e distribuir 800 a 1000 c. c. em frasco de Erlenmeyer de 3 litros. Esterilizar no autoclave.

Toxina 17, de 2-3-25, preparada com caldo fermentado pelo bacillo coli communior, de carne de vitella, peptona de Witte, Ph.= 7,8, bacillo diphterico Park 8 — D. M. M. = <0,0025 e > 0,0016 c. c..

A formalina utilizada é do mesmo fabricante (Allemby's) da usada nas experiencias anteriores e juntada á toxina em differentes proporções, sendo as misturas mantidas na estufa a 37.° e feitas as verificações de tempos em tempos.

Em resumo, verificamos que a toxina juntada de formalina a 2 °/°° ainda se apresenta toxica para a cobaya de 250,0 grs. de peso no fim de 102 dias de permanencia a 37°, a morte se dando em 2 ½ dias.

Com 3 °/°° de formalina a attenuação era completa em 60 dias a 37.° provocando escarra que se cicatrizava, ficando a cobaya viva por mais de 30 dias de observações.

Com 4 °/°° de formalina a attenuação se deu em 26 dias, apresentando a cobaya os symptomas locaes, menos accentuados; com 30 dias a 37.° os symptomas locaes eram ligeiros, apenas oedema nos dias seguintes á injecção.

Com maiores proporções de formalina 5 a 10 °/°° a attenuação da toxina era mais ou menos rapida, conforme a proporção ajuntada, dando-se em 5 a 10 dias, notando-se ainda os accidentes locaes.

Toxina 21 — de 6-6-25, preparada nas mesmas condições que a anterior — D. M. M.=0,0025.

Com esta toxina repetimos os ensaios; eis os resultados obtidos com as proporções de formalina a 3 e 4 °/°°.

V — Toxina 21+formalina a 3 por 1000 — Estufa a 37.°

Dias de permanencia a 37.°	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n.°	Peso - grms.	RESULTADO
25	2,5 cc.	17/7/25	423	260,0	oed. † 14 h. 20/7/25
25	5 cc.	17/7/25	422	250,0	oed. » n. 19/20/7/25
30	2,5 cc.	22/7/25	253	260,0	oed. » 14 h. 26/7/26
30	5 cc.	22/7/25	48	230,0	oed. » 14 h. 24/7/25
40	5 cc.	2/8/25	78	250,0	oed. » n. 7/8/8/25
60	5 cc.	22/8/25	65	250,0	oed. escarra, cicatrização † n. 1912019925.

VI — Toxina 21+formalina a 4 por 1000 — Estufa a 37.°.

Dias de permanencia a 37.°	Quantidade inject.	Data da injecção	Cobaya n.°	Peso - grms.	RESULTADO
25	2,5 cc.	17/7/25	315	260,0	oed. † n. 19/20/7/25
25	5 cc.	17/7/25	254	260,0	oed. » n. 29/30/7/25
30	2,5 cc.	22/7/25	338	240,0	oed. viva por 15 dias de observações.
30	5 cc.	22/7/25	67	250,0	oed. viva por 15 dias de observações.

Destes resultados se conclue que a proporção de formalina, mais conveniente a se juntar á nossa toxina, para sua transformação em anatoxina, é de 4 °|°° e permanencia durante 30 dias na estufa a 37.°.

Destas duas series de experiencias se verifica que a attenuação da toxina e sua transformação em anatoxina pela addicção de formalina e permanencia na estufa, se processa differentemente conforme a toxina empregada, ou melhor, conforme a composição do caldo de cultura que se utilizou para seu preparo.

Com uma toxina obtida de um caldo não fermentado, de D. M. M. <0,0025, e.>0,0016 c. c., formalina a 4 °|°° e permanencia a 37.°, só se obtem a sua attenuação no fim de 124 dias. Este longo periodo de permanencia a 37.°, prejudicará certamente as propriedades antigenicas do producto obtido.

Já com o caldo fermentado, isempto, por isto, de assucares e, portanto, de composição chimica diversa, a toxina obtida, de D. M. M. identica, se attenua, transformando-se em anatoxina, com a mesma proporção de formalina, no fim de 30 dias de permanencia a 37°. Este espaço de tempo não prejudica as propriedades antigenicas da anatoxina, como mostraremos no decorrer deste trabalho.

Prolongando por mais alguns dias a permanencia na estufa (entre 30 e 40 dias) verificamos que as reacções locaes são muito menores, quasi nullas.

Attenuação e transformação da toxina estabilizada.

Nas experiencias descriptas foram empregadas toxinas recentemente preparadas.

Sabemos que a toxina diphterica é instavel, se alterando e attenuando com o tempo, até que adquira no fim de alguns mezes de permanencia na geladeira ou no frigo, uma certa estabilidade quanto a sua actividade toxica.

Repetimos as verificações utilisando toxinas velhas, mais estaveis pela permanencia de, pelo menos, 6 mezes na geladeira.

Com a toxina 18, preparada com caldo fermentado, de carne de vitella, peptona de Witte, Ph. 7,8, bacillo diphterico Park 8, de D. M. M. <0,0025 c. c., quando do seu preparo e que cahiu a 0,0033 c. c., por occasião da sua utilização, depois de 6 mezes de geladeira, verificamos a maior rapidez do tempo de attenuação. Esta se deu em menos de 20 dias com a proporção de formalina a 4 °|°°. O seu valor antigenico foi, como se verá adiante, mais accentuado que com as anatoxinas preparadas com a toxina recente.

Com a toxina 21, preparada nas mesmas condições de D. M. M. <0,0025 e que cahiu a 0,005 c. c., por occasião de ser utilizada depois de uma permanencia na geladeira durante 10 mezes, juntada formalina a 4 °|°°, a attenuação se processou em cerca de 40 dias.

Esta differença pode ser attribuida á diversidade da procedencia do formol utilizado nas duas verificações ou ás condições proprias a cada toxina.

As reacções locaes consecutivas foram accentuadas com estas duas anatoxinas, principalmente com a primeira. Com ambas verificamos o apparecimento de phenomenos tardios de paralysia nas cobayas inoculadas com 5 c. c.. Depois de resistirem 15 dias de observação, a morte sobreveiu no 20.º ou no 21.º dia, precedida por paralysia dos membros. Attribuimos o facto á possivel existencia de quantidades apreciaveis de toxonas ainda não de todo transformadas pela acção do formol neste lapso de tempo e que são tambem elaboradas pelo bacillo e cuja producção varía, conforme o meio cultural e condições proprias ao germe.

Estes accidentes tardios, devidos ás toxonas (Ehrlich) (') são muito caracteristicos e apparecem do 14.º ao 20.º dia, conforme a dose, e, ás vezes, na 3.ª semana, se apresentam repentinamente e o animal morre em poucos dias.

A necropsia das cobayas em que o facto foi verificado, não revelou signaes de intoxicação diphterica, indicando que a toxina já se havia transformado em toxoide.

A transformação das toxonas, mais abundantes nas toxinas velhas, parece pois não se dar pela acção do formol ou mais lentamente que a da toxina. Algumas cobayas após o apparecimento destes phenomenos tardios de paralysias que duravam cerca de 24 a 48 horas se restabeleciam, apresentando-se vivas por mais de 30 dias de observação.

Nas cobayas inoculadas com 1 ou 2 c. c. sómente, não se observam estes accidentes tardios, pelo facto das toxonas, porventura existentes serem em menor proporção que com as doses maiores (5 c. c.), quando foram verificados.

Embora alguns pesquizadores discordem e duvidem da existencia das toxonas (Arrhenius e Madsen, Ramon e outros) os trabalhos de Ehrlich e seus collaboradores são muito demonstrativos e seus argumentos bastante fortes no que diz respeito á composição da toxina diphterica.

Para se diminuir o mais possivel os accidentes locaes consecutivos a injecção da anatoxina, reduzindo-os a reacções proteinicas e allergicas (Zoeller) ha conveniencia de só se utilizar para fins prophylacticos, as anatoxinas sempre preparadas com toxinas recentes e só depois de 6 mezes de permanencia na geladeira.

Para fins experimentaes, como immunisação de cavallos, o seu emprego pode ser feito immediatamente, pois os accidentes locaes em animaes não acarretarão consequencias de importancia.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Para a attenuação da toxina e sua transformação em anatoxina, Ramon (') utilizou o aldehyde formico, podendo tambem ser obtida pela addicção de outras substancias chimicas.

Com a technica antiga de se juntar o liquido de Gram á toxina,

---

(') Paul Ehrlich — The constituints of diphteria toxin, em Studies in immunity, de Ehrlich — Bolduan. 1910.

(') G. Ramon — Compts. R. Ac. Sciences. T. CLXXLX, 1924.

nas primeiras doses para a immunisação de animaes, attenuando sua toxidez, chegava-se a identico proposito.

Berthelot e Ramon (") estudaram diversos agentes de transformação das toxinas em anatoxinas, entre as quaes a acroleina, aldehyde crotonico, aldehyde ethylico e hexamethyleno-tetramina. Pensam ser melhor que o formol para a transformação da toxina tetanica, o aldehyde ethylico que, juntado na porção de 4 a 5 °|° de uma solução de 58 por 1.000 e após 5 a 6 semanas, produz uma coloração rosea. Com a toxina diphterica, os melhores resultados obtiveram com o aldehyde formico.

Joannides (""') obtem com leite, em contacto durante 6, 12, 24, 48 horas a 37.° com a D. M. M. de toxina diphterica, a sua attenuação para a cobaya e a não destruição do poder antigenico. Esta attenuação é tanto mais profunda quanto maior fôr o contacto com o leite.

Pretende verificar se esta acção do leite sobre a toxina tenha outra causa ou se é devida a uma acção anatoxigena desta substancia.

Pico e Miravent (""") com um producto da hydrolyse da glycose, possuindo funcção aldehyde, injectado juntamente com um certo numero de doses mortaes de toxina diphterica, conseguem a sobrevivencia dos animaes, não observando reacções locaes e preveem o tratamento chimio therapico das toxiemias.

Devemos mencionar o interessante trabalho de Backer, Kraus e Lowenstein (""""") que tratando o toxoide diphterico pelo acido acetico fraco ou pelo alcool, conseguem precipitados que, separados e dissolvidos em solução physiologica, apresentam ainda suas propriedades antigenicas, produzindo reacções locaes menores que com o producto primitivo e cujo emprego no homem pretendem ensaiar.

Ainda mencionaremos os trabalhos de Larson e Eder (1) que praticaram a immunisação antidiphterica com toxina tornada atoxica pela addição de ricinoleato de sodio.

Varias são, pois, as substancias que tornam atoxica uma toxina, mantendo suas propriedades antigenicas. No presente trabalho foi empregado o aldehyde formico, segundo a indicação de Ramon, porém, variando o meio de cultura para a obtenção da toxina diphterica, portanto, a sua composição chimica.

Com a toxina obtida de um caldo duplo, não fermentado, a sua attenuação com formalina a 4 °|°° e permanencia na estufa a 37.° só se processou num lapso de tempo excessivamente longo e que provavelmente prejudicará o poder antigenico da anatoxina, sendo neces-

---

(") A. Berthelot et G. Ramon — Compts. Rend. Ac. Sc. n.° 4, T. 180. pagina 340 — 1925.

(""') Joannides — Compts. R. Soc. Biologie. n.° 33, T. XCIII — 1925.

(""") Cezar E. Pico et J. M. Miravent — Compts. R. Soc. Biol. n.° 7. Tomo XIV, pag. 484 — 1926.

(""""') Backer, St., Kraus, R., und Lowensteins, E., Zur Frage der aktiven Schutginpfung gegen Diphterie mittels Toxoide. Zeitsch. f. Imunit und exp. Therapie 45,1 pag. 86.

(1) W. P. Larson y Howard Eder. — The J. of Am. Med. Ass. (Ed. Hespanhola) pag. 497, n.° 8, vol. 15. 1926.

sarias novas pesquizas para, com maiores proporções de formalina e uma vez verificado que não accarretam inconvenientes, determinar-se o optimo a se juntar para a transformação de taes toxinas em tempo menor.

Com toxina obtida de caldo fermentado, isempto de assucares, conseguiu com a proporção de formalina a 4 °/∞ e permanencia a 37.°, a transformação em anatoxina no praso indicado por G. Ramon (30 a 40 dias).

Para que as reacções locaes se reduzam a accidentes de ordem proteinica e de allergia, ha conveniencia de se utilizar para fins prophylacticos a anatoxina depois de varios mezes do seu preparo, só se empregando immediatamente para fins experimentaes e immunisação de animaes para a producção de antitoxina.

Destes resultados pode-se chegar ás seguintes conclusões:

1 — A composição do meio de cultura para a producção de toxina tem influencia na sua transformação em anatoxina pela addicção de formol e permanencia a 37.°.

II — Seria de vantagem a uniformisação da technica para a producção de toxina nos differentes institutos para que os resultados experimentaes decorrentes se tornem semelhantes e identicos os productos obtidos, como a anatoxina, que tenham applicação pratica de inestimavel valor.

II. PROPRIEDADES ANTIGENICAS

A principal propriedade da anatoxina é a de conservar as propriedades antigenicas ou immunisantes da toxina de onde proveio, deixando de possuir a sua toxidez.

Mostramos já a technica de que lançamos mão para preparar a anatoxina diphterica partindo das toxinas por nós obtidas.

Assignalaremos agora as experiencias que fizemos com o fim de verificar as propriedades antigenicas destas anatoxinas.

Empregamos para isto algumas das cobayas que haviam sido injectadas para a verificação da atoxidez das anatoxinas e outras novas, que injectamos com 1, 2 e 3 doses variaveis de anatoxina, verificando, alguns dias após, a sua resistencia para um certo numero de D. M. M. de toxina, e com coelhos immunisados pesquizamos a producção de antitoxina no sôro, o mesmo fazendo tambem nas cobayas.

Em primeiro lugar mostraremos os resultados obtidos com anatoxinas preparadas com toxina recente e formalina a 4 °|°°, e depois os obtidos com toxina velha e formalina na mesma proporção.

Resistencia das cobayas immunisadas com anatoxina, obtida de toxina recente+formalina, a um certo numero de D. M. M. de toxina.

Cobaya 104 — injectada com 1 c. c. de anatoxina. 10 dias após recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: † em 3 dias.

Cobaya 118 — injectada com 1 c. c. de anatoxina. 10 dias após recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: † em 3 dias.

Cobaya 242 — injectada com 1 c. c. de anatoxina. 10 dias após recebe 10 D. M. M. de toxina.
Resultado· † em 3 dias.

Cobaya 338 — (Protocollo IV) injectada com 2,5 c. c. de anatoxina. No fim de 15 dias recebe 10 D. M. M. de toxina.
Resultado: † em 2 dias.

Cobaya 67 — (Protocollo IV) injectada com 5 c. c. de anatoxina. Após 15 dias recebe 10 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva, por mais de 20 dias de observação.

Vê-se que, com uma só dose de 5 c. c. de anatoxina, se conseguiu a resistencia da cobaya contra 10 D. M. M. de toxina. Uma só injecção de 2,5 c. c. e de 1 c. c. não protegeram o animalzinho contra 10 D. M. M.; uma só injecção de 1 c. c. não protege contra 5 D. M. M..

Não verificamos a resistencia das cobayas inoculadas com uma só dose de 1 c c. para menor numero de doses mortaes de toxina, nem

para 5 D. M. M., da inoculada com 2,5 c. c., sendo provavel que resistissem a injecção de 1 a 5 D. M. M..

Em todo caso, verificou-se que com uma só injecção com 5 c. c. de anatoxina, se protege a cobaya contra 10 D. M. M. de toxina pura.

Vejamos a resistencia das cobayas injectadas com 2 doses de anatoxina:

Cobaya 248 — recebe 2 injecções de anatoxina, sendo a primeira de 1 c. c., e a segunda de 2 c. c., 5 dias após.
8 dias depois da ultima injecção recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 15 dias de observação.

Cobaya 368 — recebe 2 injecções de anatoxina, sendo a primeira de 1 c. c., e a segunda de 2 c. c., 5 dias após. Depois de 8 dias recebe 10 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 15 dias de observação.

Verifica-se que com 2 injecções (de 1 a 2 c. c. espaçadas de 5 dias) de anatoxina se proteja a cobaya contra 5 e 10 doses mortaes de toxina.

Identico resultado obtivemos com 3 doses de anatoxina, 1 c. c., 2 c. c., e 3 c. c., espaçadas de 5 a 7 dias, e a verificação da resistencia feita 10 dias depois da ultima injecção.

Resistencia das cobayas immunisadas com anatoxina, obtida de toxina velha+formalina, a um certo numero de D. M. M. de toxina.

Após a injecção de 1 só dose de anatoxina:

Cobaya 336 — injectada com 0,5 c. c. de anatoxina em 8-10-925. Em 23-10-925, recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 237 — injectada em 8-10-925 com 1 c. c. de anatoxina. Em 23-10-25 recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 400 — injectada em 8-10-25 com 2 c. c. de anatoxina. Em 23-10-25 recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: † a 5/6-11-25. Pela necropsia não se verifica signal algum de intoxicação diphterica, sendo outra a causa da morte.

Uma só injecção, mesmo de 0,5 c. c., desta anatoxina protege a cobaya contra 5 D. M. M. de toxina.

A immunisação com 2 injecções de anatoxina deu o seguinte resultado:

Cobaya 499 — Primeira inoculação de 0,5 c. c. de anatoxina em 8-10-25; segunda inoculação de 1 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 5 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 20 dias de observação.

Cobaya 330 — Primeira inoculação de 0,5 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 1 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 10 D. M. M..
Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 390 — Como a anterior e identico resultado.

Cobaya 447 — Primeira inoculação 0,5 c. c. em 8-10-25; segunda de 1 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 100 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 20 dias de observações.

Cobaya 464 — Primeira inoculação de 1 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 2 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 5. D. M. M. de toxina.
Resultado: † 9 h. 17-11-25. Pela necropsia não se observam signaes de intoxicação diphterica, sendo outra a causa da morte.

Cobaya 206 — Primeira inoculação de 1 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 2 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 10 D. M. M..
Resultado: viva por mais de 20 dias de observação.

Cobaya 352 — Primeira inoculação de 1 c. c. em 8-10-25; 2.ª de 2 c. c. em 23-10-25. Em 7-11-25 recebe 100 D. M. M. de toxina.
Resultado: viva por mais de 20 dias de observação.

Verifica-se destes resultados que com duas injecções espaçadas de 20 dias, tanto de 0,5 e 1 c. c. como de 1 e 2 c. c. se protegem a cobaya até contra 100 D. M. M. de toxina.

Evidente é, pois, o valor immunisante da anatoxina.

Verificação de producção de anti-toxina.

Para esta verificação experimental empregamos o coelho, fazendo a verificação da presença de anti-toxina pelo methodo de Erhlich, sempre mais seguro e rigoroso, embora impraticavel nas verificações de proporções minimas do anticorpo, só possiveis com os methodos intradermicos, como o de Roemer, porém menos rigorosos na sua interpretação. Eis o protocollo de um dos coelhos experimentados.

Coelho 143, com 1.530 gr. de peso.

Verificação da presença de anti-toxinas naturaes:

Sangria exploradora em 10-8-25. — Dosagem do sôro (10-8-25): Dosa — 0,5 u. i..

Não ha no sôro 0,5 u. i.. Provavelmente não o haveria de todo, visto como o pombo (1) inoculado para a verificação de 0,5 u. i. (com 2 c. c. de sôro) morreu em menos de 24 horas.

---

(1) Para a dosagem do sôro anti-diphterico empregamos o pombo, em vez da cobaya, pela maior facilidade da sua obtenção e por termos confirmado verificações anteriores feitas em nosso Instituto (Dorival C. Penteado e J. B. Arantes e outros). Ha evidente vantagem na substituição da cobaya pelo pombo adulto para a dosagem do sôro anti-diphterico, segundo o methodo de Ehrlich.

E' necessario, porém. que o L† da toxina padrão seja determinado para o pombo; a differença do L† entre os 2 animaes é muito pequena, cerca de 0,03 ç. c. a mais para o pombo.

Primeira injecção, sub-cutanea de 1 c. c. de anatoxina (preparada com toxina recente) em 10-8-25.

Dosagem do sôro em 14-8-25 (4 dias após): Dosa — 0,5 u. i..

Segunda injecção de 2 c. c. de anatoxina em 14-8-25.

Dosagem do sôro em 19-8-25 (5 dias após): Dosa — 0,5 u. i..

Terceira injecção de 5 c. c. de anatoxina em 19-8-25.

Dosagem do sôro em 29-8-25 (10 dias após): Dosa—0,5 u. i..

Após a 3.ª injecção o sôro apresenta 0,5 u. i. por c. c..

Quarta injecção de 10 c. c. de anatoxina em 29-8-25.

Dosagem do sôro em 9-9-25 (11 dias após): Dosa: + 2 u. i. e — 5 u. i..

Verifica-se que o valor anti-toxico do sôro vae augmentando, apresentando após a 4.ª injecção mais de 2 u. i. por c. c.. Se as primeiras inoculações fossem mais espaçadas é possivel que este resultado fosse attingido muito antes, com menor numero de inoculações.

Em outro coelho (n.º 230, com 1400 grs. de peso) praticamos 3 inoculações de anatoxina (de 1, 2 e 5 c. c.), preparada com toxina velha, com 15 dias de intervallo entre cada uma. 15 dias após a ultima injecção o sôro apresenta mais de 1 u. i. por c. c..

Destas immunisações experimentaes fica evidente que a anatoxina preparada com formalina a 4 °/°° e permanencia a 37.º durante 30 dias, provoca a formação de antitoxina, em quantidade apreciavel, no coelho, após algumas inoculações.

Verificação, nas cobayas inoculadas com anatoxina, da presença de antitoxina em proporção capaz de conferir-lhes immunidade.

Kellogg-test.

Para a verificação da presença de antitoxina diphterica no sôro dos animaes inoculados com as anatoxinas por nós preparadas, além da sua dosagem, segundo o methodo de Ehrlich, nos sôros dos coelhos immunisados, como vimos acima, mais demorada, exigindo maior quantidade de sôro para as proporções minimas de u. i. e por isto, de pratica mais difficil em cobayas, lançamos mão de um outro methodo, extremamente pratico e que nos dá indicações sobre a influencia immunisante do antigeno empregado.

O methodo de dosagem de Roemer ou a reacção de Schick poderiam dar as indicações desejadas, porém resolvemos empregar nestas verificações o methodo de Kellogg (intra-cutaneous guinea-pig test).

Este methodo de dosagem baseia-se no facto já estabelecido de que a presença no sangue de 1/30 u. i. protege o individuo contra a infecção diphterica.

E' esta a proporção de u. i. que determina o Schick negativo.

Fizemos, nas cobayas immunisadas, a pesquiza segundo a technica de Kellogg, da presença desta proporção de antitoxina, capaz de conferir immunidade ao homem.

O mesmo deveria acontecer com os animaezinhos, quando immunisados, e se as testemunhas reagissem differentemente.

A reacção de Kellogg (') não apresenta as numerosas causas de erros que ás vezes difficultam a interpretação da reacção de Schick, visto como, para sua pratica se emprega o soro a ser verificado e um animal intermediario, cuja sensibilidade em relação á diphteria é sempre a mesma.

Um estudo mais detalhado sobre a technica da reacção e seus resultados é assumpto de outro trabalho nosso que se encontra na pagina 137 deste volume, e confirma as observações de Kellogg (').

Diremos, em resumo, que a reacção consiste na injecção intradermica, em uma cobaya, de uma mistura em partes iguaes de sôro a se dosar e de uma diluição de toxina contendo 1/30 do L+ por c. c.; injecta-se 0,1 do sôro+0,1 da diluição do L+, ficando a diluição deste de 1/300. Se o sôro tiver 1/30 de u. i., a quantidade injectada representará 1/300 de u. i., da mesma forma.

No caso da reacção negativa, nada se notará na zona de inoculação ou apenas vermelhidão sem necrose, indicando que a proporção de toxina livre foi neutralizada pela proporção correspondente de anti-toxina existente no sôro; na reacção positiva, a proporção de antitoxina livre no sôro, sendo menor que 1/30 de u. i. ou não existindo de todo, se notará no ponto de inoculação uma necrose, que apparece n 2.º ou 3.º dia.

Por este methodo fizemos as verificações da presença de, pelo menos, 1/30 de u. i., porção necessaria para consideral-as immunisadas, nas cobayas inoculadas com differentes doses das anatoxinas preparadas.

Daremos alguns exemplos destas verificações:

Cobaya 336 — inoculada com 0,5 de anatoxina. Sangria de 1 c. c., 12 dias após. Com o seu sôro é praticada a reacção de Kellogg, cujo resultado foi negativo, indicando sua immunidade.

Cobaya 237, inoculada com 1 c. c. de anatoxina e cobaya 400 inoculada com 2 c. c., sangradas no 12.º dia, tiveram tambem o Kellogg test negativo. O mesmo resultado constatamos com as cobayas 499, 330, 390, 447, 464, 206 e 352, que haviam soffrido duas inoculações de anatoxinas (as 4 primeiras de 0, 5 e 1 c. c., com intervallo de 15 dias e as restantes de 1 e 2 c. c., com o mesmo intervallo), a reacção praticada 10 e 12 dias após a ultima inoculação.

As diversas cobayas normaes, testemunhas, com cujos sôros se praticava a reacção e que não haviam recebido injecções de anatoxina, apresentavam sempre a reacção de Kellogg positiva, caracteristica.

Só este facto serve de base para que se possa concluir da influencia immunisante da anatoxina, embora não se precise o gráu e o limite da immunisação obtida, o que em todo caso tambem foi verificado, como foi visto.

(') W. H. Kellogg — The intra-cutaneous guinea-pig test for human susceptibility and immunity to diphteria. The J. of Am. Med. Ass. n.º 11, vol. 80. 1923. pag. 748.

(') W. H. Kellogg-Should The Schick test be abandoned? Am. J. of Public Health, n.º 10. Vol. XV. 1925.

Discussão e conclusões.

A verificação das propriedades antigenicas da anatoxina diphterica tem sido feita por todos os experimentadores que se dedicaram ao seu estudo.

No presente trabalho, ficaram tambem evidenciadas estas propriedades nas anatoxinas preparadas.

As verificações foram feitas quer pesquizando a resistencia das cobayas á inoculação de um certo numero de D. M. M. de toxina, quer dosando a antitoxina no sôro de coelhos immunisados e, por fim, pesquizando-se a presença de, pelo menos, 1/30 de u. i. no sôro das cobayas inoculadas com uma ou mais doses diversas.

Em conclusão, as anatoxinas preparadas nas condições indicadas apresentam evidentes propriedades antigenicas, verificadas em animaes de laboratorio.

III. DOSAGEM E VERIFICAÇÃO DO PODER ANTIGENICO

Não se deve, em rigor, fixar um limite de tempo de permanencia a 37.° para que a toxina juntada de formalina, se transforme em anatoxina utilizavel na pratica.

Vimos que este periodo é variavel por condições inherentes á composição do caldo de cultura e da propria toxina.

Um periodo de 30 a 40 dias é, em geral, sufficiente para aquelle desideratum, sempre que utilizamos toxinas recentes preparadas com caldo fermentado pelo bacilllo coli communior.

Um elevado poder toxico da toxina, uma vez que não esteja em relação com o seu valor antigenico é desnecessario. As D. M. M. das toxinas usadas variavam sempre entre 0,0025 e 0,0016 de c. c., e as anatoxinas com ellas preparadas evidenciaram intactas suas propriedades antigenicas.

Em virtude mesmo da possibilidade de variações nas suas propriedades é que é necessario e indispensavel verificar, além da atoxidez de cada partida de anatoxina preparada, principalmente para fins prophylacticos, tambem o seu valor antigenico.

Para a antitoxina, nos encontramos perfeitamente apparelhados e com methodos mais ou menos seguros pelos quaes se indicará seu poder curativo expresso em unidades antitoxicas.

De maior necessidade se torna a verificação de um producto que vae servir, não para remediar o mal declarado, porém para prevenil-o nos individuos que lhe são sujeitos.

Só assim o seu emprego, inspirando confiança, se generalisará.

O poder antigenico das toxinas é variavel, por innumeras circumstancias; o mesmo se poderá dizer das anatoxinas, que dellas provêm.

Dosagem in vitro. Floculação.

A dosagem do poder antigenico de uma anatoxina, expressa em unidades anatoxicas, proposta por G. Ramon, apresenta as mesmas vantagens e desvantagens do methodo proposto por este autor para a dosagem da antitoxina. Baseia-se na floculação da anatoxina em presença de um sôro anti-toxico.

Se apresenta algumas vantagens sobre o ponto de vista economico e facilidade da sua pratica, por ser uma dosagem *in vitro*, apresenta tambem os inconvenientes de uma reacção baseada em phenomenos de ordem physico-chimica, variaveis por innumeras circumstancias.

Estas considerações se originaram dos resultados por nós obtidos em grande numero de dosagens de antitoxinas diphterica e tetanica que praticamos comparativamente com os methodos de dosagem de Ehrlich e de Rosenau e Anderson e que concordam com os obtidos por numerosos autores.

Verificamos para um mesmo sôro a variabilidade dos resultados da dosagem, pela sua simples permanencia em dias seguidos na gela-

deira. São as condições physio-chimicas, reacção, etc., variando com o tempo e outros factores, que modificam o phenomeno da floculação, embora fosse sempre a mesma a toxina utilizada para a reacção.

Quanto a anatoxina, verificamos com diversas partidas, a sua floculação em presença da antitoxina, embora de menor intensidade e mais tardiamente tanto nas reacções praticadas a 37.° como na temperatura de 55.°, em banho-maria.

Verificação do poder antigenico in vivo.

Sendo discutivel o facto de que pelo seu poder floculante se possa medir o valor antigenico de uma anatoxina, propomos um methodo de verificação *in vivo*.

Com este methodo se poderá evidenciar de um modo seguro o poder antigenico de uma anatoxina, embora não se possa precisar o valor deste poder. Se verificará a qualidade, embora não se indique a quantidade.

Para fins praticos, é o bastante, uma vez que esta qualidade se manifeste sob certas condições.

Este methodo de verificação do poder antigenico da anatoxina consiste na inoculação, em cobayas de 250 grammas de peso, das duas primeiras doses de anatoxina utilizada na vaccinação, de 0,5 e 1 c. c. com 15 a 20 dias de intervallo e na pratica da reacção de Kellogg, com sôro dos animaes inoculados, no fim de igual numero de dias.

As anatoxinas que nestas doses tornem o Kellogg negativo nas cobayas inoculadas, apresenta sufficiente poder antigenico para a sua utilização na pratica.

A verificação tambem póde ser feita com o sôro da cobaya inoculada com 5 c. c., com o fim de se verificar a atoxidez da anatoxina depois de sua permanencia na estufa e que permanece viva por mais de 15 dias de observação.

Nas anatoxinas com sufficiente poder antigenico, esta dose, em uma só injecção, provoca o Kellogg negativo, da mesma forma que as duas doses assignaladas.

Quando esta unica dose de 5 c. c. ou as duas doses de 0,5 e 1 c. c. não modificam o resultado da reacção de Kellogg, que continúa positiva, a anatoxina é destituida do necessario poder antigenico para sua utilização pratica.

Contra este processo seguro, pois que é praticado *in vivo*, utilizando-se um animal intermediario, sensivel, se poderá dizer que é demorado.

Este facto não o desvaloriza, embora não o seja quando se o pratica com a cobaya utilizada para a verificação da atoxidez da anatoxina. Além disto, sabemos que as propriedades da anatoxina não se alteram facilmente com o tempo, podendo o producto esperar, até com vantagem, o resultado da verificação, antes de ser entregue aos serviços de prophylaxia.

Para mostrar sua marcha, indicaremos duas verificações praticadas segundo o methodo:

Anatoxina 18 a — (preparada com toxina de 6 mezes mais formalina a 4 °/∞, estufa a 37.° durante 13 dias).

a) Verificação da atoxidez: Cobaya 16, com 250,0 gr. inoculada em 2-12-25, com 5 c. c..
Resultado: Viva durante 15 dias de observação (reacção local intensa).

b) Verificação do poder antigenico: 1.° na cobaya 16 sangrada em 17-12-25. Kellogg test praticado com seu sôro: cobaya 131, lado esquerdo.

Resultado: negativo (immunisada).

2.° Após duas inoculações na cobaya 426:
a 1.ª, de 0,5 em 2-12-25,
a 2.ª de 1 c. c. em 17-12-25. (')

Kellogg test praticado com seu sôro em 4-1-26. Cobaya 253, lado esquerdo.

Resultado: negativo (immunisada).

Anatoxina 31 — (preparada com toxina recente mais formalina a 4 °/°°, estufa a 37.° durante 32 dias.

a) Verificação da atoxidez: cobaya 240 com 250 gr. inoculada em 6-2-926 com 5 c. c..

Resultado: viva após 18 dias de observação.

b) Verificação do poder antigenico:

1.° na cobaya 240, sangrada em 20-2-26.
Kellogg test praticado com o seu sôro: cobaya 303, lado esquerdo.

Resultado: negativo (immunisada).

2.° Após duas inoculações, na cobaya 75, com 250 grs. a 1.ª de 0,5 c. c., em 6-2-26; a 2.ª de 1 c. c. em 20-2-26 (").
Kellogg test praticado com o seu sôro em 9-3-26: cobaya 161, lado direito.

Resultado: negativo (immunisada).

Todas as partidas de anatoxina eram submettidas, antes do seu emprego quer para a immunisação de cavallos para a producção de antitoxina, quer para uso prophylactico, á mesma verificação, e seriam desprezadas, o que não nos aconteceu até agora, as em que o Kellogg teste se mantinha (como em cobayas normaes) positivo após uma inoculação de 5 c. c. ou duas de 0,5 e 1 c. c. de anatoxina, segundo o modo indicado.

(') Após a primeira injecção, antes de se praticar a segunda a cobaya é sangrada no coração em 1 c. c. de sangue. Com o sôro se praticou o Kellogg test (cobaya 131, lado direito) que foi negativo, mostrando que a immunidade occorreu após a 1.ª injecção de 0,5 c. c. de anatoxina.

(") Antes de praticar a segunda injecção esta cobaya tambem foi sangrada no coração em 1 c. c. de sangue. Com o seu sôro praticou-se o Kellogg test (cobaya 303 lado direito) que deu resultado positivo, indicando que ainda não se achava immunisada após a 1.ª injecção de 0,5 c. c.

Discussão e conclusões.

G. Ramon (') indica como methodo de dosagem do poder antigenico de uma anatoxina a reacção de floculação, tomando por base um sôro padrão e exprime este valor em "unidades antigenicas ou anatoxicas representadas pelo numero de unidades anti-toxicas capazes de saturar, *in vitro*, 1 c. c. de anatoxina, isto é, capazes de fazer apparecer neste c. c. a floculação inicial".

Assignala este autor a regularidade e precisão e a superioridade de uma reacção physico-chimica sobre um processo biologico, variavel por differenças individuaes dos animaes experimentados.

Embora não se desconheça estas variações de um processo biologico, o mesmo se poderá dizer de um processo physico-chimico.

Ionescu-Mihaesti e Damboviceanu ("), mostraram a influencia da reacção do meio sobre a neutralização da toxina diphterica pela anti-toxina correspondente e pesquizaram (confirmando experiencias antigas de Morgenroth e Calmette e recentes de Porter) os limites exactos de concentração em ions H entre os quaes a antitoxina póde agir em presença da toxina correspondente e a neutralizar.

Plotz e Schoen ("') mostram as mudanças das reacções dos sôros mantidas em differentes condições.

Verificaram que o sôro normal de cavallo conservado a 37.° torna-se cada vez mais alcalino nos dias seguintes e que esta alcalinidade progride até attingir um maximo, onde se mantem com ligeiras variações; com sôros conservados a 0.° esta variação é pouco accentuada, conservado a 16.° — 18.° o augmento de Ph é muito mais sensivel e a marcha da alcalisação mais rapida.

Mostram ainda que estas mudanças são influenciadas tambem pela superficie do sôro em contacto com o ar, sendo que a alcalinisação é mais rapida quanto mais larga fôr a superficie do contacto; além disto a altura da columna do sôro no tubo influe. Os autores explicam o caso por uma decomposição dos carbonatos do sôro e um desprendimento de gaz carbonico. Nos tubos fechados a lampada, o contrario verificaram, isto é uma tendencia a acidificação.

Estas variações physico-chimicas dos sôros podem explicar as differenças de resultados em reacções sôrologicas decorrentes de phenomeno da mesma natureza.

Verificamos tambem as mudanças de resultados com a floculação da toxina e sôros anti-diphtericos, de sangrias exploradoras, praticada em dias seguidos de permanencia do sôro na geladeira, como vimos.

Assim sendo, causas diversas tambem influem nos resultados das reacções baseadas em phenomenos physico-chimicos. Este facto como os para as reacções biologicas, não diminuem o valor do methodo de Ramon, sempre que as condições experimentaes sejam identicas, para a dosagem da antitoxina.

Para a anatoxina, porém, tomando um sôro *in natura* como pa-

---

(') G. Ramon — Annales de l'Institut Pasteur — n.° 1 T. XXXIX. 1925.

(") C. Ionescu-Mihaesti e Damboviceanu. C. R. Soc. Biol. n.° 25. T. XCI. 1924.

("') Harry Plotz e M. Schoen — Annales de l'Inst. Pasteur. n.° 10 T. XXXVIII. 1924.

drão, e podendo as condições physico-chimicas deste variarem, desde que não se encontre em condições que o evitem (como nos sôros padrões para a dosagem *in vivo* da antitoxina) o mesmo não acontece.

Estes motivos explicam, no estudo da reacção da floculação, ao lado dos resultados mais ou menos semelhantes aos de Ramon, obtidos por Schmidt (1), Renaux (2), Scholz (3), Stanhope Bayne-Jones (4) e outros, as divergencias maiores notadas por outros pesquizadores, como Sordelli e Serpa (5), Carvalho Lima (6), Moloney e Beecher (7), Gleny e Okell (8), Gleny, Pope, Waddington e Wallace (9) e outros.

Moloney e Beecher pensam que a unidade anatoxica ou antigenica creada por G. Ramon não representa o valor antigenico do toxoide (anatoxina), visto como este valor não é constante para o mesmo toxoide, dependendo do sôro usado para a sua determinação. Isto porque o tubo de floculação inicial, como verificaram, não representa de facto a mistura neutralisada, concluindo que "ha uma pequena evidencia de qualquer relação precisa entre o poder de floculação de um toxoide e seu valor antigenico". Mostram a identidade do phenomeno da floculação com o da agglutinação e que um sôro agglutinante antidiphterico (não contendo anti-toxina) reunido á toxina, apresenta tambem o phenomeno e acham que a floculação pode ser devida a um antigeno e anticorpo outros que a toxina e antitoxina, sendo que esta reacção é alterada quantitativamente por outras substancias existentes no caldo filtrado ou no sôro (colloides não especificos, agglutininas, etc.).

O methodo de dosagem da antitoxina pela floculação, proposto por G. Ramon é de incontestavel valor, podendo nos dar indicações sobre a "avidez" de um sôro, segundo um recente trabalho de Madsen e Schmidt (') que seria tanto maior quanto menor fôr o tempo de floculação e estaria em relação com o valor curativo do sôro, servindo ainda para nos orientar quanto á marcha de uma immunisação experimental, não se devendo, porém, dispensar, para as dosagens definitivas e para os sôros entregues ao consumo, a verificação *in vivo*, pelo methodo officialmente adoptado.

Por todas as considerações feitas é que procuramos fazer, tambem por um methodo biologico as verificações do poder antigenico da anatoxina.

---

(1) S. Schmidt — C. R. Soc. Biol. n.° 15 T. CX — 1924.
(2) E. Renaux — C. R. Soc. Biol. n.° 20 T. LXXXIX — 1923.
(3) W. Scholz — Central f. Bakt. T. XCI — 1923.
(4) Stanhope Bayne-Jones — The J. of Immunolagy n.° 6 T. IX — 1924.
(5) A. Sordelli e Serpa — C. R. Soc. Biol. n.° 31 T. XCI — 1924.
(6) Carvalho Lima — Annaes Paulistas de Med. e Cir. n.° 2 Vol. XV — 1924.
(7) P. J. Moloney and C. Beecher — The J. of Path. and Bact. n.° 4 T. XXVIII — 1925.
(8) A. T. Gleny e Okell — The J. of Pathology and Bacteriology T. XXVII — 1924.
(9) A. T. Gleny, C. G. Pope, H. Waddington e U. Wallace — The J. of Path. and Bact. n.° 3 — T. XXVIII — 1925.

(') Th. Madsen e S. Schmidt — Sur l'avidité du serum anti-diphterique. — Annales de l'Institut Pasteur, n.° 4 T. XL — 1926.

Em conclusão, o methodo descripto consiste na inoculação de uma só ou de duas doses menores (0,5 e 1 c. c. espaçadas de 15 dias) de anatoxina em cobayas e 250 grs. de peso, verificando, tambem 15 dias após a presença de, pelo menos de 1/30 de u. i. no sôro, por meio da reacção intra-cutanea de Kellogg. Esta reacção, para a qual se emprega uma diluição do $L\frac{+}{+}$ e não da D. M. M. (como para o Schick test), praticada em animal intermediario, de sensibilidade sempre igual, apresenta o desejado rigor, nos fornecendo indicações seguras sobre o poder antigenico, embora sómente qualitativamente, da anatoxina.

IV. EMPREGO NA PRODUCÇÃO DE ANTI-TOXINA DIPHTERICA. (1)

De posse de todos estes resultados experimentaes e enthusiasmados com os brilhantes resultados obtidos pelo illustre bactereologista do Instituto Pasteur (''), resolvemos iniciar a immunisação de cavallos, com as anatoxinas por nós preparadas, para a producção de anti-toxina diphterica.

Para confirmar seus resultados, seguimos, na pratica da immunisação, um dos protocollos indicados por G. Ramon.

Os resultados que obtivemos foram tambem os mais animadores.

Para melhor evidencial-os, transcrevemos os protocollos dos 11 animaes immunisados e faremos, por fim, um estudo comparativo dos resultados obtidos com igual numero de animaes immunisados pelo methodo que commummente usamos.

Nestes protocollos assignalamos as temperaturas dos animaes, obtidas na vespera e no dia seguinte á injecção. A dosagem do sôro foi sempre praticada segundo o methodo de Ehrlich e para concluirmos do valor anti-toxico definitivo do sôro nos guiamos pelo resultado da ultima dosagem, praticada no 10.º dia após a ultima injecção de anatoxina e quando em condições de soffrer a sangria definitiva.

Eis os protocollos das immunisações praticadas:

I — CAVALLO N. 23 { *Idade: 8 annos.* / *Procedencia: Nacional (Haras Paulista).*

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,3	37,8	370	Dosa — 1 u.
”	9	—	—	38,2	38,1	—	a. (ant. da im.)
”	10	—	—	37,5	37,6	—	
”	11	10 c. c. anatoxina 28		37,4	37,9	380	
”	12	—	—	37,0	37,8	370	
”	14	—	—	37,3	38,1	369	
”	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,3	38,1	369	dosa — 1 u. a.
”	16	—	—	38,0	37,9	—	
”	17	—	—	37,1	37,6	—	
”	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,2	38,0	369	
”	19	—	—	38,1	37,8	367	

(1) Esta parte do trabalho foi communicada á 4.ª Conferencia Sul Americana de Microbiologia e Hygiene, reunida em Buenos Aires, em Julho do corrente anno.

('') G. Ramon. Sur l'anatoxine diphterique et sur les anatoxines en general. Annales de l'Institut Pasteur, n.º 1 T. XXXIX. 1925.

(*Continuação*)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	21	—	—	38,3	37,3	365	
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,3	37,9	370	Dosa + 1 ua.
,,	23	—	—	39,0	38,6		
,,	28	—	—	37,7	37,0	—	
,,	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	38,1	356	dosa + 100 u
,,	30	—	—	38,4	38,6	—	
Fevereiro	4	—	—	37,3	37,9	357	
,,	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,3	38,0	353	dosa + 400 u
,,	6	—	—	38,3	38,3	—	
,,	9	—	—	37,6	38,0	—	
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,9	38,0	—	dosa 500 u. a.
,,	11	—	—	37,4	38,3	357	
,,	14	—	—	38,1	38,8	—	
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	38,0	38,8	356	dosa 500 u. a
,,	16	—	—	38,6	38,9	—	
,,	24	—	—	37,2	37,6	—	
,,	25	1ª sangria definitiva	5 litros	37,3	37,8	357	dosa 400 u a.

II — CAVALLO N. 29 { *Idade: 5 annos.* / *Procedencia: Nacional (Haras Paulista)*

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	38,3	37,9	360	dosa—1 u. a. (antes imm.).
,,	9	—	—	38,1	38,4	—	—
,,	10	—	—	38,0	38,1	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,9	38,0	358	—
,,	12	—	—	38,1	38,3	354	—
,,	14	—	—	39,8	38,4	349	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,9	38,3	359	dosa—1 u. a.
,,	16	—	—	38,1	37,8	—	—
,,	17	—	—	37,4	37,9	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,4	359	—
,,	19	—	—	38,1	38,5	356	—
,,	21	—	—	38,1	38,0	356	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,3	360	dosa +1 u. a.
,,	23	—	—	38,4	38,6	—	—
,,	28	—	—	37,6	38,0	—	—
,,	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,3	360	dosa + 10 u. a. e—100 u. a.
,,	30	—	—	38,1	38,6	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	38,0	350	—
,,	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,8	37,9	349	dosa 400 u. a.
,,	6	—	—	38,5	39,4	—	—
,,	9	—	—	38,0	38,7	—	—
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	38,0	38,4	362	dosa 500 u. a.
,,	11	—	—	38,3	39,5	359	—
,,	14	—	—	37,6	37,9	—	—
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,2	39,6	355	dosa + 600 u.
,,	16	—	—	39,0	39,3	—	—
,,	24	—	—	37,4	37,9	—	—
,,	25	1ªasangria definitiva	5 litros	37,6	38,4	357	dosa 700 u. a.

III — CAVALLO N. 30 { *Idade: 5 annos.* / *Procedencia: Nacional (Haras Paulista)*

ANNO 1926 Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura M.	T.	Peso kilos	Observações
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,3	37,9	360	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
,,	9	—	—	38,1	38,1	—	—
,,	10	—	—	38,0	38,1	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,6	37,9	355	—
,,	12	—	—	38,4	38,3	352	—
,,	14	—	—	37,6	38,0	345	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,0	349	Dosa—1 u. a.
,,	16	—	—	38,1	38,3	—	—
,,	17	—	—	37,8	38,0	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,3	351	—
,,	19	—	—	38,5	38,1	350	—
,,	21	—	—	37,3	37,8	349	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,0	360	Dosa—1 u. a.
,,	23	—	—	38,4	39,0	—	—
,,	28	—	—	37,3	37,4	357	—
,,	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,9	38,1	357	Dosa+10 u.. a. e — 100 ua
,,	30	—	—	38,0	38,6	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,5	37,7	354	—
,,	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,4	37,8	349	dosa 300 u. a.
,,	6	—	—	38,4	38,3	—	—
,,	9	—	—	37,6	37,9		—
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,8	37,9	362	dosa—300 ua
,,	11	—	—	38,1	38,6	350	—
,,	14	—	—	37,6	37,8	—	—
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,8	39,0	—	dosa 300 u. a.
,,	16	—	—	38,5	39,0	342	—
,,	24	—	—	37,6	37,8	—	—
,,	25	1ª sangria definitiva	5 litros	37,8	38,3	350	dosa 300 u. a.

IV — CAVALLO N. 31 { *Idade: 4 annos.* / *Procedencia: Nacional (Haras Paulista).*

ANNO 1926 Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura M.	T.	Peso kilos	Observações
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	37,8	350	Dosa—1 u. a. (ant. da im.)
,,	9	—	—	38,1	38,3	—	—
,,	10	—	—	37,8	38,0	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,6	37,8	340	—
,,	12	—	—	38,3	37,8	333	—
,,	14	—	—	38,1	38,3	333	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	37,8	340	dosa— 1 u a.
,,	16	—	—	38,2	38,2	—	—
,,	17	—	—	38,1	38,2	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,1	330	—
,,	19	—	—	38,1	38,5	333	—
,,	21	—	—	38,0	38,6	335	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,2	340	dosa+1 u. a.
,,	23	—	—	38,6	39,1	—	—

(*Continuação*)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	28	—	—	38,0	38,6	—	—
,,	29	150 cc. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	340	Dosa+100 ua.
,,	30	—	—	38,3	39,1	—	—
Fevereiro	4	—	—	38,1	37,8	337	—
,,	5	200 anatoxina 30 c. c.	Exploradora	38,1	38,8	—	dosa+800 ua
,,	6	—	—	38,7	39,3	—	—
,,	9	—	—	38,0	37,3	336	—
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	38,0	37,8	336	dosa 900 u. a.
,,	11	—	—	39,0	39,9	330	—
,,	14	—	—	38,1	38,3	—	—
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,6	38,9	—	dosa— 900 u
,,	16	—	—	38,5	38,9	347	—
,,	24	—	—	37,8	38,0		—
,,	25	1ª sangria definitiva	5 litros	37,9	38,3	330	dosa 500 u. a

V — CAVALLO N. 37 { *Idade: 5 annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	379	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
,,	8	—	—	38,3	38,0	—	—
,,	10	—	—	37,8	38,0	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,6	37,9	365	—
,,	12	—	—	37,8	37,9	358	—
,,	14	—	—	37,8	37,3	355	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,1	359	dosa—1 u. a.
,,	16	—	—	38,2	38,0	—	—
,,	17	—	—	37,9	37,8	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,4	38,4	363	—
,,	19	—	—	38,3	38,3	356	—
,,	21	—	—	37,6	38,4	359	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	38,0	38,0	367	dosa+1 u. a.
,,	23	—	—	38,1	39,3	—	—
,,	28	—	—	37,7	38,1	—	—
,,	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,3	360	dosa+ 100 u
,,	30	—	—	38,4	38,9	—	—
Fevereiro	4	—	—	38,1	37,4	360	—
,,	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,6	38,3	359	dosa 400 u, a.
,,	6	—	—	38,8	38,6	—	—
,,	9	—	—	37,9	38,8	370	—
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,7	38,0	361	dosa+ 600 u
,,	11	—	—	38,6	38,8	369	—
,,	14	—	—	37,6	37,8	—	—
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,8	39,4	—	dosa 700 u. a.
,,	16	—	—	38,2	38,1	341	—
,,	24	—	—	37,6	37,9	—	—
,,	25	1ª sangria definitiva	5 litros	37,5	38,3	350	dosa 450 u. a.

VI — CAVALLO N. 38 { *Idade: 4 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	37,8	300	Dosa— 1 u. a. (ant. da im.).
,,	9	—	—	38,2	38,3	—	—
,,	10	—	—	38,0	38,1	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,5	37,6	300	—
,,	12	—	—	37,8	37,9	300	—
,,	14	—	—	38,0	37,6		—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	37,9	290	dosa—1 u. a.
,,	16	—	—	38,1	38,3	—	—
,,	17	—	—	37,8	38,3	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,0	299	—
,,	19	—	—	37,8	38,3	305	—
,,	21	—	—	38,0	38,2	313	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,3	37,9	303	dosa—1 u. a.
,,	23	—	—	39,0	38,6	—	—
,,	28	—	—	37,6	37,8	—	—
,,	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,3	310	dosa+5 e — 100 u. a.
,,	30	—	—	38,3	38,6	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	38,4	300	—
,,	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	38,0	38,1	310	dosa—100 u a
,,	6	—	—	38,6	38,8	—	—
,,	9	—	—	37,8	37,9	—	—
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,6	37,9	309	dosa— 100 u.
,,	11	—	—	38,5	38,6	300	—
,,	14	—	—	37,6	37,8	—	—
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,8	39,0	—	dosa—100 u.
,,	16	—	—	38,4	38,5	290	—
,,	24	—	—	38,0	37,9	—	—
,,	25	—	Exploradora	37,6	38,3	299	dosa 80 u. a.

VII — CAVALLO N. 39 { *Idade: 4 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	37,9	365	Dosa—1 u. a
,,	9	—	—	37,6	37,9	365	(ant. da im.).
,,	10	—	—	37,8	38,1	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,7	38,4	—	—
,,	12	—	—	37,8	38,0	351	—
,,	14	—	—	38,1	38,4	352	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	38,3	353	—
,,	16	—	—	37,6	37,6	350	dosa—1 u. a.
,,	17	—	—	38,0	37,8	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	38,0	38,1	—	—
,,	19	—	—	37,7	38,3	350	—
,,	21	—	—	37,9	38,0	345	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	38,0	38,0	355	—
,,	23	—	—	37,6	37,6	360	dosa+1 u. a.
				38,3	38,5	—	—

(*Continuação*)

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	28	—	—	37,6	37,8	—	—
”	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,7	38,1	363	dosa +10 e — 100 u. a.
”	30	—	—	38,4	38,4	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	37,8	361	—
”	5	200 c. c. anatoxina 39	Exploradora	37,9	38,0	370	dosa 100 u. a.
”	6	—	—	38,3	38,4	—	—
”	9	—	—	37,6	37,8	360	—
”	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,6	38,0	372	dosa 300 u. a.
”	11	—	—	38,6	38,7	370	—
”	14	—	—	38,0	38,0	—	—
”	15	300 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,8	39,6	—	dosa +600 u.a.
”	16	—	—	38,5	39,1	362	—
”	24	—	—	37,8	37,9	—	—
”	25	1ª sangria definitiva	5 litros	37,8	38,6	359	Dosa 1000 u. a,

VIII — CAVALLO N. 40 { *Idade: 4 ½ annos.*
Procedencia: Nacional (Haras Paulista).

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	37,6	290	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
”	9	—	—	38,0	38,4	—	—
”	9	—	—	38,0	38,1	—	—
”	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,6	37,9	297	—
”	12	—	—	38,1	38,0	290	—
”	14	»	—	37,3	37,8	290	—
”	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	39,5	289	dosa—1 u. a.
”	16	—	—	38,0	38,5	—	—
”	17	—	—	37,5	37,8	—	
”	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,9	38,4	290	—
”	19	—	—	38,6	38,5	290	
”	21	—	—	37,6	37,6	290	—
”	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,0	290	dosa +1 u, a.
”	23	—	—	38,4	38,8	—	—
”	28	—	—	37,4	37,6	—	—
”	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,1		dosa +10 e — 100 u. a.
”	30	—	—	39,0	38,6	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	37,8	—	—
”	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	38,1	38,3	290	dosa 400 u. a.
”	6	—	—	38,6	38,1	—	—
”	9	—	—	37,5	37,6	—	—
”	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,5	38,0	272	dosa—400 u. a.
”	11	—	—	38,3	39,9	289	—
”	14	—	—	37,8	38,0	—	—
”	15	300 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	39,5	—	dosa +400 u. a.
”	16	—	—	38,8	39,3	—	—
”	24	—	—	37,6	37,7	—	—
”	25	1ª sangria definitiva	4 litros	37,4	38,2	280	dosa 500 u. a.

IX — CAVALLO N. 41 { *Idade: 5 ½ annos.* / *Procedencia: Nacional (Haras Paulista).*

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	276	Dosa—1 u. a. (ant. da im).
,,	9	—	—	38,1	38,4	—	—
,,	10	—	—	37,7	38,4	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,8	38,0	285	—
,,	12	—	—	38,0	38,2	272	—
,,	14	—	—	37,4	37,6	286	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,7	38,8	280	dosa —1u. a
,,	16	—	—	38,2	38,0	—	—
,,	17		—	37,6	38,3	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	38,8	38,8	280	—
,,	19	—	—	38,3	38,1	283	—
,,	21	—	—	38,0	37,8	282	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,4	290	dosa +1 u. a.
,,	23	—	—	38,4	38,5	—	—
,,	28	—	—	37,6	38,0	—	—
,,	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,8	38,1	294	Dosa +10 e — 100 u. a.
,,	30		—	38,0	38,4	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	38,1	287	—
,,	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,3	38,0	290	dosa 400 u. a.
,,	6	—	—	38,5	38,4	—	—
,,	9	—	—	37,4	37,6	293	—
,,	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,5	38,0	293	dosa 300 u. a.
,,	11	—	—	38,0	38,0	285	—
,,	14	—	—	37,3	37,6	280	—
,,	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,6	39,4	—	dosa 400 u. a.
,,	16	—	—	38,4	38,4	—	—
,,	24	—	—	37,6	37,8	—	—
,,	25	1ª sangria definitiva	4 litros	37,3	38,0	279	dosa 300 u. a.

X — CAVALLO N. 42 { *Idade: 3 ½ annos.* / *Procedencia: Nacional (Haras Paulista).*

ANNO 1926		INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura		Peso	Observações
Mez	Dia			M.	T.	kilos	
Janeiro	8	5 c.c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	37,8	321	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
,,	9	—	—	38,0	38,3	—	—
,,	10	—	—	37,8	37,8	—	—
,,	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,4	37,6	329	—
,,	12	—	—	38,5	37,6	312	—
,,	14	,,	—	37,6	37,9	318	—
,,	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	38,3	316	dosa—1 u. a.
,,	16	—	—	38,1	38,8	—	—
,,	17	—	—	37,9	38,0	—	—
,,	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,5	38,1	394	—
,,	19	—	—	37,6	38,1	319	—
,,	21	—	—	38,3	38,5	313	—
,,	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	37,6	319	dosa—1 u. a.
,,	23	—	—	38,1	39,1	—	—

(*Continuação*)

ANNO 1926 Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura M.	Temperatura T.	Peso kilos	Observações
Janeiro	28	—	—	38,0	38,1	—	—
”	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,4	38,0	317	dosa—1 u. a.
”	30	—	—	38,1	38,8	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,4	37,8	310	—
”	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,7	38,2	320	dosa—10 u. a.
”	6	—	—	38,4	38,7	—	—
”	9	—	—	37,4	37,6	—	—
”	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,6	38,2	327	Dosa 5 u. a.
”	11	—	—	38,1	38,5	320	—
”	14	—	—	37,6	37,8	—	—
”	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,8	39,5	—	Dosa—10 u. a.
”	16	—	—	38,6	38,5	—	—
”	24	—	—	37,5	37,8	—	—
”	25	—	Exploradora	37,8	38,1	290	Dosa 8 u. a.

XI — CAVALLO N. 43 { *Idade: 5 annos.* / *Procedencia: Nacional* (*Haras Paulista*).

ANNO 1926 Mez	Dia	INOCULAÇÃO	SANGRIA	Temperatura M.	Temperatura T.	Peso kilos	Observações
Janeiro	8	5 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,6	38,0	308	Dosa—1 u. a. (ant. da im.).
”	9	—	—	38,2	38,4	—	—
”	10	—	—	37,4	38,1	—	—
”	11	10 c. c. anatoxina 28	—	37,4	37,6	313	—
”	12	—	—	37,8	38,3	310	—
”	14	—	—	37,8	38,0	313	—
”	15	25 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,5	38,1	318	Dosa—1 u. a.
”	16	—	—	38,2	38,0	—	—
”	17	—	—	38,2	38,4	—	—
”	18	50 c. c. anatoxina 28	—	37,3	38,3	319	—
”	19	—	—	38,1	38,5	307	—
”	21	—	—	37,6	38,0	315	—
”	22	100 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,5	37,8	316	dosa —1 u. a.
”	23	—	—	38,3	38,5	—	—
”	28	—	—	38,0	37,6	—	—
”	29	150 c. c. anatoxina 28	Exploradora	37,5	38,1	320	dosa + 5 e — 100 u. a.
”	30	—	—	38,5	38,8	—	—
Fevereiro	4	—	—	37,6	38,4	314	—
”	5	200 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,9	38,0	320	dosa—100 u. a.
”	6	—	—	38,4	38,5	—	—
”	9	—	—	37,6	37,8	313	—
”	10	250 c. c. anatoxina 30	Exploradora	37,9	38,4	320	Dosa +100 ua
”	11	—	—	38,3	38,5	320	—
”	14	—	—	37,6	37,8	”	—
”	15	300 c. c. anatoxina 31	Exploradora	37,6	39,3	—	dosa 150 u. a.
”	16	—	—	38,5	38,5	—	—
”	24	—	—	37.6	37,8	—	—
”	25	—	Exploradora	37,8	38,1	390	dosa 150 u. a.

Resumindo, os resultados obtidos com a immunisação de cavallos pela anatoxina foram os seguintes:

Cavallo	N.	23	—	Idade	8	annos	—	Nacional	—	Dosou 400 u. i. por cc.
»	»	29		»	5	»		»		700 u. i. » »
»	»	30		»	5	»		»		300 u. i. » »
»	»	31		»	4	»		»		500 u. i. » »
»	»	37		»	5	»		»		450 u. i. » »
»	»	38		»	4 ½	»		»		80 u. i. » »
»	»	39		»	4 ½	»		»		1000 u. i. » »
»	»	40		»	4 ½	»		»		500 u. i. » »
»	»	41		»	5 ½	»		»		300 u. i. » »
»	»	42		»	3 ½	»		»		8 u. i. » »
»	»	43		»	5	»		»		150 u. i. » »

Este resultado corresponde a uma média de 398,9 unidades antitoxicas por c. c. de sôro.

Ainda se verifica que:

Dosam	menos de	100 u. i.	: 2	——	18,1 %
»	entre 100 e	300 u. i.	: 3	——	27,2 %
»	» 300 e	500 u. i.	: 4	——	36,3 %
»	» 500 e	800 u. i.	: 1	——	9,0 %
»	» 800 e	1000 u. i.	: 1	——	9,0 %
«	acima de	1000 u. i.	: 0	——	—

A duração da immunisação (até a ultima injecção praticada) foi de 38 dias.

A quantidade de anatoxina utilisada para cada animal foi de 1090 c. c..

A titulo de comparação indicaremos os resultados obtidos na immunisação com toxina pura, segundo um methodo baseado no de Dean, em igual numero de animaes, os ultimos tomados no serviço de soro anti-diphterico.

As inoculações segundo este methodo são feitas com intervallos variaveis, de 2 a 6 dias e pelo quadro abaixo se vê a marcha da immunisação:

Agosto	3	—	0,005	cc.	toxina	Agosto	28	—	8 » »
»	5	—	0.01	»	»	»	31	—	15 » »
»	7	—	0,02	»	»	Setembro	2	—	30 » »
»	10	—	0,05	»	»	»	4	—	50 » »
»	12	—	0,1	»	»	»	9	—	100 » »
»	14	—	0,2	»	»	»	11	—	150 » »
»	17	—	0,5	»	»	»	15	—	200 » »
»	20	—	1	»	»	»	19	—	250 » »
»	24	—	2	»	»	»	24	—	300 » »
»	26	—	4	»	»	»	29	—	350 » »
						Outubro	7	—	1ª sangria definitiva.

Os resultados obtidos no final da immunisação, isto é, após a inoculação de 300 a 400 c. c. de toxina pura, estando o animal (se a dosagem do sôro em sangria exploradora o autoriza) em condições de soffrer a sangria definitiva, foram os seguintes:

Cavallo	N.	8	— Idade	20	annos	— Nacional —	Dosou	500	u. i.	por cc.
»	»	10	»	17	»	»	»	100	u. i.	» »
Égua	»	9	»	5	»	»	»	1200	u. i.	» »
»	»	12	»	7	»	»	»	100	u. i.	» »
»	»	17	»	5	»	»	»	450	u. i.	» »
»	»	18	»	7	»	»	»	300	u. i.	» »
»	»	19	»	7	»	»	»	200	u. i.	» »
Cavallo	»	24	»	10	»	»	»	200	u. i.	» »
»	»	26	»	9	»	»	»	500	u. i.	» »
»	»	271	»	19	»	»	»	400	u. i.	» »
»	»	286	»	12	»	»	»	700	u. i.	» »

Este resultado corresponde a uma média de 422,7 unidades anti-toxicas por c. c. de sôro.

Se notará ainda que:

Dosou	menos de	100 u. i.	: 1 ——	9,0 %
»	entre 100 e	300 u. i.	: 4 ——	36,3 %
»	» 300 e	500 u. i.	: 4 ——	36,3 %
»	» 500 e	800 u. i.	: 1 ——	9,0 %
»	» 800 e	1000 u. i.	: 0 ——	—
»	mais de	1000 u. i.	: 1 ——	9,0 %

A duração da immunisação, segundo este methodo, (até a ultima injecção antes da sangria definitiva), é de 57 dias, mais ou menos. A quantidade de toxina utilisada para cada animal é de 1410 c. c., 885.

Os resultados obtidos por G. Ramon (') na immunisação pela anatoxina de 150 cavallos, mostram uma média de 500 u. i. por c. c.. A que obtivemos foi de quasi 400 u. i.. Provavelmente a porcentagem attingiria áquelle limite, assim como o obtido por Loiseau e Frasey, citados por G. Ramon, se tivessemos utilisado igual numero de animaes.

De modo que podemos dizer que os nossos resultados confirmam os destes autores e que, com a anatoxina se póde obter, tanto como com a toxina pura, a producção de anti-toxina diphterica nos serviços de sôrotherapia, de um modo relativamente simples, mais rapido e isempto de accidentes.

(') G. Ramon — Loc. cit..

VERIFICAÇÃO DOS ANIMAES BONS PRODUCTORES DE ANTI-TOXINA, METHODO DE IMMUNISAÇÃO COM ANATOXINA — TOXINA DIPHTERICA.

Num trabalho anterior (') sobre a immunisação anti-tetanica, iniciada com toxoide e continuada com toxina, logo que o animal apresentasse 1 u. i. por c. c. de sôro, mostramos que nos bons productores de anti-toxina tetanica, após 5 ou 6 injecções de toxoide, aquella proporção de anti-corpo era attingida, o que não acontece com os máus productores. Estes seriam logo afastados do serviço, evitando-se assim desperdicio de toxina, tempo, material, etc..

Estas variações só correm por conta do factor individual, differente para cada animal.

Passando os olhos sobre os resultados da immunisação com a anatoxina diphterica nos 11 cavallos assignalados, verifica-se que os que após, apenas as 4 primeiras inoculações de anatoxina (de 5, 10, 25 e 50 c. c.), apresentavam+1 u. i. por c. c. de sôro, dosaram no final da immunisação mais de 400 u. i. por c. c.: 1 (n.º 41) que teve após as 4 inoculações+1 u. i. dosou no final 300 u. i.: 1 (n.º 30) que só teve+1 u. i. após 5 doses, tambem dosou no final 300 u. i.; 2 (n.º 38 e 43) que só tiveram 1 u. i. após a 5.ª dose, dosaram no final 80 e 150 u. i., e finalmente 1 (n.º 42) que só apresentou 5 u. i. por c. c. de sôro depois da 7.ª dose, não teve, até o final da immunisação, esta proporção de anti-corpos além de 8 u. i..

Estes resultados de grande importancia pratica confirmam os que obtivemos na immunisação anti-tetanica.

Por elles se verifica a possibilidade de se prever, desde logo, apenas com 4 injecções de anatoxina, e dosagem do sôro do animal após uma sangria exploradora, os que serão bons productores de anti-toxina.

Para a confirmação destas supposições, tomamos o cavallo n.º 42, que com anatoxina não chegou a dosar 10 u. i. por c c. e praticamos sua immunisação, logo a seguir, com toxina pura.

O protocollo abaixo mostra o resultado final obtido:

DATA — 1926	INOCULAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Fevereiro 25	10 cc. toxina	
Março 3	25 » »	
» 8	50 » »	
» 13	100 » »	
» 17	150 » »	
» 23	200 » »	

(') J. Lemos Monteiro — Immunisação anti-tetanica pelo methodo toxoide-toxina. Mem. Inst. But. T. II Fasc. unico. 1925, e Comp. R. Soc. Biol. 4 T. XCII. 1925.

(*Continuação*)

DATA — 1926	INOCULAÇÕES	OBSERVAÇÕES
Março 29	250 cc. toxina	
Abril 5	300 » »	
» 12	350 » »	
» 16	400 » »	Dosa — 50 u. i.

Vê-se, pois, que um cavallo que não produza com anatoxina, uma porção consideravel de anti-toxina, não terá esta porção augmentada (ou sómente em pequena escala) com o emprego da toxina pura.

Por estas considerações e pelos resultados que temos obtido com a immunisação anti-diphterica pelo methodo baseado no de Dean, com toxina pura, julgamos de maior vantagem na producção de anti-toxina a pratica de uma immunisação mixta, com anatoxina no inicio e toxina no final.

Assim este processo se resumiria: iniciar a immunisação com anatoxina, naturalmente de poder antigenico verificado pelo methodo já indicado; após as 4 ou 5 primeiras injecções, praticar uma sangria exploradora e verificar se no sôro se contém+de 1 u. i. por c. c.. Se isto não acontecer despresar o animal para o serviço. Se o sôro contiver mais de 1 u. i. (Ehrlich) continuar a immunisação com toxina pura, já em doses maiores, visto que a proporção de anti-toxina existente na totalidade do sôro do animal, é sufficiente para evitar possiveis accidentes.

A immunisação assim é mais rapida que com a toxina pura, evitando o periodo mais delicado e demorado das primeiras doses, tendo a grande vantagem de indicar os animaes com os quaes não se perderá tempo e toxina.

Conclusões: —

I. A anatoxina pode ser empregada, com vantagem, na producção da anti-toxina diphterica, dando resultados que se approximam aos obtidos com a toxina, em menor espaço de tempo e sem o perigo de accidentes.

II. Fornece indicações mais ou menos certas, após 4 ou 5 injecções sómente, dos animaes bons e máus productores de antitoxina. Nos primeiros, após estas injecções, se encontrará no sôro+1 u. i. por c. c., o que acontecerá nos segundos, sómente após maior numero de doses.

III. E' vantajoso, por isto, adoptar-se para a immunisação, a principio a anatoxina, nas 4 ou 5 doses indicadas; se o sôro do animal, em dosagem de sangria exploradora, indicar a presença de+1 u. i. por c. c., continuar com toxina pura, já em doses maiores e que possam ser neutralizadas pela anti-toxina já formada.

V — Emprego na prophylaxia da diphteria. Vaccinação anti-diphterica.

A medicina se encontra hoje perfeitamente apparelhada na luta contra a diphteria.

Para o mal declarado dispõe do sôro anti-diphterico, cujo valor as estatisticas de todos os paizes attestam e que representa uma das maiores victorias da sôrotherapia.

Não podia, porém, contentar-se em vencer o mal declarado, era preciso prevenil-o, collocar as pessoas, as creanças principalmente, a elle susceptiveis em condições de defesa e de resistencia.

Surgiram os trabalhos tendentes a verificar os individuos susceptiveis e os naturalmente immunisados contra a diphteria (Schick, em 1913 e Kellogg em 1923). Modernamente deve se considerar esta verificação desnecessaria: toda creança em idade susceptivel á infecção diphterica, a idade pre-escolar, principalmente, deve ser vaccinada contra a diphteria.

A vaccinação anti-diphterica pode ser feita pelas misturas de toxina-antitoxina, segundo os trabalhos de Behring, Park e Zingher e outros.

Estas misturas são, conforme seus preconisadores e os que lhes vêm estudando e empregando, hyper ou hypo-neutralisadas; porém não representam, por motivos varios, e fóra do assumpto deste trabalho assignalar, o ideal que se procurava attingir.

Este ideal, no tocante á vaccinação anti-diphterica, parece ter sido attingido depois dos admiraveis estudos de Ramon, sobre a anatoxina e dos numerosos outros que delles se originaram.

Os primeiros resultados do emprego da anatoxina na prophylaxia da diphteria foram condensados no relatorio que Louis Martin apresentou á Academia de Medicina de Paris, em Abril de 1924.

Neste relatorio, estuda as memorias: 1.° Da immunidade anti-diphterica pela anatoxina, investigações clinicas e sorologicas, de Darré, Loisseau e Laffaile; 2.° Os resultados obtidos em creanças, de Roubinovitch, Loisseau e Laffaile e 3.° A vaccinação anti-diphterica no adulto, de Zoeller.

Em seu trabalho, expõe Martin, o estado actual da questão da immunidade em diphteria. A immunisação activa com toxina é perigosa, por causa das grandes variações individuaes e se obtem lentamente; a passiva é pouco duradoura; o emprego da mistura toxina-antitoxina dá resultados incertos (80 °|° ficam vaccinados e 20 °|° permanecem sensiveis), sómente com a anatoxina de Ramon não se observam estes inconvenientes, por ser inofensiva e por permittir a producção de rapida quantidade de anti-toxina.

De 130 creanças com reacção de Schick positiva, susceptiveis, pois, a diphteria e que receberam 0,5 c. c. de anatoxina, verificaram Roubinovitch, Loisseau e Laffaile que, após 15 a 30 dias, 49 estavam vaccinadas; praticando uma 2.ª injecção de anatoxina, verificaram

que 87,5 °|° ficaram vaccinadas e que, após uma 3.ª injecção, a porcentagem dos vaccinados attingiu a 98,5 °|°.

Zoeller obtem identicos resultados no adulto.

Baseado nestes resultados, Martin aconselha para o caso das collectividades (collegios, quarteis, etc.): vaccinar duas vezes os individuos ameaçados de diphteria, com 0,5 e 1 c. c. de anatoxina, com intervallo de 15 dias; praticar o Schick 15 dias após a ultima injecção, e fazer uma 3.ª dose de 1,5 c. c. de anatoxina nos ainda susceptiveis.

Aconselha ainda a vaccinação das creanças aos 2 annos de idade, quando são menos sensiveis ás proteinas, têm menor reacção e nas quaes a diphteria é sempre mais grave.

Numerosos trabalhos e estatisticas puzeram em evidencia o valor deste meio de prophylaxia da diphteria.

Martin, Loisseau e Lafaile (') pensam que para producção de uma quantidade notavel de anti-toxina após a injecção de anatoxina, são necessarias pelo menos duas doses, espeçadas de 3 semanas. A primeira injecção provoca pouca anti-toxina, mesmo si se augmenta a quantidade injectada e a segunda ficará quasi que sem influencia si se reduz o intervallo.

A immunisação pela anatoxina foi praticada pelos autores em diversas collectividades, que se pode dividir em dois grupos:

1.° — Com controle de immunisação pela prova de Schick (Institut des Sourds-Muets d'Asnières, Seine, 275 creanças de 8 a 18 annos; Préventoriun de Cantelen, Seine Inferièure, 163 creanças, depois 65 novos). No primeiro estabelecimento fizeram duas injecções de 0,5 e 1 c. c.; 21 a 29 dias após a 2.ª injecção havia 96,1 °|° de Schick negativos, 1,3 °|° de reacções fracas e 2, 6 °|° de reacções ainda positivas. No segundo estabelecimento verificaram 80 °|° de Schick negativos, 23 dias após a 2.ª injecção.

Os individuos de reacções positivas receberam uma 3.ª dose; sómente um permaneceu com a reacção positiva, o que dá 99,4 °|° de reacções negativas, num espaço de 74 dias após a 1.ª injecção. Quanto aos 65 novos a recação tornou-se negativa em 57 dias após duas injecções e nos outros 8 após trez doses.

2.° — Vaccinação num meio contaminado; parada das epidemias: a) num pequeno asylo de creanças russas, em Pegy (Seine) haviam 12 casos de diphteria em 5 mezes, sendo que 7 das creanças haviam recebido algumas semanas antes uma injecção preventiva de sôro. Nenhum caso novo depois que se praticou a immunisação pela anatoxina. b) A diphteria era endemica, desde muitos annos, em 5 communas do Pas-de-Calais. Vaccinação de 380 creanças com 3 injecções, além de outras com 1 ou 2 injecções. Depois de 18 mezes dois casos sómente occorreram em uma das communas, em creanças não vaccinadas.

Assignalam numa creança de 5 annos uma diphteria benigna

(') L. Martin, G. Loisseau et A. Laffaile — Essais d'immunisation des collectivités avec l'anatoxine diphterique. Bull. et Mem. Soc. Medic. des Hôpitaux de Paris. T. XLIX, n.° 21 — 1925.

entre a 2.ª e a 3.ª injecção. Cura rapida sem tratamento sorotherapico e sem sequellas.

Em moços de 18 a 25 annos, 56 sobre 85 apresentaram após a 1.ª injecção reacções mais ou menos vivas, porém passageiras. E' preferivel praticar-se antes a prova de Schick nos adultos e só vaccinar os de reacção positiva. Isto é dispensavel nas creanças, que apresentam menos reacções consecutivas ás injecções.

Zingher (') fez, com anatoxina preparada por G. Ramon, vaccinações em tres grandes escolas. Verificou-se o Schick negativo em 98 °|° após as 3 doses; 86,4 °|° após 2 e 60 °|° após a 1.ª dose. Com a mistura toxina-antitoxina obteve o Schick negativo em 91 °|° dos casos (3 injecções de 1 c. c. da mistura a 1/10 L ‡). As reacções locaes com a anatoxina foram ligeiras e mais accentuadas com a mistura.

Riquier e Vaillant (') , no XII.° Congresso de Hygiene, reunido em Paris, em Outubro de 1925, apresentam um trabalho em que mostram uma estatistica de 700 vaccinações em cerenças, com a anatoxina. Em 94 °|° dos casos não houve reacção ou apenas reacção local: em 4 °|° ligeira reacção febril e em 2 °|° uma reacção febril durante 24 a 48 horas. Depois das vaccinações praticadas desappareceu a diphteria endemica na localidade.

Ponce de Léon (") Praticou o Schick em 400 creanças de 0 a 12 annos, encontrando 52 °|° de reacções negativas. Nas 192 creanças que apresentaram o Schick positivo fez a 1.ª dose de 0,5 de anatoxina. 20 dias após, 42 tiveram o Schick negativo ou sejam 22 °|° de vaccinados. Nos restantes 150 praticou a 2.ª dose de 1 c. c. de anatoxina; após 20 dias 146 tiveram o Schick negativo ou sejam 98 °|° de vaccinados. Os 4 restantes que persistiam com Schick positivo, receberam a 3.ª dose de 1,5 c. c. de anatoxina e se mostraram todos vaccinados no dim de 20 a 22 dias após, havendo uma proporção de 100 °|° de vaccinados com as 3 doses.

Nasso ("'), após 2 injecções intervalladas de 20 dias, em 108 creanças, observou 90,8 °|° de immunisadas.

Zoeller aconselha dar maior espaço entre as injecções (20 dias) e verificou a persistencia de immunidade depois de 1 anno nos vaccinados; o mesmo constataram Lereboullet e Joannon.

Numerosas outras estatisticas poderiam ser assignaladas, o que é desnecessario, para demonstrar o valor deste methodo de vaccinação e prophylaxia da diphteria, perfeitamente acceitavel, sem accidentes e cuja generalisação vem se impondo cada vez mais.

(') A. Zingher — Proceedings of the Society for exp. biol. and med. pag. 462 T. XXII — 1925.

(') Riquier e Vaillant — Extr. da "Presse Médicale", n. 99, 1925, pag. 1639.

(") Ponce de Léon — Boletin del Consejo Nacional de Higiene de Montevidéo, Nov. de 1925.

("') Ivo Nasso — Tentative de immunizzazione anti-difterica com l'anatossina di Ramon — Pediatria, T. XXXIII, n. 24, 1925.

VACCINAÇÃO ANTI-DIPHTERICA EM SÃO PAULO

Em consequencia destes resultados e dos nossos estudos experimentaes, começamos a empregar na vaccinação anti-diphterica a anatoxina por nós preparada em Butantan.

Primeiramente vaccinamos os alumnos das duas escolas mixtas de Butantan e outras creanças em numero de 80, de 3 a 14 annos de idade. Praticamos geralmente duas doses, com intervallo de 20 a 30 dias. As reacções sobrevindas foram geralmente locaes, principalmente após a 1.ª dose, notando apenas reacções geraes em duas creanças, que se aprasentaram gryppadas, podendo ser a reacção febril sobrevinda devida a este estado.

Pelas verificações feitas pelo Kellogg-test em diversas creanças vaccinadas, os resultados da vaccinação foram evidentes, pelo que este methodo de vaccinação começou a ser applicado em maior escala pelo Serviço Sanitario de S. Paulo.

A principio no Centro de Saude Modelo, annexo ao Instituto de Hygiene e depois, pela Inspectoria de Prophylaxia das Doenças Infecciosas (1), nas creanças existentes nos fócos de onde eram removidos casos de diphteria.

Embora iniciado o serviço, não ha muito tempo, foram vaccinadas até agora um total de mais de 400 creanças.

Com o fim de verificar os resultados das vaccinações após as differentes doses, praticamos a reacção de Kellogg, ao em vez da prova de Schick. Nas verificações feitas neste sentido, embora não muito numerosas, constatamos que as creanças com Kellogg positivo, o apresentavam negativo, 15 a 20 dias após a 1.ª dose n'uma proporção de 60 %; após 2 doses, mais de 80 % e após as 3 doses, todos os vaccinados que foram verificados pela reacção de Kellogg se apresentaram immunisados (100 %).

Se estes dados de applicação pratica da anatoxina não podem causar impressão deante das vastas e numerosas estatistics já publicadas, em outros paizes, servirão, em todo caso, para mostrar que entre nós tambem se cuida com interesse e dedicação de todos os problemas que tem em vista o progresso da sciencia e que não despreza as suas conquistas em pról da humanidade.

CONCLUSõES GERAES

As conclusões finaes a que se pode chegar com o presente trabalho são as seguintes:

---

(1) No Centro de Saude Modelo as vaccinações estão sendo praticadas pelo Dr. Dalmacio Azevedo, e na Inspectoria de Prophylaxia, pelo Dr. Rubens Tavares.

Tendo vaccinado algumas creanças com coqueluche, o Dr. Dalmacio Azevedo verificou uma acção extremamente favoravel da anatoxina sobre este estado morbido, tendo conseguido, até agora, uma estatistica de 34 casos de melhoras accentuadas, (após 1 ou 2 injecções) e de cura definitiva em alguns.

Seja esta acção uma simples proteinotherapia, é um meio therapeutico que deve ser ensaiado, para melhores conclusões, o que já está sendo feitopor esse distincto collega.

I — Sendo a attenuação da toxina a sua transformação em anatoxina pela addicção de formalina, variavel, conforme a composição do caldo de cultura, é de conveniencia a uniformisação entre os differentes institutos da technica para o preparo do caldo para a producção de toxina.

II — A anatoxina preparada com toxina diphterica addicionada de formalina na proporção de 4 °|°° e permanencia a 37.° durante 30 a 40 dias, apresenta evidentes propriedades antigenicas.

III — Estas propriedades podem ser evidenciadas pela inoculação experimental de cobayas e verificação de sua immunidade pelo Kellogg-test.

IV — A anatoxina pode ser empregada, com vantagens, na producção de anti-toxina diphterica, podendo dar indicações sobre a sensibilidade individual, quanto a elaboração de anti-corpos, dos animaes experimentados.

V — Parece ser de maior vantagem adoptar-se para a producção de anti-toxina, um methodo mixto, com anatoxina-toxina diphterica.

VI — A anatoxina, pela sua inocuidade e rapida e persistente immunidade que determina, é de incontestavel valor na vaccinação contra a diphteria, devendo o seu emprego, na prophylaxia desta infecção, generalisar-se o mais possivel.

Butantan, Setembro de 1926.

ANATOXINE DIPHTE'RIQUE ET SA VALEUR PRATIQUE

PREPARATION, POUVOIR ANTIGÉNIQUE, EMPLOI DANS LA PRODUCTION DE L'ANTI-TOXINE ET DANS LA PROPHYLAXIE DE LA DIPHTE'RIE

PAR LE

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO

(Assistant de l'Institut).

SOMMAIRE

L'anatoxine diphtérique est appelée a jouer un rôle important dans la lutte contre la diphtérie. Dans ce travail l'auteur étudie successivement la préparation de l'anatoxine, ses propriétes antigèniques, la question du dosage et de la vérification de ce pouvoir antigènique, son emploi dans la production de l'anti-toxine oú elle lui a fourni des résultats particulièrement encourageants et enfin son usage dans la vaccination contre la diphtérie.

De cet exposé, il tire les conclusions suivantes:

1.° L'atténuation de la toxine pour sa transformation en anatoxine par l'addition de formaline est variable suivant la composition du bouillon de culture; is conviedrait donc d'uniformiser, la technique de préparation du bouillon pour la production de toxine entre les différents Instituts.

2.° L'anatoxine préparée avec la toxine diphtérique additionée de formaline dans la proportion de 4 °/°° et conservée 30 á 40 jours á 37.° possede d'évidentes propriétes antigèniques.

3.° Ces propriétés peuvent être mises en évidence par l'inoculation expérimentale aux cobayes d'une ou plusieurs doses d'anatoxine et vérification, quelque temps aprés, de la résistance de ces animaux à un certain nombre de D. M. M. ou par le dosage du serum de lapins immunisés. Pour la verification des propriétés antigéniques de l'anatoxine, l'A. indique une methode consistant dansl'inoculation d'une ou deux doses données a un cobaye et dans la verification du degré d'immunité obtenue par moyen de la reaction de Kellogg.

4.° L'anatoxine peut être employée avec avantage dans la production d'anti-toxine diphtérique, donnant des résultats assez semblables á ceux obtenus avec la toxine pure en moins de temps et sans danger. Elle permet aprés 4 ou 5 injections de connâitre les animaux bons et mauvais producteurs de toxine, le serum des premiers devant présenter aprés ce temps + 1 u. i..

5.° Il parait plus avantageux d'adopter, pour la production d'anti-toxine une méthode mixte, avec anatoxine (4 a 5 dóses jusqu'a l'apparition de + 1 u. i., verifiée par saignée exploratrice), puis toxine pure.

6.° L'anatoxine par son inocuité et l'immunité rapide et durable qu'elle détermine est d'une incontestable valeur dans la vaccination contre la diphtérie; son emploi dans la prophylaxie de cette infection doit être le plus possible généralisé.

SENSIBILIDADE E IMMUNIDADE A' DIPHTERIA. SCHICK-TEST E KELLOGG-TEST.

PELO

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO

(Assistente do Instituto)

(Com a estampa 11)

REAÇÃO DE SCHICK

Com o fim de verificar a sensibilidade de um individuo ou seu grau de immunidade em relação á diphteria, Schick (1913) estabeleceu a reacção cutanea, que recebeu o seu nome.

A reacção de Schick consiste na injecção intra-dermica de uma pequena quantidade de toxina diphterica, que provocará uma zona inflamatoria no ponto da inoculação, desde que não seja neutralizada pela anti-toxina porventura existente no organismo.

Está verificado que, se o individuo possue cerca de 1/30 de unidade anti-toxica em cada c. c. de sangue, porção capaz de lhe conferir um certo gráu de immunidade contra a infecção, a dose de toxina diluida inoculada é neutralizada e não se notará reacção local; a reacção é *negativa*. Se, pelo contrario, a proporção de antitoxina não attinge 1/30 de u. a. ou não existe de todo, a pequena porção de toxina injectada provocará uma reacção inflamatoria caracteristica, consistindo em uma area avermelhada e endurecida que se manifesta até depois de 48 horas, a reacção é *positiva*.

A diluição de toxina diphterica que se inocula e que deve ser bem activa e estabilisada é feita de tal modo que em 0,1 c. c. ou 0,2 c. c. (quantidade a ser injectada) se contenha 1/50 de D. M. M. da toxina para uma cobaya de 250,0 grs. de peso.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS. CAUSAS DE ERROS

A reacção de Schick é a prova de que se lançava, geralmente, mão afim de se verificar a susceptibilidade ou a immunidade em relação a diphteria. Sobre ella se baseavam as estatisticas para dizerem sobre a efficacia ou não dos differentes methodos de vaccinação antidiphterica e seu emprego adquiriu grande voga, principalmente nos Estados Unidos da America do Norte.

Com a multiplicação do seu emprego e consequente estudo dessa reacção, foi-se verificando as suas falhas, suas causas de erros e, por isto, a falsidade dos resultados, muitas vezes, della decorrentes.

O preparo da diluição de toxina é delicado e deve ser feita na occasião. Se fôr fornecida a diluição, esta se altera muito rapidamente de modo que, já no fim de alguns dias, não se injectará a dose que se tem em vista praticar, o que falseará o resultado.

Outros motivos de erros são as falsas reacções devidas as proteinas existentes no caldo de cultura usado para o preparo da toxina, embora estas reacções não perdurem, geralmente, depois das 48 horas.

Ainda como elementos que podem dar origem a interpretações erroneas da reacção é preciso assignalar a sensibilidade individual e a possibilidade de uma immunidade local em relação a toxina diphterica.

Recentemente, Wilfred H. Kellogg, n'um artigo publicado no American Journal of Public Health (N.º 10, Vol. XV—Oct. 1925), assignala as fontes de erros, oriundos de causas diversas, que falseiam os resultados da reacção de Schick e sua interpretação, concluindo que sua pratica deve ser abandonada.

Entre as causas de erros, o autor citado assignala os devidos a sensibilidade proteinica e que attingem a proporção de 50 °/°. As pseudo-reacções que lhe são devidas, muitas vezes perduram após ás 96 horas, da mesma fórma que as reacções verdadeiras podem desapparecer mais rapidamente.

Estuda a possibilidade de uma immunidade local, tendo verificado differenças na reacção, n'um mesmo individuo, praticando-a em zonas differentes.

Assignala ainda como causas de erro, e apparecimento tardio da reacção, muitas vezes observado, a alteração da toxina, tendo verificado differenças de reacção usando a diluição de toxina de differentes laboratorios e outras de menor importancia.

Kellogg conclue, pela desnecessidade da pratica da reacção de Schick nos individuos desde que se achem em idade de maior receptividade em relação a diphteria (abaixo de 9 annos cerca de 60 °/° são receptiveis, em menor idade esta proporção attinge a 80 °/°), os quaes devem sempre ser vaccinados, dispensando-se essa verificação anterior.

REACÇÃO DE KELLOGG

Se por qualquer motivo se desejar verificar a sensibilidade ou a immunidade em relação a diphteria, se recorrerá a methodos mais seguros, praticados no laboratorio, com animaes sensiveis, e isemptos o mais possivel de causas de erros.

Diversos são os methodos pelos quaes se pode avaliar a proporção de antitoxina existente no sôro de um individuo.

Para a verificação da immunidade ou sensibilidade em relação a diphteria é sufficiente saber se no sôro do individuo considerado existe ou não 1/30 de u. a.

Com este fim, Kellogg (The Journal of American Medical Association, N.º 11, Vol. 80—1923), estabeleceu um methodo de dosagem que denomina *intra-cutaneous guinéa-pig test*.

A reacção de Kellogg, como é geralmente conhecida, apresenta o desejavel rigor, sendo praticada no laboratorio, exigindo uma pequena quantidade de sangue do paciente (0,5 a 1 c. c.) que se obterá facilmente com uma puncção venosa ou picada do lobulo da orelha.

O methodo intra-cutaneo de Kellogg, diremos em resumo, se baseia no facto já estabelecido de que a presença no sangue de 1/30 de u. a. protege o individuo contra a infecção diphterica. E' esta a proporção, como vimos, que causa a reacção de Schick negativa.

O Kellogg-test consiste na injecção intradermica, em uma cobaya, branca de preferencia, de uma mistura em partes iguaes de sôro a se dosar e de uma diluição de toxina contendo 1/30 L ǂ por c. c. Neste caso, se o sôro contiver 1/30 de u. a., 0,1 c. c. de sôro terá 1/300 de u. a., da mesma fórma 0,1 c .c. da diluição de L ǂ terá 1/300 de L ǂ. Os 0,2 c. c. da mistura é que se injecta intracutaneamente na cobaya.

A proporção de toxina livre inoculada provocará apenas vermilhidão, sem necrose, na cobaya, se foi neutralisada em parte pela proporção correspondente de antitoxina existente no sôro, caso em que ha immunidade; a reacção é *negativa*.

Se apparecer necrose na cobaya, isto indicará que a proporção de antitoxina é menor de 1/30 de u. a., caso em que não ha immunidade; a reacção é *positiva*.

A reacção positiva se manifesta geralmente no 2.º e ás vezes no 3.º dia.

Para a pratica da reacção é necessario conhecer-se com exactidão o L ǂ da toxina que se váe empregar. Mostraremos os resultados que obtivemos com a nossa toxina padrão 7, bem estabilisada pela permanencia por mais de um anno no *frigo* e a technica da reacção de Kellogg.

O L ǂ da toxina 7, determinado com o sôro padrão americano distribuido pelo Public Health Laboratory, de Washington, para a cobaya de 250,0 grs. de peso é de 0,32 c. c.

Junta-se glycerina pura neutra para se fazer com que o volume do L ǂ determinado seja contido em 1 c. c. da mistura glycerinada.

A mistura é conservada no *frigo* e prompta para ser usada em qualquer occasião.

Para isto dilue-se 0,5 c. c. da solução glycerinada do L ǂ com 14,5 c. c. de agua physiologica.

1 c. c. da diluição terá 1/30 do L ǂ; e

0,1 c. c. da diluição terá 1/300 do L ǂ.

TECHNICA DA REACÇÃO:

Toma-se a mesma proporção de sôro a verificar e da diluição do L ǂ (0,1 ou 0,2 c. c., por exemplo).

Colloca-se em um tubo apropriado para a dosagem, mistura-se por agitação e deixa-se em contacto durante 1/2 hora, na temperatura do laboratorio.

Prepara-se a cobaya que será inoculada, arrancando os pellos

ou raspando a zona com navalha, o que não apresenta inconveniente algum para a reacção.

Inocula-se então, intradermicamente, 0,2 c. c. da mistura, com uma seringa especial, munida de uma agulha bem fina.

O resultado da reacção deve ser seguido até o terceiro e ás vezes, até o quarto dia.

No caso da reacção negativa, como já assignalamos, isto é, havendo immunidade no individuo cujo sôro se experimenta, nada de anormal se notará na zona inoculada ou apenas uma vermelhidão.

Na reacção positiva, após 24 horas e mais accentuadamente nas 48 horas e ás vezes nas 72 horas, se nota, além da vermelhidão inflamatoria, uma zona de necrose, no ponto inoculado, indicando não haver immunidade, ou melhor que não ha de todo ou ha menos de 1/30 de u. a. por c. c. de sôro que se está dosando.

As photographias juntas de um resultado negativo (cobaya 242) e positivo (cobaya 135), illustram as reacções e são bem demonstrativas.

Uma só cobaya servirá para se praticar 2 ou mais reacções dependendo das D. M. M. contidas no L † da toxina usada.

Para o caso da nossa toxina, não praticamos mais de 2 reacções em cada cobaya. Podiamos praticar até 3 reacções sem nos arriscar á morte da cobaya, porque a D. M. M. da toxina usada é de 0,0033 c. c.; o L † = 0,32 terá 96 D. M. M.

Uma dosagem terá 96 ÷ 300 = 8/25 da D. M. M.

De modo que se praticármos 3 dosagens a quantidade de toxina injectada ainda será menor que a D. M. M. para a cobaya.

O animalsinho só deverá ser usado uma vez em virtude do possivel desenvolvimento de immunidade. A cobaya não é sensivel ás proteinas da toxina, por isto não se observam pseudo-reacções.

RESULTADOS OBTIDOS COM OS DOIS METHODOS:

São poucos os estudos comparativos entre as duas reacções descriptas, demonstrando o valor de cada uma. Não pretendemos com a pequena estatistica que vamos apresentar e que por motivos independentes da nossa vontade não poude ser maior, tirar conclusões definitivas tendentes a invalidar um methodo muito adoptado.

Apenas desejamos, como já o fizemos no inicio deste trabalho, evidenciar um methodo mais seguro e rigoroso para se determinar (sempre que se quizer) a sensibilidade humana ou immunidade em relação á infecção diphterica.

Praticamos a reacção de Schick, no nosso laboratorio e, por isto, em condições excellentes quanto á dosagem e inalterabilidade da toxina usada, em 43 alumnos de diversas idades das escolas de Butantan, na maioria de 10 a 12 annos de idade.

Em apenas 2 a reacção foi caracteristicamente positiva, em 14 tidos como positivos, a reacção foi pouco evidente e com rigor não se poderia afirmar do seu resultado, nos restantes foi negativa. Ha uma porcentagem de 37, 2 °/° de positivos na totalidade dos alumnos.

Praticámos o Kellogg-test em 46 creanças de 6 a 14 annos de idade.

A reacção foi positiva em 10, dando uma proporção de 23, 9 °/°.

Os resultados assignalados mostram como numerosas causas podem ter influido para o resultado da reacção do Schick.

Ao passo que o resultado do Kellogg-test, indica com rigor a sensibilidade ou immunidade em relação á diphteria, visto que é praticado em um animal intermedario sensivel a diphteria e por não apresentar as causas de erros que darão interpretações falsas, muitas vezes desastrosas, para os fins de prophylaxia.

Butantan, Dezembro de 1925.

SENSIBILITE' ET IMMUNITE' A' LA DIPHTE'RIE. SCHICK-TEST ET KELLONG-TEST.

PAR LE

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO

(Planche 11)

SOMMAIRE

La réaction de Schick généralement employée pour vérifier la sensibilité ou l'immunité á la diphtérie présente quelques inconvénients pratiques: sensibilité protéinique individuelle, possibilité d'une immunité locale, réactions tardives, altérations et variations de la toxine etc.

La réaction de Kellogg, pratiquée dans un laboratoire est beaucoup plus rigoureuse et élimine complètement le facteur individuel; son principe est le suivant: aprés 1/2 heure de contact, on injecte dans le derme d'un cobaye un volume égal du serum á doser et d'une diluition de toxine diphtérique contenant 1/30 L † par c. c.; dans le cas de réaction négative, simple rougeur locale; dans le cas de réaction positive rougeur et nécrose locale.

Les résultats obtenus par l'Auteur en appliquant ces deux méthodes chez des enfants des écoles donna 37, 2 °/° de réactions positives chez 43 enfants, la plupart de 10 á 12 ans, avec la réaction de Shick, et 23, 9 °/° chez 46 enfants de 6 á 14 ans, avec la réaction de Kellogg.

Sans qu'il soit possible de tirer des conclusions définitives de cette petite statistique, on peut cependant avancer que la méthode de Kellogg, qui ne présente pas les mêmes causes d'erreur que celle de Schick, pour être pratiquée en animal intermédiaire, sensible á la diphtérie et ne réagissant pas aux protéines de la toxine, indique avec rigueur la sensibilité on l'immunité á la diphtérie.



Fig. 1 — Resultado negativo, após 48 horas
Résultat négatif, après 48 heures



Fig. 2 — Resultado positivo, após 48 horas
Résultat positif, après 48 heures

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS TYPOS DE MENINGOCOCCOS ENCONTRADOS NO BRASIL

PELO

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

(Assistente do Instituto)

I

Quando nos confiaram a secção de sôros anti-microbianos, no Instituto de Butantan—da qual faz parte o preparo do sôro anti-meningococcico—a nossa primeira e maior preoccupação foi a de classificar os nossos meningococcos, base da sôrotherapia anti-meningococcica moderna, por não existir sobre elles, entre nós, um estudo indicando quaes os typos predominantes no Brasil.

Tratando-se de um assumpto todo de actualidade e que já vinha sendo estudado em quasi todas as partes do mundo, apresentámos, em fins de 1922, á Sociedade de Biologia de São Paulo, um trabalho (1) feito com 34 raças de meningococcos (2). Todos esses meningococcos foram isolados do liquido cephalo-rachdiano e identificados pelos assucares.

Para a sua classificação obtivemos os seguintes sôros: do Instituto Sôrotherapico da Dinamarca, um sôro correspondendo ao typo dinamarquez A—responsavel por 95 °/° dos casos de meningococcias lá observadas; do Instituto Pasteur de Paris, sôros correspondentes aos seus quatro typos A. B. C e D; e dos "Loboratories and Research, N. Y. State Dept. Health", sôros correspondentes aos tres typos americanos I, II e III. (3).

Com o sôro dinamarquez A, nenhuma das nossas raças foi agglu-

---

(1)—*Assumpção* (*L.*) Typos de meningococcos e o problema de sôrotherapia anti-meningococcica entre nós. Primeira communicação. Brasil Medico, 1923, anno 37, vol. I, N.° 19.

(2)—Na sua maior parte esse trabalho foi feito com raças recentemente isoladas.

(3)—Estes tres typos correspondem aos typos I, II e III de Gordon, e estes, segundo estudos de M. Nicolle, Debains e Jouan, têm a seguinte correspondencia com os typos francezes A. B. C e D: o typo I de Gordon corresponde ao typo A; o typo II de Gordon corresponde ao typo B; o typo III seria um sub-typo do typo I e o typo IV de Gordon seria um sub-typo do typo II.

tinada, o que nos fez suppôr a não existencia desse typo de meningococco entre nós.

O sôro dinamarquez que recebemos não trazia indicação do seu titulo agglutinante e foi por nós usado na diluição de 1/50 para cima.

Os sôros do Instituto Pasteur de Paris vieram com indicação do seu titulo: Sôro A-1|200, sôro B-1|500, sôro C-1|500, sôro D-1|100. Estes sôros foram por nós utilisados nas seguintes diluições: o sôro A-1|100 e 1|200; o sôro B-1|100, 1|250 e 1|500; o sôro C-1|100, 1|250 e 1|500; o sôro D-1|50 e 1|100.

Desse trabalho tirámos, entre outras, as seguintes conclusões: "Os sôros agglutinantes do Instituto Pasteur de Paris, correspondentes aos typos A, B, C e D de meningococcos, só agglutinaram 51,5 °/° das 33 raças de meningococcos que experimentámos.

Os sôros C e D não agglutinaram nenhuma raça.

Podem ser classificadas nove raças como pertencendo ao typo A (27, 2 °/°) ; uma só ao typo B; 16 raças inagglutinaveis (48, 4 °/°) ; e 7 pertencendo a um typo mixto A e B (21, 7 °/°) .

Com sôros americanos correspondentes aos typos I, II e III de meningococcos existentes na America do Norte, das 34 raças que experimentámos 23 foram agglutinadas, isto é, 67, 6 °/°.

O sôro typo II não agglutinou nenhuma das nossas raças a titulo capaz de a classificar.

Corresponderam ao typo I dezeseis raças (47, 5 °/°) ; ao typo III seis raças (17, 6 °/°) ; uma só raça portou-se como typo mixto I e III e dez como inagglutinaveis (29, 4 °/°) ."

Esse primeiro contacto com os meningococcos já nos fez ver as difficuldades que teriamos de enfrentar se quizessemos levar adiante o nosso intento de estudar os meningococcos encontrados no Brasil e classifical-os.

Vimos desde logo a existencia de typos mixtos, isto é, raças agglutinando, quasi a titulo igual, com sôros de dois typos, querendo isso dizer que só por meio da absorpção das agglutiminas essas raças poderiam ser classificadas.

Vimos, e isso muito nos impressionou, que não agglutinaram com os sôros francezes 48, 4 °/°, e com os sôros americanos 29, 4 °/° das raças experimentadas. Esta nova difficuldade comportava diversas considerações: Pertenceriam essas raças inagglutinaveis a typos differentes dos sôros que recebemos? Seria a temperatura em que fizemos as agglutinações a causa de tantas raças não agglutinarem? Haveria outra qualquer causa?

Resolvemos então estudar minuciosamente o assumpto e apresentámos á Sociedade de Biologia de S. Paulo uma segunda communicação, (1) verificando: — a) se com sôros por nós preparados com os nossos meningococcoccos, confirmava-se a classificação feita com sôros diagnosticos americanos que nos deram melhores resultados; b) o auxilio que poderia trazer a classificação com absorpção das agglutininas; c) a verificação da melhor temperatura para a agglutinação de meningococcos.

---

(1) *Assumpção (L.)*. Typos de meningococcos e o problema da sôrotherapia anti-meningococcica entre nós—Segunda communicação, Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia, Vol. XV, n.° 8, 1924.

Neste segundo trabalho serviram os mesmos meningococcos do trabalho anterior e o resultado das agglutinações feitas com os sôros por nós preparados confirmou a classificação antes feita com os sôros diagnosticos americanos. As raças innagglutinaveis mostraram baixas agglutinações, algumas um pouco mais do que no trabalho anterior, e só uma dellas, o meningococco Pedr. passou a ser classificado como typo III por ter sido agglutinado por todos os sôros preparados com meningococcos do typo III. Tambem os estudos de absorpção de agglutininas, então feitos com essa raça, vieram confirmar a sua nova classificação. Atribuimos nessa occasião a algum engano havido na classificação feita no primeiro trabalho; mas adiante veremos que tal não houve.

Confirmado o nosso trabalho anterior, guardámos as raças inagglutinaveis para ulterior estudo.

Desse nosso segundo trabalho apresentámos, entre outras, as seguintes conclusões:

a) "Esta nossa segunda communicação confirma a primeira apresentada em 1923 —em que classificamos os mesmos meningococcos com sôros diagnosticos extrangeiros——usando agora sôros obtidos pela immunisação de coelhos com os nossos meningococcos".

b) "Os 32 meningococcos deste trabalho, todos isolados do liquido cephalo rachidiano, no anno de 1922, no Estado de S. Paulo, foram pela agglutinação divididos em tres grupos: um, correspondendo e sendo superponivel ao typo I americano; outro, correspondendo e sendo igualmente superponivel ao typo III, tambem americano; e um terceiro grupo, grupo "X"—puramente negativo—no qual reunimos todos os meningococcos que só apresentaram de commum o não pertencerem a nenhum dos outros typos, ou não terem sido agglutinados por nenhum dos sôros diagnosticos americanos, nem pelos sôros por nós preparados correspondendo a esses typos".

c) "Em mais de 20 immunisações de coelhos, feitas com nossos meningococcos, nunca obtivemos um anti-sôro extrictamente especifico, isto é, todos os sôros apresentaram agglutininas menores ou coagglutinas para os typos heterologos—uns mais que os outros—ao lado das agglutininas que corespondem aos recepores especificos ou agglutininas especificas".

d) "Com os sôros agglutinantes por nós preparados (em coelhos) os meningococcos mostraram-se sempre muito mais agglutinaveis a 55° em banho maria, do que a 37° na estufa".

e) "As nossas experiencias sobre a absorpção das agglutininas em nada se differençaram das de Dopter e seus collaboradores".

f) "Como antigeno para o preparo de um bom sôro anti-meningococcico, devemos levar em conta a existencia de typos de meningococcos immunologicamente distinctos, que variam de accôrdo com o lugar e ás vezes tambem de accôrdo com o momento".

II

CLASSIFICAÇÃO DE MENINGOCOCCOS ISOLADOS NO ANNO DE 1924.

Vamos apresentar agora a classificação de mais 30 meningococcos isolados no anno de 1924.

Como já tivemos occasião de dizer nos nossos trabalhos anteriores, é preciso estudar os meningococcos em diversos Estados do nosso extenso territorio, de climas tão variados, para podermos affirmar serem estes ou aquelles os typos predominantes no Brasil.

Em uma das conclusões do nosso ultimo trabalho dissémos: "Como antigeno para o preparo de um bom sôro anti-meningococcico, devemos levar em conta a existencia de typos de meningococcos, immunologicamente distinctos, *que variam de accôrdo com o lugar e ás vezes tambem de accôrdo com o momento*".

E' preciso, portanto, depois de estabelecidos os typos de meningoccos existentes em um logar, continuar a verificar todos os annos qual dos typos existentes é que está predominando. Já dissémos que em França, por exemplo, antes da grande guerra das nações, o typo predominante éra o typo A, passando a ser depois e actualmente o typo B. E foi essa a razão pela qual os sôros anti-meningoccicos de então, preparados com o meningococco typo A, não mostraram acção curativa, principalmente nas tropas inglezas em França.

Com a classificação de mais estes 30 meningococcos, todos isolados no Est. de S. Paulo, vamos confrontar os resultados com os meningococcos isolados em 1922.

Para a classificação destes meningococcos, como na occasião não dispunhamos de sôros diagnosicos extrangeiros, preparamos sôros com os meningococcos recebidos da America do Norte correspondendo aos seus tres typos, como fizemos tambem no nosso trabalho anterior. São elles os seguintes: D. W. 60 (Typo I), A. 46 B. (Typo II) e C. W. 30 B (Typo III). Por abreviação, quando nos referirmos a estes meningococcos, apenas escreveremos typo I, typo II e typo III, ou sómente I, II e III.

Damos a seguir os quadros mostrando a agglutinação desses sôros com o antigeno ou meningococco homologo, e com os outros dóis meningococcos de typos heterologos com o fim de verificar as coagglutinações.

E' indispensavel, quando se quer uzar um sôro diagnostico, fazer essa verificação, pois, o mais das vezes, o sôro só pode servir para a classificação após a absorpção das coagglutininas.

QUADRO Nº 1

Agglutinações com o sôro do coelho 52 immunisado com o meningococco D. W. 60 (Typo I).

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1000	1/1.200	1/1.400	1/1.600
Com o typo I (D. W. 60)	++	++	++	++	++	++	++	++	+	±
Com o typo II (A. 46 B.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Com o typo III (C. W. 30 B)	++	±	0	0	0	0	0	0	0	0

Agglutinações com o sôro do coelho 118, immunisado com o meningococco A. 46 B. (Typo II).

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1000	1/1.200	1/1.400	1/1.600
Com o typo I (D. W. 60)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Com o typo II (A. 46 B.)	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
Com o typo III (C. W. 30 B)	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Agglutinações com o sôro do coelho 100, immunisado com o meningococco C. W. 80 B. (Typo III).

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/1.200	1/1.400	1/1.600
Com o typo I (D. W. 60)	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0
Com o typo II (A 46 B.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Com o typo III (C. W. 30 B)	++	++	++	++	++	++	+	+	±	0

Poder-se-ia dizer que os sôros preparados com os meningococcos typos I e II servem como sôros diagnosticos por apresentarem pequena coagglutinação tanto um como outro para o typo III; mas a verificação feita em um só meningococco é insufficiente, pois, poderá o sôro não apresentar coagglutininas para esse meningococco e as apresentar para outros do mesmo typo. E isto vamos deixar demonstrado abaixo confrontando agglutinações feitas com os sôros sem absorpção e com absorpção das agglutininas.

---

(1) Os gráus de agglutinação são indicados da seguinte maneira: ++ agglutinação com grandes flócos e liquido claro; + agglutinação com flócos finos e liquido turvo; ± aggluinação fraca macroscopicamente e 0 ausencia de agglutinação.

Todas as agglutinações são acompanhadas de um tubo testemunha com emulsão e agua physiologica.

Com o sôro preparado com o meningococco typo III a coagglutinação que apresenta para o typo I é bem elevada, só podendo servir para a classificação nas mãos de quem já etseja muito habituado a estes ensaios, mas nunca dando resultados bem claros. Este sôro—mais ainda que os anteriores—deve ser usado após a absorpção das coagglutininas que apresenta principalmente para o typo I.

Feita a absorpção pelo processo indicado no nosso trabalho anterior, o resultado foi o seguinte:

QUADRO Nº 2

Agglutinações com o sôro do coelho 52, immunisado com o meningococco typo I, absorvido pelo meningococco typo III.

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/1.200	1/1.400	1/1.600
Com o typo I (D. W. 60)	++	++	++	++	++	++	+	±	0	0
Com o typo III (C. W. 30 B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Agglutinações com o sôro do coelho 100, immunisado com o meningococco typo III, absorvido pelo meningococco typo I.

	1/50	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/1.200	1/1.400	1/1.600
Com o typo I (D. W. 60)	0	0	0	0	0	0	0	0 ±	0	0
Com o typo III (C. W. 30 B)	++	++	++	++	+	+	±	0	0	0

Como vemos, os sôros typo I e III ficaram livres das coagglutininas que apresentavam, coagglutininas que foram absorvidas, conservando as agglutininas especificas, embora um pouco diminuidas em seu titulo, tal qual fôra observado no nosso trabalho anterior, quando tratámos mais detalhadamente deste assumpto.

Segue um quadro em que fazemos a classificação de 30 meningococcos isolados em 1924 com os tres sôros obtidos, usando, mesmo o sôro typo III, sem absorpção, com o fim de mostrar as coagglutinações, repetindo depois as agglutinações com os sôros absorvidos e confrontando os resultados. Este processo é mais trabalhoso e só o fazemos por não ser nosso fim unicamente a classificação de meningococcos, mas tambem o estudo destes phenomenos.

QUADRO Nº 3

Classificação de meningococcos isolados em 1924, feita com sôros por nós preparados

	Com sôro typo I (Coelho n.º 52)						Com sôro typo II (Coelho n.º 118)						Com sôro typo III (Coelho n.º 100)					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
1	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
2	++	++	++	++	++	+	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	+
5	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	+	±	0	0	0	0	++	++	+	±	±	0	++	++	±	0	0	0
7	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	++	++	+	±	0	0
8	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
9	++	++	++	+	+	+	0	0	0	0	0	0	++	++	±	0	0	0
10	++	++	+	0	0	0	++	±	0	0	0	0	++	++	++	++	+	+
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	+	+
13	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
14	++	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0	++	+	±	0	0	0
15	++	+	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0	++	++	++	++	+	+
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
19	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
20	++	++	+	+	±	0	+	+	±	0	0	0	++	++	++	++	++	+
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0
22	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
23	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	±
24	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
25	++	±	0	0	0	0	++	+	±	0	0	0	++	++	++	++	++	+
26	+	+	+	0	0	0	++	+	0	0	0	0	++	++	++	++	++	++
27	++	++	++	++	++	++	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
28	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
29	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	++	++	±	0	0	0
30	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0

Como os sôros diagnosticos usados foram de poder agglutinante mais ou menos igual, podemos desde logo apontar como classificados os meningococcos agglutinados a titulo mais elevado. E' preciso deixar affirmado aqui que se usarmos sôros de titulos muito desiguaes, os resultados podem ser completamente falhos. Assim, se por exemplo tomassemos — na classificação que acabamos de fazer— o sôro typo III com o titulo agglutinante a 1/5000, este poderia apresentar coagglutinações para o typo I a mais de 1/1000, o que corresponderia mais ou menos ao titulo do sôro diagnostico I, falseando todos os resultados.

Pela leitura do quadro n.º 3 podemos dar como classificados: como typo I os meningococcos 1, 2, 7, 9, 13, 14, 19, 30, 27, 29 e 22; como typo II, com pouca segurança poderiamos apontar o meningococco 6; como typo III, os de numeros 3, 4, 10, 12, 15, 20, 25, 26 e 23. Por serem muito pouco agglutinaveis, e ainda mais, agglutinados a titulo quasi igual pelos sôros I e III, não julgamos possivel dar como classificadas as raças 5, 8, 18, 21 e 28. As raças 11, 16 e 17 foram completamente inagglutinaveis com os tres sôros diagnosticos usados. Ainda esse quadro nos mostra que em muitos meningococcos as coagglutinações produzidas principalmente pelo sôro I foram maiores do que as observadas no quadro n.º 1, o que nos faz repetir que a verificação das coagglutininas apresentadas por um sôro deve ser feita com muitas raças.

Agora vejamos a agglutinação desses meningococcos com o sôro typo I absorvido pelo meningococco C. W. 30 (typo III), portanto, sem as coagglutininas para este typo, e com o sôro typo III absorvido pelo meningococco D. W. 60 (typo I), que lhe retirou as coagglutininas do seu typo, tudo como foi observado no quadro 2:

QUADRO Nº 4

Classificação dos mesmos meningococcos do Quadro n.º 3 pelo methodo da absorpção das agglutininas.

	Agglutinações com sóro typo I (Coelho 52), absorvido pelo meningococco typo III						Agglutinações com sôro typo III (Coelho 100), absorvido pelo meningococco typo I					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
1	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	++	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	±	0
4	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	+	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0
8	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	++	++	++	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	0	0
13	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0
14	++	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	++	++	++	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	++	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0
20	++	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	++	++	++	±	0	0
24	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	0	0
26	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	+	0
27	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0
30	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aqui, com o desapparecimento das coagglutinações, ficaram nitidamente classificados como typo I os meningococcos 1, 2, 7, 8, 9, 13, 14, 19, 20, 22, 24, 27, 29 e 30; como typo III, 3, 4, 10, 12, 15, 23, 25 e 26.

Ficou para ser resolvida a classificação do meningococco 6 que, como acabamos de ver, não foi agglutinado pelos sôros I e III após a absorpção das agglutininas, antes tendo sido fracamente agglutinado por esses sôros não absorvidos e um pouco mais agglutinado pelo sôro typo II, como vimos no quadro n.º 3. Para podermos ter mais confiança de ser esse meningococco um typo II, precisamos verificar se com o sôro typo II, absorvido pelos meningococcos I e III, livre, portanto, das coagglutininas para os meningococcos desses typos, mantem-se a agglutinação verificada no quadro n.º 3 para essa raça.

QUADRO Nº 5

Sôro typo II absolvido pelos meningococcos I e III.

	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800
6	++	+	±	0	0

Embora a titulo baixo o meningococco 6 pode, portanto, ser classificado como typo II.

Dos 30 meningococcos que estamos classificando, sete não foram agglutinados por nenhum dos tres sôros; são os seguintes: 5, 11, 16, 17, 18, 21 e 28. Estes meningococcos ficam reunidos no grupo "X" da classificação internacional (1).

(1) A Organização de Hygiene da Sociedade das Nações recommenda que a classificação de meningococcos deve ser baseada tanto quanto possivel:

a) "sobre uma divisão primaria em grupos que serão designados por numeros como, por exemplo, I, II (segundo a classificação actual dos typos de Gordon), sem prejuizo de outros grupos que poderão ser determinados":

b) "sobre uma sub-divisão dos grupos principaes em grupos secundarios ou typos; estes serão designados por letras acompanhadas do numero do grupo principal no qual elles devem ser classificados, por exemplo, Ia, IIb, etc.".

"A divisão primaria em grupos será baseada exclusivamente sobre a agglutinação. Os grupos comprehendem culturas que são agglutinadas de maneira uniforme por uma diluição a um titulo elevado de sôros monovalentes não contendo sinão poucas coagglutininas".

"A divisão secundaria em typos poderá ser baseada nos resultados das reacções de agglutinação e de absorpção praticadas com um sôro monovalente".

"As culturas cuja identificação fôr impossivel de uma maneira precisa, serão classificadas no grupo "X".

Em resumo o resultado da classificação que estamos fazendo foi a seguinte:

QUADRO Nº 6

Resultado da classificação dos 30 meningococcos isolados em 1924.

Pypo I	Typo II	Typo III	Grupo "X"
1	6	3	5
2		4	11
7		10	16
8		12	17
9		15	18
13		23	21
14		25	28
19		26	
20			
22			
24			
27			
29			
30			

Esta classificação foi feita mesmo no anno de 1924 sendo que muitos dos meningococcos eram recentemente isolados, outros conservados alguns mezes; e a razão pela qual só agora lhe damos publicidade é a seguinte: os nossos dois primeiros trabalhos foram feitos com os mesmos meningococcos mas com o intervallo entre um e outro de quasi um anno. Vimos no primeiro trabalho que o meningococco Pedr.—que tinhamos particular interesse em classificar—mostrou-se inagglutinavel com todos os sôros diagnosticos americanos (I, II e III), ao passo que no segundo trabalho, após um anno de repicagem, foi agglutinado e nitidamente classificado como typo III. Procuramos, então, conservar até agora—já faz quasi dois annos—principalmente os meningococcos do grupo "X", para verificar as mudanças que apresentassem na sua agglutinabilidade, e como vemos no quadro n.º 7 o nosso esforço não foi perdido.

QUADRO Nº 7

Nova classificação dos meningococcos do Grupo "X" feita agora (um anno e meio depois).

	Com sôro typo I						Com sôro typo II						Com sôro typo III					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
5	++	±	0	0	0	0	++	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	++	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
17	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
21	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
28	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0

Pela leitura desse quadro vê-se que os meningococcos 5, 11 e 16 passaram a ser classificados como typo II; os meningococcos 18 e 21 podem ser considerados como typo I embora não sejam muito agglutinaveis e apresentem fortes coagglutinações para o sôro III; permanecendo sem classificação as raças 17 e 28. No seu conjuncto não se mostraram ainda estes meningococcos—mesmo os classificados—muito agglutinaveis.

Para nós, houve nos resultados do quadro n.º 7 uma dupla surpresa: o apparecimento da propriedade agglutinavel desses meningococcos após um anno e meio, o que prova que esses germes recentemente isolados podem ser inagglutinaveis, como se observa com tantos outros microbios; e a classificação de tres dessas raças como typo II, typo não encontrado nos nossos dois trabalhos anteriores.

Para nos merecer inteira segurança a classificação dos meningococcos 5, 11 e 81 como typo II, preparamos com cada uma destas raças um sôro agglutinante, experimentando a sua acção sobre os meningococcos I, II e III, recebidos dos Estados Unidos e sobre todos os meningococcos classificados como typo II; é o que se ve no quadro seguinte:

QUADRO Nº 8

	Sôro preparado com o meningococco 5.						Sôro preparado com o meningococco 11.						Sôro preparado com o meningococco 16.					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
II	++	++	++	+	±	0	++	++	+	+	±	0	++	++	+	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	++	++	++	++	++	+	++	++	+	±	0	0	++	++	+	0	0	0
11	++	++	++	+	±	0	++	++	++	++	±	0	++	++	±	0	0	0
16	++	++	++	++	+	0	++	++	+	0	0	0	++	++	+	+	±	0
6	++	++	++	++	++	±	++	++	++	+	±	0	++	++	+	±	0	0

Nesse quadro só não foram agglutinados os meningococcos I (typo I) e III (typo III), sendo todos os outros agglutinados por pertencerem ao mesmo typo—typo II.

Como resultado final, portanto, temos que modificar o quadro n.º 6 pelas alterações fornecidas pelo quadro n.º 7:

QUADRO Nº 9

Resultado da classificação com as modificações do Quadro n.º 7.

Meningococcos typo I.	Meningococcos typo II.	Meningococcos typo III.	Meningococcos Grupo "X".
1	5	3	17
2	6	4	28
7	11	10	
8	16	12	
9		15	
13		23	
14		25	
18		26	
19			
20			
21			
22			
24			
27			
29			
30			

III

CLASSIFICAÇÃO FEITA AGORA DE MENINGOCOCCOS ISOLADOS NO ANNO DE 1925.

Conservámos alguns meningococcos isolados no anno passado e só agora fizemos a sua classificação, mais ou menos um anno depois do seu isolamento.

O nosso fim fazendo esta classificação após um anno de conservação, é verificar se tambem encontramos, após tantas repicagens, raças inagglutinaveis—do grupo "X"—e em que proporção.

Para a classificação desses 12 meningococcos preparamos — com os nossos meningococcos—sôros correspondentes aos typos I, II e III; e como acabamos de receber sôros diagnosticos dos "Laboratories and Research N. Y. State Dept. Health", correspondendo aos tres typos americanos I, II e III, podemos confrontar os resultados.

QUADRO Nº 10

Classificação feita agora de meningococcos isolados em 1925, com sôros preparados com os nossos meningococcos.

	Sôro typo I						Sôro typo II.						Sôro typo III.					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
31	++	++	++	++	+	±	+	±	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
32	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
33	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	+	±
34	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	±	0
35	++	++	++	++	+	+	±	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0
36	++	++	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
37	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+	±	0	0	0
39	++	++	++	+	±	0	±	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0
40	++	++	++	++	+	0	+	±	0	0	0	0	++	++	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
42	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0

QUADRO Nº 11

Classificação feita agora dos mesmos meningococcos do Quadro n.º 10, com os sôros recebidos dos "Laboratories and Research N. Y. State Dept. Health".

	Sôro typo I.						Sôro typo II.						Sôro typo III.					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
31	++	++	++	++	++	+	+	0	0	0	0	0	+	+	±	0	0	0
32	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
33	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	+	±	0
34	++	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	++	++	++	+
35	++	++	++	++	++	+	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
36	++	++	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	±	±	0	0	0	0
37	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
38	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	++	+	0	0	0
39	++	++	++	++	+	±	0	0	0	0	0	0	++	±	0	0	0	0
40	++	++	±	0	0	0	+	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
41	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
42	++	++	++	±	0	0	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0

Não houve, como se acaba de ver, discordancia nos resultados. Observam-se muitas coagglutinações, mas assim mesmo torna-se desnecessario fazer-se a absorpção das coagglutininas. Pode-se considerar classificadas: como typo I as raças 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, e 42; como typo II nenhuma; como typo III as raças 33, 34 e 38; indo para o grupo "X" a raça 41, por não poder ser classificada.

QUADRO Nº 12

Resultado da classificação dos meningococcos de 1925.

Meningococcos typo I.	Meningococcos typo II.	Meningococcos typo III.	Meningococcos Grupo "X".
31		33	41
32		34	
35		38	
36			
37			
39			
40			
42			
66,6%		23,3%	8,3%

Aqui a porcentagem de miningococcos do grupo "X" foi de 8,3 °/°; ao passo que, com os meningococcos de 1924, foi de 23,3 °/° na classificação feita com germens mais ou menos recentemente isolados. Parece-nos evidente que os germens recentemente isolados são menos agglutinaveis.

IV

CLASSIFICAÇÃO DE ALGUNS MENINGOCOCCOS RECENTEMENTE ISOLADOS NESTE ANNO (1926).

Estes meningococcos foram por nós classificados alguns dias depois de isolados, logo após a sua identificação pelos assucares.

Os sôros diagnosticos usados foram os mesmos que serviram para a classificação feita agora dos meningococcos de 1925. Eis o resultado:

QUADRO Nº 13

Classificação de meningococcos recentemente isolados, com sôros preparados com os nossos meningococcos.

	Sôro typo I						Sôro typo II						Sôro typo III					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
43	++	++	++	+	+	±	±	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	++	++	++	++	+	±	+	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
47	++	++	+	+	±	0	±	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	++	++	++	++	+	+	+	±	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	±	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0
53	++	+	±	0	0	0	+	±	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
54	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0

QUADRO Nº 14

Classificação dos mesmos meningococcos do Quadro n. 13, com sôros recebidos dos "Laboratories and Research N. Y. State Dept. Health.

	Sôro typo I						Sôro typo II						Sôro typo III					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
43	++	++	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0	+	±	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	++	++	++	++	+	+	0	0	0	0	0	0	++	+	0	0	0	0
47	++	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	±	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
49	++	++	++	++	++	++	+	±	0	0	0	0	±	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	++	++	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Como se vê nos dois quadros, apenas os meningococcos 43, 46, 47, 49 e 11 podem ser considerados como typo I. Todos os outros vão para o grupo "X", não havendo nenhum typo II, nem typo III.

QUADRO Nº 15

Resultado da classificação dos meningococcos recentemente isolados.

Meningococcos typo I	Meningococcos typo II	Meningococcos typo III	Meningococcos Grupo "X"
43			44
46			45
47			48
49			50
53			51
			52
			54
41,6%			58,3%

Foi grande a porcentagem de raças que se reuniram no grupo "X" por se mostrarem inagglutinaveis ou pouco agglutinaveis. Esperavamos uma menor agglutinabilidade dos meningococcos recentemente isolados, mas não em tal proporção.

Não ha pensar em outro motivo senão o de se tratar de meningococcos recentemente isolados o encontrar-se aqui a maior proporção de raças do grupo "X".

Em limpo tiraremos essa questão, mais uma vez, guardando esses meningococcos inagglutinaveis para os submetter daqui a um anno a nova classificação.

Teremos que preparar sôros agglutinantes com todos os meningococcos do grupo X com o fim de verificar se alguns delles formam outros typos de meningococcos além dos experimentados; só então é que deixaremos affirmado os typos de meningococcos existentes entre nós, permanecendo no grupo "X" aquelles que definitivamente não puderem ser classificados.

V

ESTUDO IMMUNOLOGICO DE UM MENINGOCOCCO DO GRUPO "X", RECENTEMENTE ISOLADO.

Ainda recentemente Kirkbride e Alice I. Hutton fizeram um estudo (1) immunologico de um meningococco atypico isolado de um caso resistindo longo tempo ao tratamento, e que se mostrou, quando recentemente isolado, inagglutinavel com os sôros monovalentes correspondendo aos typos I, II, III, e que tambem não foi aggluinado por sôros polyvalentes de cavallos immunizados com 4, 6, 20 e 60 raças. No correr de 2 annos os A. A. observaram que no fim de 6 mezes já esse meningococco era agglutinado a 1/200 com os sôros polyvalentes, passando depois a ser agglutinado a 1/500 e no fim a 1/1000 e 1/2000. Com os sôros monovalentes foi após longo tempo de conservação agglutinado a 1/200 com o sôro typo II, passando no fim a ser tambem agglutinado pelo sôro typo III ao mesmo titulo. Esse meningococco terminou ficando no grupo "X" da classificação internacional.

Quasi todos os bacteriologistas que têm feito estudo sobre os meningococcos encontraram raças que não puderam classificar, principalmente por inagglutinaveis. Alguns lançaram mão do methodo de Porges ou deste methodo modificado por Nicolle—destinados a tornar agglutinaveis germens encapsulados—mas estes methodos autolysam facilmente os meningococcos e não têm dado bons resultados, segundo alguns experimentadores.

Não temos encontrado estudos em que essas raças inagglutinaveis tivessem sido conservadas longo tempo, como fizemos, para ser verificada a possibilidade da sua classificação, ainda que tardia, a

---

(1)—"An immunological study of an atypical meningococcus strain". Mary B. Kirkbride and Alice I. Hutton—The Journal of Immunology, Vol. XI, May, 1926, N.º 5, p. 394.

não ser no que acabamos de citar, em que o meningococco estudado, apezar de se tornar agglutinavel, conservou-se no grupo "X".

Por informações recebidas do Hospital de Isolamento dos doentes de meningite, como tambem pelo longo tempo que repetidamente nos enviam alguns liquidos para exame, temos notado serem muito mais graves os casos dos quaes são isolados meningococcos que vão para o grupo "X". Estes meningococcos tambem raramente são agglutinados pelos nossos sôros polyvalentes.

Sabe-se que no tratamento da meningite cerebro espinhal deve-se empregar sôro anti-meningococcico polyvalente até ser determinado pelo laboratorio o typo de meningococco causador da affecção; derimida esta preliminar deve-se dar preferencia, se houver, ao sôro monovalente correspondente.

No Posto Bacteriologico fazemos com rapidez a identificação e classificação dos meningococcos isolados; preparamos tambem sôro anti-meningococcico polyvalente e sôros meningococcicos anti-I e anti-III, correspondendo aos typos de meningococcos mais recentemente encontrados entre nós.

Parece-nos apropositado fazer agora um ligeiro estudo immunologico de uma dessas raças recentemente isoladas que foram para o grupo "X", tomada ao accaso.

Tomamos para esse estudo o meningococco 50 e immunizamos um coelho. Experimentado o sôro deste coelho com o antigeno—meningococco 50—verificamos que este foi agglutinado a 1/1000, titulo geralmente alcançado pelos nossos sôros agglutinantes, todos commumente feitos por um methodo rapido.

Em seguida escolhemos dois meningococcos typo I (I e 49), dois typo II (6 e 16), dois typo III (III e 34) e fizemos uma agglutinação com o sôro do coelho immunizado com o meningococco 50—que tambem juntamos a este quadro—com o fim de verificar para qual dos tres typos esse sôro apresenta agglutininas. Eis o resultado:

QUADRO Nº 16

Agglutinações com o sôro agglutinante preparado com o meningococco 50, do grupo «X»

	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
50	++	++	++	++	++	+
I - typo I	0	0	0	0	0	0
49 - typo I	+	+	±	0	0	0
6 - typo II	0	0	0	0	0	0
16 - typo II	±	0	0	0	0	0
III - typo III	0	0	0	0	0	0
34 - typo III	±	0	0	0	0	0

Vê-se bem clara a forte agglutinação do sôro com o antigeno—meningococco 50—e uma agglutinação ligeiramente accentuada para o meningococco 49, typo I, mas que não nos autoriza a mostrar affinidade desse sôro para com esse typo, visto não ter sido agglutinado o meningococco I, tambem do mesmo typo. Portanto, o sôro que estamos estudando não mostrou ter agglutininas para nenhum dos tres typos de meningococcos que vimos estudando.

Vejamos agora a acção desse sôro sobre os outros meningococcos do grupo "X".

QUADRO Nº 17

Agglutinações com o sôro agglutinante preparado com o meningococco 50, do grupo «X»

	1/100	1,200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
44 - grupo "X"	±	0	0	0	0	0
45 - ,, ,,	0	0	0	0	0	0
48 - ,, ,,	0	0	0	0	0	0
51 - ,, ,,	++	±	±	0	0	0
52 - ,, ,,	0	0	0	0	0	0
54 - ,, ,,	±	0	0	0	0	0

Houve uma leve agglutinação com os meningococcos 45 e 54 e uma agglutinação um pouco mais accentuada para o 51, mas todas a um titulo longe do titulo do sôro preparado com o meningococco 50.

Outro meio que podemos lançar mão para verificar as relações do meningococco 50 com os typos de meningococcos já conhecidos—sem sahir do estudo das agglutininas—é o da absorpção das agglutininas.

O meningococco 50 não absorve agglutininas especificas dos sôros typo I, typo II e typo III, como vemos no quadro abaixo:

QUADRO Nº 18

Agglutinações com sôros absorvidos pelo meningococco 50.

Sôro typo I absorvido pelo meningococco 50.						Sôro typo II absorvido pelo meningococco 50.					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800		1/100	1/200	1/400	1/600	1/800
49 - typo I	++	++	+	+	+	6 - typo II	++	++	+	0	0

Sôro typo III absorvido pelo meningococco 50.					
	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800
34 - typo III	++	++	++	++	+

Como acabamos de ver os sôros continuaram a agglutinar as raças homologas após serem saturados ou absorvidos pelo meningococco 50.

Fazendo a absorpção do sôro preparado com o meningococco 50 pelo proprio meningococco 50—como se vê no quadro 19—foram absorvidas as agglutininas especificas, segundo a regra, e mais as fracas agglutininas apresentadas pelas raças 44, 51 e 54 que vimos no quadro 17.

QUADRO Nº 19

Agglutinações feitas com o sôro preparado com o meningococco 50, absorvido pelo proprio meningococco 50.

	1/100	1/200	1/400	1/600	1/800	1/1.000
50	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
51	±	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0

Portanto, nem indirectamente o meningococco 50 mostrou ter qualquer afinidade com os typos de meningococcos aqui estudados, sendo possivel que o mesmo se dê com as outras raças do grupo "X" recentemente isoladas se repetissimos com ellas o mesmo trabalso.

Preferimos em outra occasião, como já dissemos, apresentar um estudo detalhado destes meningococcos do grupo "X".

QUADRO Nº 20

Resumo final da classificação dos 54 meningococcos deste trabalho.

Meningococcos typo I.	Meningococcos typo II:	Meningococcos typo III.	Meningococcos Grupo "X"
1	5	3	17
2	6	4	28
7	11	10	41
8	16	12	44
9		15	45
13		23	48
14		25	50
18		26	51
19		33	52
20		34	54
21		38	
22			
24			
27			
29			
30			
31			
32			
35			
36			
37			
39			
40			
42			
43			
46			
47			
49			
53			
53,7%	7,4%	20,3%	18,5%

Os numeros por nós usados nos meningococcos são numeros de ordem.
A sua correspondencia com as indicações originaes dos liquidos cephalo rachidianos dos quaes foram por nós isolados, é a seguinte:

Do Hospital de Isolamento:

1924

1 (10)-2 (21)-3 (29)-4 (31)-5 (33)-6 (43)-7 (45)-8 (47)-9 (51)-10 (52)-11 (60)-12 (63)-13 (64)-14 (65)-15 (69)-16 (81)-17 (89)-18 (90)-19 (95)-20 (96)-21 (101)-22 (136)-23 (212)-24 (218)-30 (240).

1925

31 (377)-32 (475)-33 (512)-34 (557)-35 (624)-36 (693)-37 (741)-38 (752)-39 (754)-40 (759)-41 (800)-42 (826).

1926

43 (45)-44 (93)-45 (139)-46 (209)-47 (301)-48 (342)-49 (356)-50 (495)-51 (359)-52 (393)-53 (577)-54 (394).

---

25 isolado do liquido cephalo rachidiano de um doente do Braz
26 isolado do liquido cephalo rachidiano de um doente de Itu'
27 isolado do liquido cephalo rachidiano de um doente de Ribeirão Preto
28 isolado do liquido cephalo rachidiano de um doente de S. Manoel
29 isolado do liquido cephalo rachidiano de um doente S. C.

CONCLUSÕES

I

Dos meningococcos estudados, todos isolados do liquido cephalo rachidiano e identificados pelos assucares, 81, 4 °/° puderam ser classificados em tres typos pelos sôros diagnosticos recebidos dos "Laboratories and Research N. Y. Dept. Halth" correspondentes aos typos de meningococcos americanos I, II e III, tendo dado esta classificação o mesmo resultado com sôros diagnosticos por nós preparados e pela absorpção das agglutininas.

II

Dos 54 meningococcos deste trabalho, 53, 7 °/° foram classificados como typo I; 7, 4 °/° como typo II; 20, 3 °/° como typo III, sendo encontrados 18, 5 °/° de meningococcos que não foram agglutinados pelos sôros correspondendo a esses tres typos e que reunimos no grupo "X" da classificação internacional, conservando-os para ulterior estudo.

III

Foram encontrados muitos meningococcos inagglutinaveis quando recentemente isolados, sendo que, um anno a dois depois, alguns poderam ser claassificados pelo apparecimento de sua agglutinabilidade especifica, permanecendo outros no grupo "X", sem classificação.

Posto Bacteriologico do Instituto de Butantan, 12-7-926.

CONTRIBUTION A' L'ÉTUDE DES TYPES DE MÉNINGO-COCQUES RENCONTRÉS AU BRÉSIL

PAR LE

Dr. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

SOMMAIRE

I

Des méningocoques étudiés, tous isolés du liquide céphalo rachidien et identifiés par les sucres, 81, 4 °/° ont pu être classés en 3 types par les serums diagnostics reçus des "Laboratories and Research N. Y Dept. Health", correspondants aux types I, II et III de méningocoques américains.

II

Des 54 méningocoques de ce travail, 53, 7 °/° ont été classés dans le type I, 7, 4 °/° dans le type II, 20, 3 °/° dans le type III; 18, 5 °/° n'ont pas été agglutinés par les serums correspondants à ces 3 types, et nous les réunissons au groupe "X" de la classification internationale, les conservant pour une étude ultérieure.

III

Beaucoup de méningocoques récemment isolés n'étaient pas agglutinables; quelques uns ont pu être classés un an ou deux plus tard par suite de l'apparition de l'agglutinabilité spécifique; d'autres au contraire sont restés dans le groupe "X" sans classification.

12 Juillet, 1926.

SOBRE A ACÇÃO PHYSIOLOGICA DO VENENO DO SAPO

II. VENENO DE SAPO (BUFO MARINUS) E SECREÇÃO URINARIA.

PELO

DR. JAYME R. PEREIRA

(Assistente do Instituto)

Continuando no estudo que vimos fazendo sobre a acção physiologica do veneno do sapo (1), trataremos no presente artigo das observações por nós colhidas em experiencias recentemente praticadas e que se referem á propalada influncia deste veneno sobre a secreção urinaria (2). Conforme se verifica no trabalho de V. Brazil e J. Vellard (3), já de ha muito que é corrente entre as classes populares de alguns paizes, a crença de que o sapo contem qualquer substancia com acção favoravel sobre a diurése, tendo por isso applicação practica no combate a certos estados pathologicos com perturbações renaes acompanhadas de edemas, ascite, etc. A fricção, nestes casos, sobre a pelle com oleo no qual o sapo haja sido fervido, produz, segundo esta crença, um augmento consideravel da diurése, favorecendo assim a eliminação dos humores retidos no organismo em virtude de impermeabilidade renal. Tal supposição necessitava, por conseguinte, uma investigação experimental, que vem de ser feita e cujos resultados relataremos no presente trabalho.

Já V. Brazil e J. Vellard (3) haviam observado, no coelho, que o veneno do sapo não provocava nenhuma modificação na quantidade total de urina emittida em 24 horas. Esta observação em completa opposição á idéa popular, mais fortaleceu a exigencia de novas investigações no mesmo sentido.

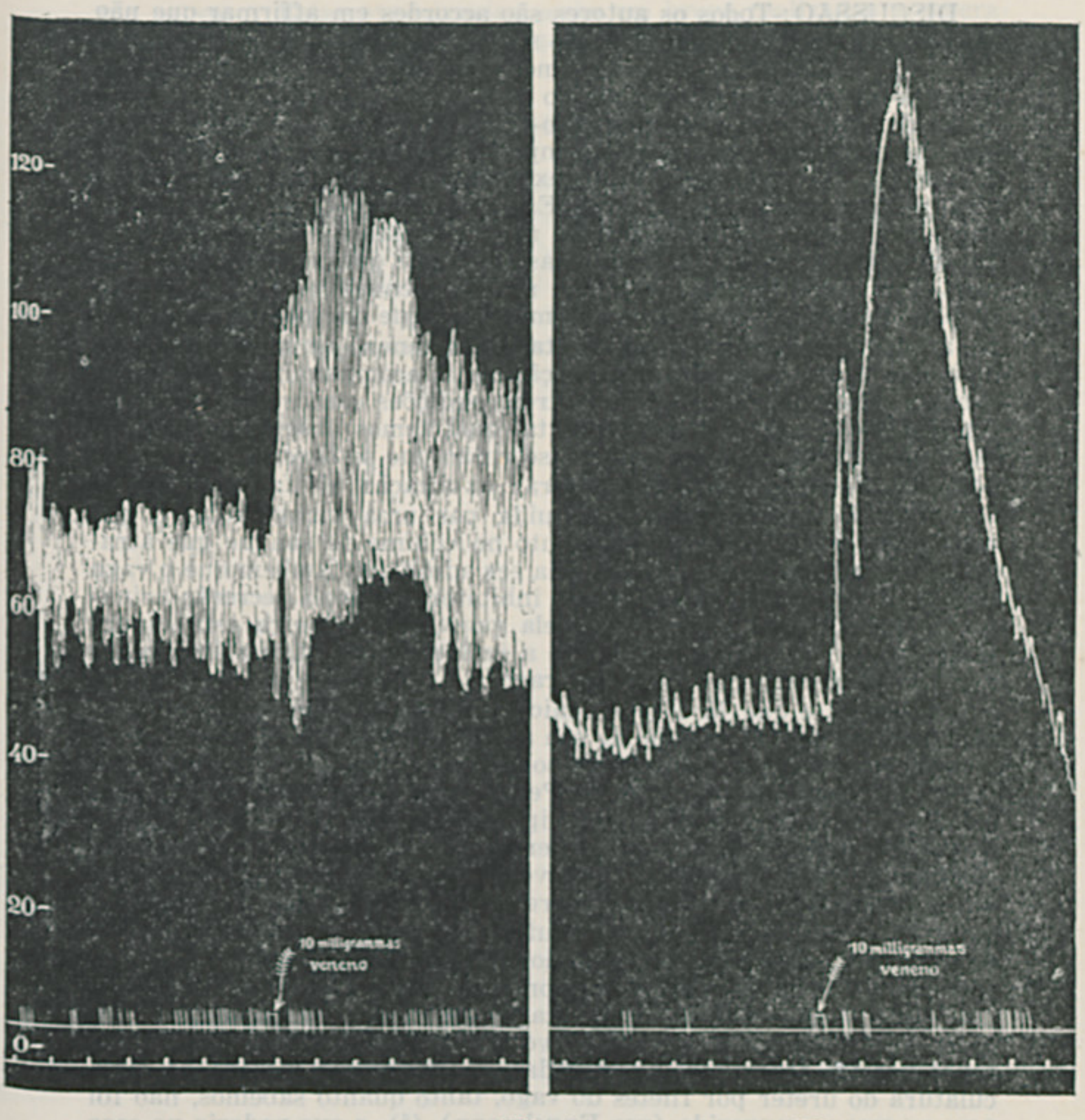


FIG. 1

METHODO EXPERIMENTAL: — O cão foi o animal usado em todas as nossas experiencias. Este, após receber uma picada sub-cutanea de morphina em dose justamente necessaria para permittir as manobras de contensão sobre a mesa operatoria e a dissecção de uma das veias saphenas externas

na qual introduzimos e fixavamos uma canula de vidro, recebia por esta veia uma dose de chloralose na proporção de O. I por kilo, o que assegurava uma narcose completa durante o tempo necessario ás experiencias em vista. A parede abdominal era então aberta em sua linha mediana (linha alba) numa extensão de cerca de 6 a 10 centimetros, a começar da symphise pubiana para a frente, e por esta abertura retiravamos a bexiga que era aberta e esvasiada do seu conteúdo e na qual introduziamos e fixavamos uma canula de vidro, cuja forma se vê representada na figura I. Bexiga e canula eram então introduzidas na cavidade abdominal e a ferida da parede suturada. Practicavamos então a introdução e fixação de uma canula arterial de vidro em uma das carotidas, para a tomada da pressão arterial e preparavamos os nervos vagos, ao nivel do pescoço, para ulterior secção. Em algumas experiencias, a urina foi collectada directamente dos uretéres, utilisando-se para isto canulas de vidro semelhantes ás empregadas na fistulisação do canal pancreatico. Além da pressão arterial, registravamos tambem no papel enfumaçado do kymographo, o numero de gottas de urina que escorriam das canulas, usando para isso um signal electro-magnetico. Depois de tomarmos por algum tempo a pressão arterial normal e o numero de gottas de urina emittida no mesmo tempo, practicavamos a injecção endo-venosa da solução do veneno, utilizando a mesma canula deixada na veia saphena externa.

RESULTADOS:—Como se verifica facilmente no traçado representado na figura 2, o veneno de sapo possúe uma acção vaso-constrictora notavel, o que aliás já haviamos assignalado em nosso trabalho anterior (1). Confirmamos agora a observação colhida por Novaro (4) sobre a maior elevação da pressão arterial após a vagotomia bi-lateral. No que diz respeito á secreção urinaria, nossas experiencias demonstraram que o veneno de sapo, ao contrario da crença popular, nenhuma influencia parece exercer sobre a diurése. As modificações que o veneno provoca para o lado do systema circulatorio, acarretam tranzitorias variações na secreção renal, visto com esta depende em grande parte não só da pressão arterial geral, como tambem e sobretudo da velocidade do sangue e por conseguinte do volume de sangue que atravessa o aparelho urinario. Na maioria de nossas observações, á injecção do veneno era seguida de uma diminuição e mesmo de uma parada completa da secreção urinaria quando os nervos vagos se achavam intactos e de um augmento quando estes nervos eram seccionados préviamente (vide fig. 2). Em uma cão (6 kilos) com os vagos intactos, emittindo 55 gotas de urina em 15 minutos, a injecção endo-venosa de 5 milligrammas de veneno provocou uma parada immediata da secreção urinaria durante mais de 20 minutos. Um outro cão (16 kilos) com os vagos cortados, emittindo 27 gottas de urina em 10 minutos, passou a urinar 92 gottas em egual periodo após a injecção endo-venosa de 10 milligrammas do veneno. Houve entretanto excepções a esta regra. Assim, por vezes, observamos a diminuição da secreção mesmo após a vagotomia bi-lateral e o augmento com a integridade dos vagos. Estas observações nos levam a crer que o veneno do sapo não exerce nenhuma acção directa sobre a actividade das cellulas renaes e as variações passageiras experimentadas



A FIG. 2 B

1.ª Linha (de baixo para cima) : pressão arterial a O mm. Hg. e tempo — 30 seg.
2.ª Linha : numero de gottas de urina.
3.ª Linha : pressão arterial.

Em A { antes da injecção do veneno : 32 gottas em 3 minutos.
depois da injecção do veneno : 27 gottas em 3 minutos.

Em B { antes da injecção do veneno : 4 gottas de urina em 3 minutos.
depois da injecção do veneno : 17 gottas de urina em 3 minutos.

Em A—vagos intactos. Em B—vagos cortados·

pela diurése após a injecção do veneno, correm por conta das modificações circulatorias que se processam no orgão renal.

DISCUSSÃO:-Todos os autores são accordes em affirmar que não existem nervos dotados de funcção secretoria sobre o aparelho urinario, sendo a influencia do systema nervoso sobre a diurése exercida atravez a innervação vaso-motora do rim. Sabe-se tambem que a secção de um dos esplancnicos produz vaso-dilatação no rim homologo (experiencias plethysmographicas) acompanhada de augmento da secreção de urina. A excitação electrica da extremidade peripherica do esplancnico provoca resultados oppostos. Estas modificações da secreção urinaria por secção ou excitação dos nervos esplancnicos dependem inquestionavelmente das reacções vaso-motoras que se processam nos rins. Por outro lado a actividade renal depende, como já dissémos, da pressão arterial geral e do volume de sangue que passa pelos rins. No animal com os nervos vagos intactos, o veneno de sapo produz, no mais das vezes, uma vaso-constricção renal acompanahada de bradycardia e bradypnéa. Todas estas trez condições concorrem para uma diminuição da secreção urinaria, tal qual temos observado em nossas experiencias. O augmento da secreção que se observa após a vagotomia bi-lateral, parece encontrar explicação no facto de que a bradycardia é neste caso substituida por uma tachycardia, o que certamente acarretará um augmento no volume de sangue que atravessa o apparelho urinario. Poderia ser admittido tambem que o vago podesse exercer alguma influencia inhibitoria sobre a secreção urinaria, influencia esta supprimida pela vagotomia. Contra esta supposição existe porem o facto de que a influencia do vago sobre as secreções (gastrica, pancreatica, tracheal), é sempre no sentido de augmental-as e que já o esplancnico que lhe deve ser opposto funccionalmente, por intermedio de sua acção tonica sobre a rêde vascular do rim, exerce acção phrenadora sobre a actividade renal. Por outro lado, as observações de Asher e Pearce (5), no gato, demonstraram que a excitação da extremidade peripherica do vago provoca o augmento da secreção urinaria,. Na observação que citamos atraz, de um cão cuja secreção urinaria se deteve totalmente após a injecção de 5 milligrammas de veneno, esta secreção só reappareceu e assim mesmo muito escassa, depois de 9 minutos após a secção dos nervos pneumogastricos. Esta observação demonstra claramente que a parada da secreção urinaria não corria por conta de uma acção inhibitoria exercida pelos vagos. Sabido é, entretanto, que a innervação do rim encerra filetes oriundos destes nervos cuja acção sobre a actividade renal precisa ainda ser investigada. A innervação motora da musculatura do uretér por filetes do vago, tanto quanto sabemos, não foi nem ao menos suggerida (ver Engelmann) (6), o que poderia no caso de ser verdadeira, explicar tambem a parada da secreção renal em virtude de uma contractura prolongada desta musculatura. A secção dos vagos, como vimos atraz, não impede a parada da secreção, o que faz afastar esta hypothese, convindo ainda lembrar que nossas observações com a drenagem da urina directamente dos uretéres são tambem contrarias a uma possivel innervação motora da musculatura do uretér pelo pneumogastrico.

Nosso juizo definitivo sobre o papel que a innervação renal póde desempenhar sobre as modificações secretorias do rim sob a influencia do veneno do sapo, só poderá ser dado, entretanto, depois de novas experiencias em que o rim esteja por completo isolado do syste-

ma nervoso. Estas experiencias serão em breve realizadas e esperamos com ellas resolver de vez o problema de que nos occupamos no presente trabalho.

REFERENCIAS:

(1) Jayme R. Pereira: Jorn. dos Clinicos. 1926, N.º 8.
(2) Swale Vincent. Introd. to the Studies of Secretion. 1924, pag. 68.
(3) V. Brazil e J. Vellard. Mem. do Inst. de Butantan. 1926, N.º 00, pag.
(4) V. Novaro. Comp. Rend. Soc. Biol. 1923, LXXXVIII, 371.
(5) Asher and Pearce. Centralb. f. Physiol. 1913, XXVII, 584.
(6) Engelman. Pfluger's Archiv. f. d. gesam. Physiol. 1869, II, 243 e IV, 33.

SUR L'ACTION PHYSIOLOGIQUE DU VENIN DE CRAPAUD

PAR LE

Dr. JAYME R. PEREIRA

II—VENIN DE CRAPAUD ET SÉCRÉTION URINAIRE.

Afin de vérifier l'observation de V. Brazil et J. Vellard d'après qui le venin de crapaud n'exercerait pas d'action sur la quantité d'urine émise en 24 heures, observation en contradiction avec les notions populaires sur ce venin, l'Auteur a réalisé une série d'expériences chez le chien: une canule spéciale était introduite dans la vessie d'animaux chloralosés, ou, dans une seconde série d'expériences, l'urine etait cueillie directement des uretères; le venin etait injecté par voie veineuse et l'on enregistrait em même temps la pression artérielle et le nombre de gouttes d'urine émises.

Résultats—Le venin exerce une action vaso constricteure notable et produit une plus forte élévation de pression après vagotomie bilatérale, mais parait sans action sur la diurèse; les variations passagères de diurèse observées généralement, diminution et même arrèt de la sécrétion urinaire quand les vagues sont intacts, et augmentation après section de ces derniers, semblent dépendre exclusivement des modifications de la circulation rénale, l'influence inhibitrice directe du vague sur la diurése paraissant peu probable.

SOBRE A ACÇÃO PHYSIOLOGICA DO VENENO DO SAPO

III—VENENO DO SAPO (BUFO MARINUS) E MUSCULO LISO

PELO

DR. JAYME R. PEREIRA

(Assistente do Instituto)

Abel e Macht (1) relataram ha tempos que a secreção venenosa do sapo (Bufo Marinus) contem adrenalina numa proporção excessivamente alta (5 °/°) e esta asserção dos autores Americanos tem sido assignalada em diversas publicações scientificas (2), (3), (4), e confirmada mesmo em trabalho original (5). Segundo se infére das citações feitas ás conclusões de Abel e Macht, estes experimentadores foram levados a admittir a existencia de adrenalina no veneno do sapo pelo facto de que o aço dos instrumentos com que a glandula parotoide do animal era cortada, tingia-se de uma coloração azul esverdeada, tal qual succede quando a mesma operação é praticada com as glandulas supra-renaes. (*).

Por outro lado as reacções de natureza chimica a que o veneno tem sido submettido, mostram, segundo os autores, uma perfeita similiaridade entre esta substancia e a adrenalina, emquanto que as provas de natureza physiologica teem dado resultados contraproducentes, indicando, por vezes, semelhança e, por vezes, disparidade absolutas. Assim, a acção do veneno do sapo sobre a pressão sanguinea é identica á da adrenalina. Ambos provocam uma elevação notavel, sobretudo após a vagotomia bi-lateral. A dilatação pupilar que a adrenalina produz no olho enucleado da rã, póde tambem ser observada com o veneno do sapo. Tal qual succede ainda com a adrenalina, a injecção sub-cutanea do veneno, acarreta, no coelho, uma glycosuria accentuada.

(*) Sómente depois de ter sido este artigo enviado para a composição, foi que tivemos ensejo de ler o trabalho original de Abel e Macht sobre o veneno do sapo (Bufo Agua), em uma separata que o primeiro desses autores teve a gentileza de nos enviar. Lendo-o, constatamos que as conclusões a que chegaram Abel e Macht dizem respeito não sómente ao estudo chimico, como tambem ao estudo pharmacodynamico practicados com o veneno. Segundo se póde deduzir de suas proprias observações, a conclusão sobre a existencia de adrenalina na secreção venenosa do sapo, foi tirada em virtude dos resultados obtidos com as provas de natureza chimica e das acções vaso-constrictora e dilatadora da pupilla exercidas pelo veneno.

O veneno do sapo, segundo Novaro (5), que é o autor das observações acima citadas, provoca entretanto uma contracção intensa da preparação isolada do intestino do coelho e da cobaia. Esta acção do veneno é completamente opposta á da adrenalina, cuja acção inhibitoria sobre aquella preparação é tão notavel que por si só é bastante para evidenciar a adrenalina em soluções infinitamente diluidas, taes como 1:400.000.000, segundo Cannon e 1:800.000.000, segundo Stewart (6).

Por outro lado, Wieland (7), estudando a acção do veneno do sapo sobre o musculo cardiaco da rã, chegou á conclusão de que este veneno não encerra adrenalina. Estas observações levaram-nos a practicar uma serie de experiencias com o veneno do sapo utilisando diversas preparações de musculo liso retiradas do intestino e do utero do coelho, da bexiga e do estomago da cobaia, do utero do rato e do estomago, intestino e cloaca do sapo.

Methodo experimental: — Sempre que usamos animaes homeothermicos, estes eram mortos por pancada forte na parte posterior da cabeça e a porção do material destinado ás experiencias era então promptamente removida e collocada em um recipiente de vidro com solução salina isotonica aquecida a 37º C. Ahi era a preparação manipulada para ulterior fixação em um bastonete de vidro dobrado em forma de L, a cujo ramo horizontal uma das extremidades da preparação era amarrada, por fio de seda, sendo a outra extremidade ligada, tambem por fio de seda, directamente ao myographo. A preparação assim fixada era então introduzida em um pequeno vaso de vidro contendo solução salina isotonica ou solução de Locke-Ringer, e este vaso mergulhado, por sua vez, em agua aquecida a 37º C. Ar era feito borbulhar

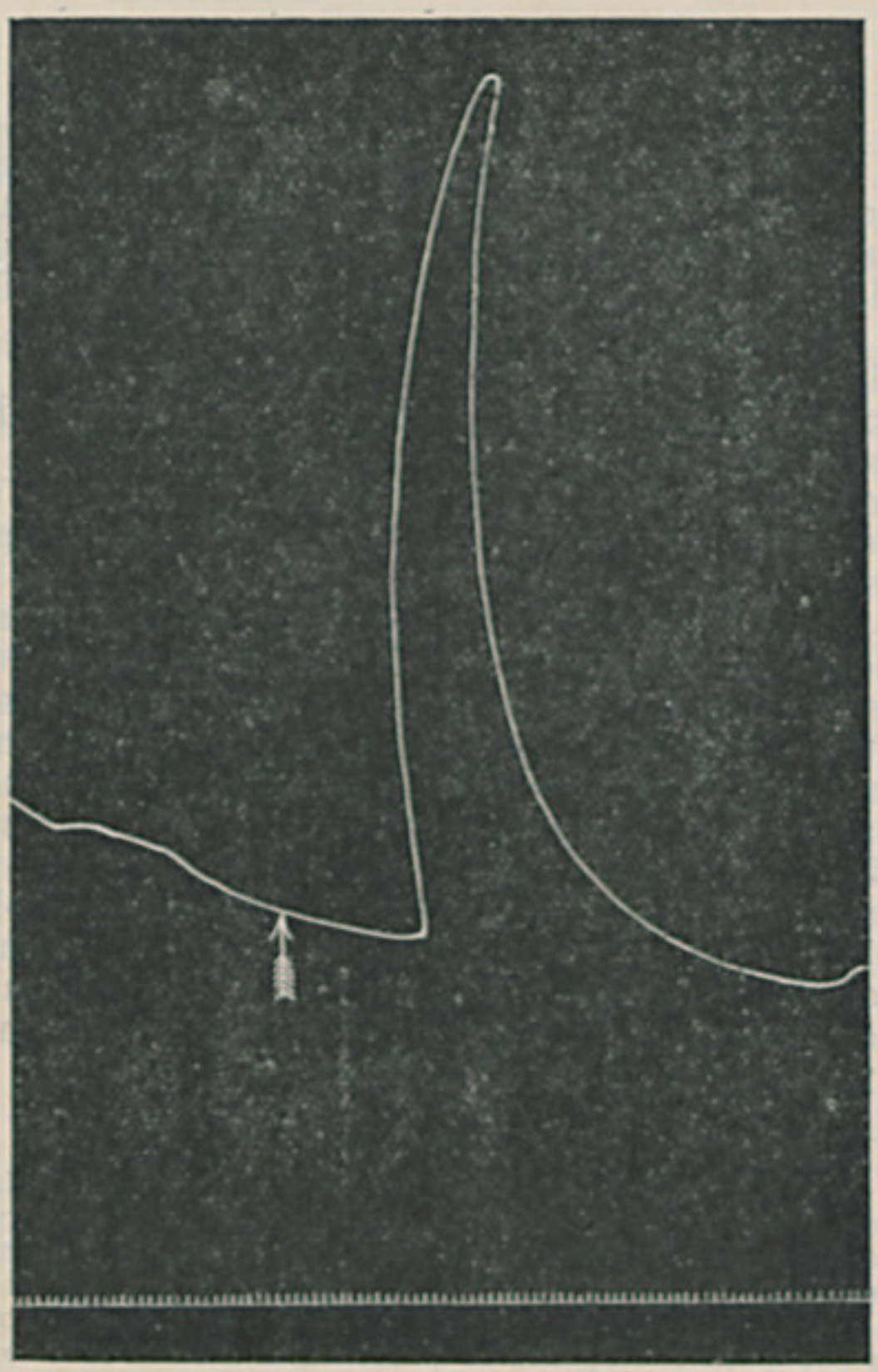


Figura 1 — Preparação de musculatura circular de estomago do sapo, immersa em 50 c.c. de solução de Ringer. No ponto indicado pela flexa 10 milligrs. de veneno (1 c.c.de 1%) foram addicionados ao banho. Tempo egual a 1 segundo.

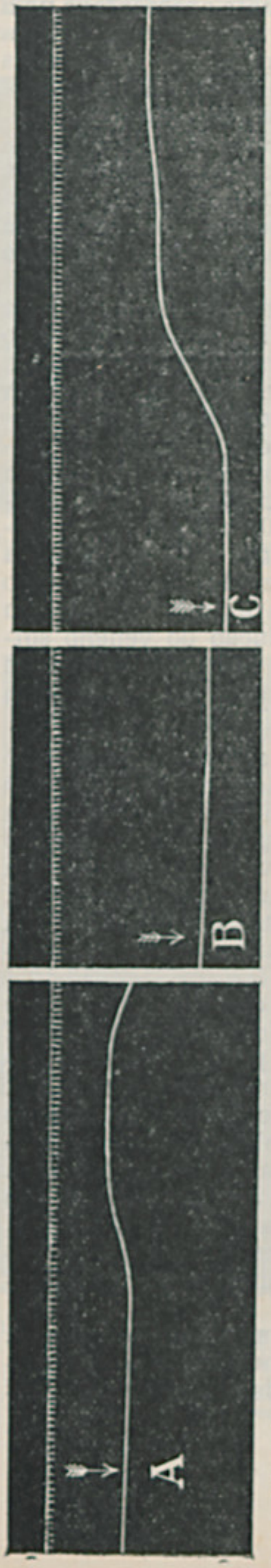


Figura 2 — Preparação de musculatura longitudinal de cloaca de sapo, immersa em 50 c.c. de solução de Ringer. Nos pontos indicados pelas flexas foram additionados: em A, 10 milligrs. de veneno (1 c.c. de sol. de 1 %); em B, 1 c.c. de solução de chlorhydrato de adrenalina (P. D' a 1:10.000); em C, 50 milligrs. de veneno (5 c.c. de 1 %). Tempo egual a 1 segundo.

atravez da solução na qual a preparação estava immersa afim de manter o meio oxygenado.

Depois de registrarmos por alguns momentos os movimentos normaes (se estes eram presentes) e o gráo de tonicidade da preparação muscular, faziamos então agir sobre esta as soluções de veneno de sapo ou de adrenalina, conforme a experiencia em vista. Em alguns casos usamos a musculatura circular do estomago e a longitudinal da cloaca do sapo.

Nestes casos o S. N. C. do animal era previamente destruido, practicando-se então a abertura da cavidade abdominal para a retirada do material necessario ás experiencias.

Nestas, o material era mergulhado em solução salina isotonica (0, 7 %) ou solução de Ringer á temperatura do laboratorio.

Resultados: — A acção do veneno do sapo sobre o musculo liso tem, na grande maioria dos casos, effeitos excitatorios. Contracções foram observadas com tcdas as preparações por nós usadas, provenientes de qualquer porção do tracto digestivo, como tambem do utero e da bexiga tanto dos animaes homeothermicos como dos de sangue frio. Na fig. 1 registramos uma contracção intensa da musculatura circular do estomago do sapo. O estomago e a bexiga da cobaia responderam sempre á acção do veneno de maneira analoga. Contracções foram egualmente obtidas com a musculatura do intestino e do utero do coelho, com o utero do rato e com a cloaca do sapo. Com esta ultima preparação tivemos occasião de observar dois factos que merecem, a nosso ver, registo especial. Um destes está exemplificado na fig. 2 na qual se vê: em A, uma contracção provocada pelo veneno; em B, a acção inefficaz da adrenalina e em C, nova contracção produzida pelo veneno. Neste caso, pois, o veneno provocou contracção mesmo após a acção, embora inefficaz, da adrenalina. Uma outra preparação da cloaca do sapo que normalmente apresentava contracções rhythmicas, respondeu á acção do veneno por uma maior contracção seguida de relaxamento pronunciado do tonus

Fig. 3. Semelhante resultado foi tambem observado com uma preparação de duodeno de coelho. Esta que antes da applicação apresentava uma actividade rhythmica accentuada, respondeu ao veneno com um relaxamento completo do tonus e parada das contracções rhythmicas (Fig. 4). Uma outra preparação de duodeno do mesmo animal, suspensa algum tempo depois da experiencia precedente, que não apresentava movimento algum e inteiramente relaxada, respondeu á mesma dóse de veneno com uma contracção pronunciada. A acção de uma forte dóse de veneno (100 milligrs.) sobre uma preparação de duodeno de sapo que se contrahia rhythmicamente, apenas provocou um reforço das contracções rhythmicas. Sobre esta mesma preparação a applicação de uma dose de adrenalina (1 c. c. de sol. a 1 °/∞), produziu uma quéda consideravel do tonus e diminuição na amplitude das contracçoes rhythmicas. A fig. 5 exemplifica uma observação digna de destaque: uma metade de utero de rato que apresentava normalmente contracções rhythmicas bem pronunciadas, reagiu a uma dóse de 25 milligrs. de veneno com uma contracção extraordinariamente elevada. Logo após, a addição de 1 c. c. de sol. millesimal de adrenalina provocou phenomeno opposto. Suspensa a outra metade do utero, esta mostrou-se inteiramente inerte (Fig. 6), reagindo por uma contracção intensa á dóse de 50 milligrs. de veneno (A). A solução de veneno empregada nesta ultima esperiencia havia sido preparada 8 mezes antes, tendo sido conservada durante todo este tempo em um balão de vidro transparente e fechado com um tampão de algodão, permittindo assim que a solução do veneno soffresse a acção da luz e do ar. Em (B), mais 50 milligrs. de veneno fresco (solução preparada no dia da experiencia) produziram nova contracção e aparecimento de actividade rhythmica.

Discussão:—Quando resolvemos estudar a acção do veneno do sapo sobre o musculo liso, tinhamos em mente tentar por este meio resolver, o problema da existencia ou não de adrenalina nesta substancia venenosa. As provas de natureza physiologica (muito mais sensiveis do que as de natureza chimica) invocadas em favor da primeira daquellas hypotheses, não me pareceram sufficientes. A acção vaso-constrictora do veneno de modo algum pode ser tomada como conclusiva, visto como esta acção é commum a um grande numero de substancias.

Por outro lado, a dilatação pupillar do olho enucleado da rã sob a influencia do veneno do sapo, poderia, quando muito, levantar a suspeita da existencia da adrenalina, mas nunca provar esta existencia. Contra o valor desta prova já se levantaram Commessatti (8), que mostrou ser esta dilatação tambem observavel com o chloreto de sodio e Waterman (9), que observou o mesmo phenomeno usando a urina e o sôro sanguineo. Com relação á glycosuria provocada pela injecção sub-cutanea do veneno, podemos tambem acrescentar que não somente a adrenalina, mas tambem muitas substancias como o ether, o chloroformio, a quinina, a picrotoxina, o curare, a morphina e outras mais possuem acção semelhante quando administrada pela mesma via.

Stewart recommenda para a pesquiza da adrenalina em uma solução qualquer, usar-se duas preparações de musculo liso que respondam differentemente á acção da adrenalina, isto é, uma por contracção e outra por inhibição.

O veneno do sapo agindo sobre a musculatura intestinal tem dado resultados oppostos, provocando ora contracção e ora relaxamento.

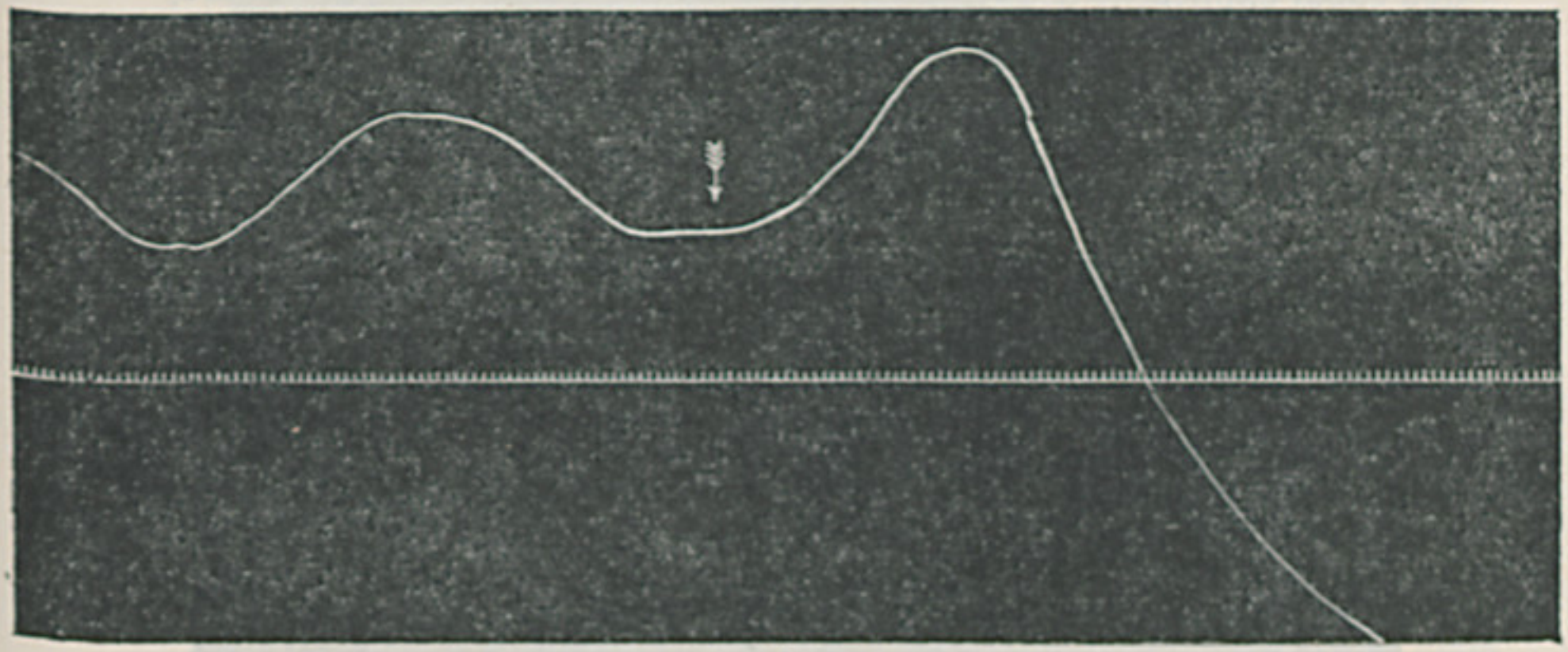


Figura 3 — Preparação de musculatura longitudinal de cloaca de sapo, immersa em 50 c.c. de solução de Ringer. No ponto indicado pela flexa 10 milligrs. de veneno (10 c.c. de 1 %) foram addicionados ao banho. Tempo egual a 1 segundo.

O utero do coelho responde sempre por contracção (como alliás acontece com a adrenalina) e o utero do rato que é inhibido pela adrenalina, mostra-se activado pelo veneno do sapo. De um modo geral e de accordo com as nossas experiencias, pode-se admittir que o veneno do sapo tem acção excitatoria sobre o musculo liso. Para corroborar esta affirmativa ha ainda o facto bastante significativo de que a injecção endo-venosa de uma solução de veneno, no cão, provoca exagerado peristaltismo, em completa opposição ao que succede com uma injecção endo-venosa de adrenalina.

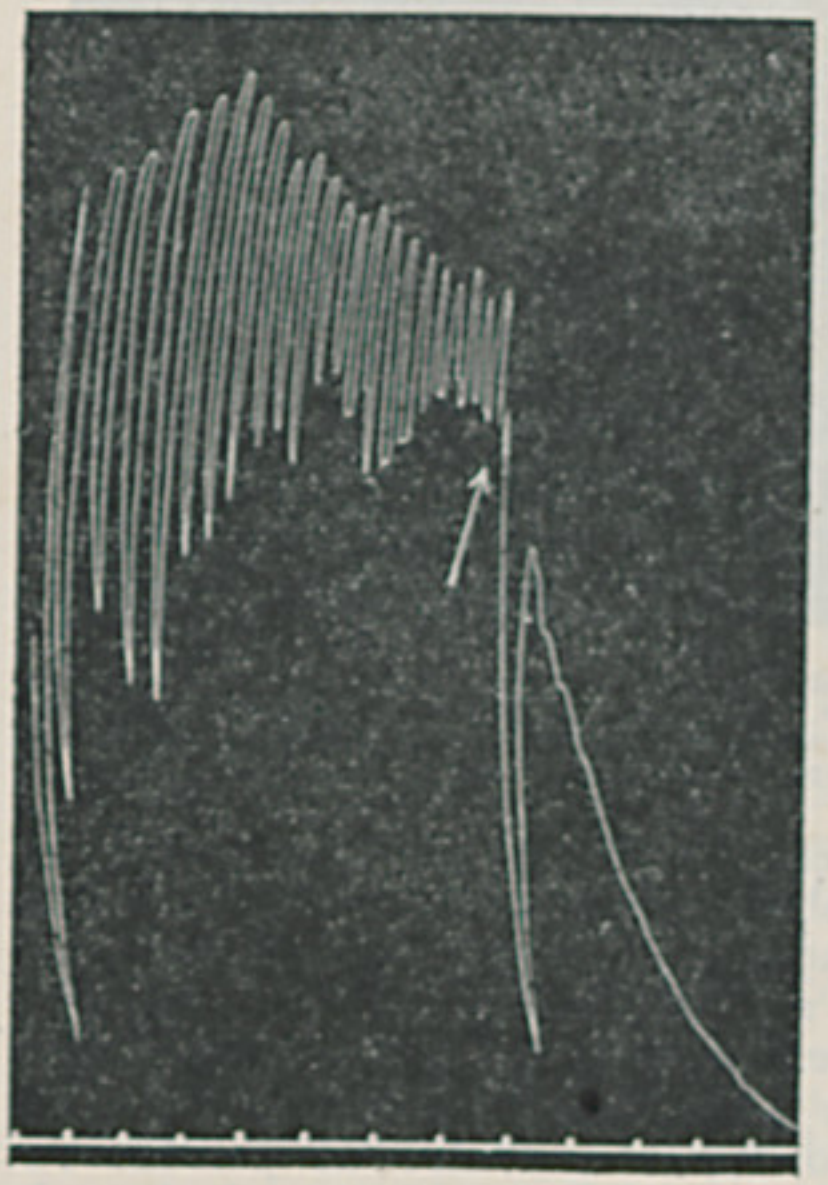


Figura 4 — Preparação de musculatura longitudinal de duodeno de coelho, immersa em 50 c.c. de solução de Ringer-Locke. No ponto indicado pela flexa 100 milligrs. de veneno (10 c.c. de %) foram addicionados ao banho. Tempo egual a 30 segundos.

Como relatamos no capitulo anterior, tivemos occasião de observar, por vezes, uma acção sympathicomimetica do veneno do sapo. Uma preparação de cloaca do sapo e outra de duodeno do coelho responderam á acção do veneno por uma inhibição pronunciada do tonus e das contracções rhythmicas. Não seria difficil interpretar estes resultados, quando se sabe que uma

excitação feita com uma frequencia excessivamente alta, póde produzir a inhibição do elemento contractil da fibra muscular (10), (11) e (12). Veach baseado em suas observações sobre a inervação do musculo liso, deu cabal explicação aos resultados obtidos por Carlson, Boyd e Pearcy que observaram inhibição e contracção do cardia por excitação do nervo vago, quando aquella preparação se achava em estado de tonus ou de relaxamento, respectivamente (Inhibição de Wedenski). Se o cardia já se achava hypertonico, a excitação do vago, augmentando o numero de impulsos excitatorios já existentes, produzia relaxamento.

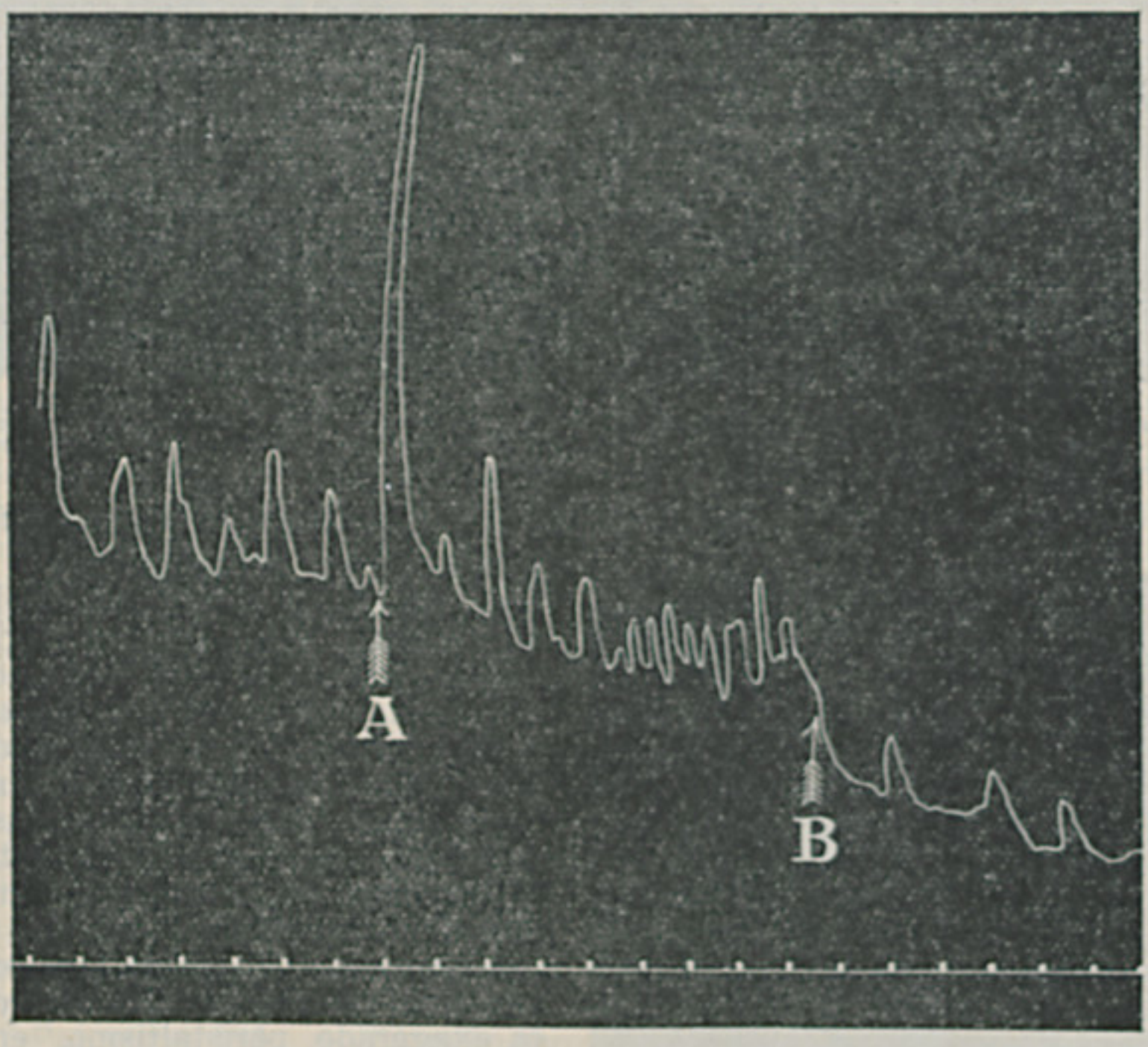


Figura 5 — Preparação de utero de rato (metade longitudinal do utero e respectivo corno uterino) immersa em 50 c.c. de solução de Ringer-Locke. Nos pontos indicados pelas flexas foram addicionados: em A, 25 milligrs. de veneno (2.5 c.c. de 1 %) e em B, 1 c.c. de solução millesimal de chlorhydrato de adrenalina (P. D.). Tempo egual a 30 segundos.

Não nos parece ter outra explicação os factos por nós observados. Os unicos casos de inhibição que observamos com o veneno do sapo, foram aquelles em que as preparações musculares se apresentavam hypertonicas. Nestes casos, pois, a addição de um agente chimico excitador, como nos parece ser o veneno do sapo, apenas augmenta o numero de impulsos que chegam ao elemento conductor de fibra muscular, de forma que cada impulso caminha dentro do periodo refractario deixado pelo impulso precedente, tornando-se por isso de valor excitatorio abaixo do limiar e por conseguinte insufficiente para pôr em actividade o elemento contractil da fibra. Se o tonus inicial da preparação é baixo, o veneno do sapo provoca sempre a sua ele-

vação e mesmo o apparecimento de contracções rhythmicas, se estas já não estavam presentes . (Ver fig. 6, B) .

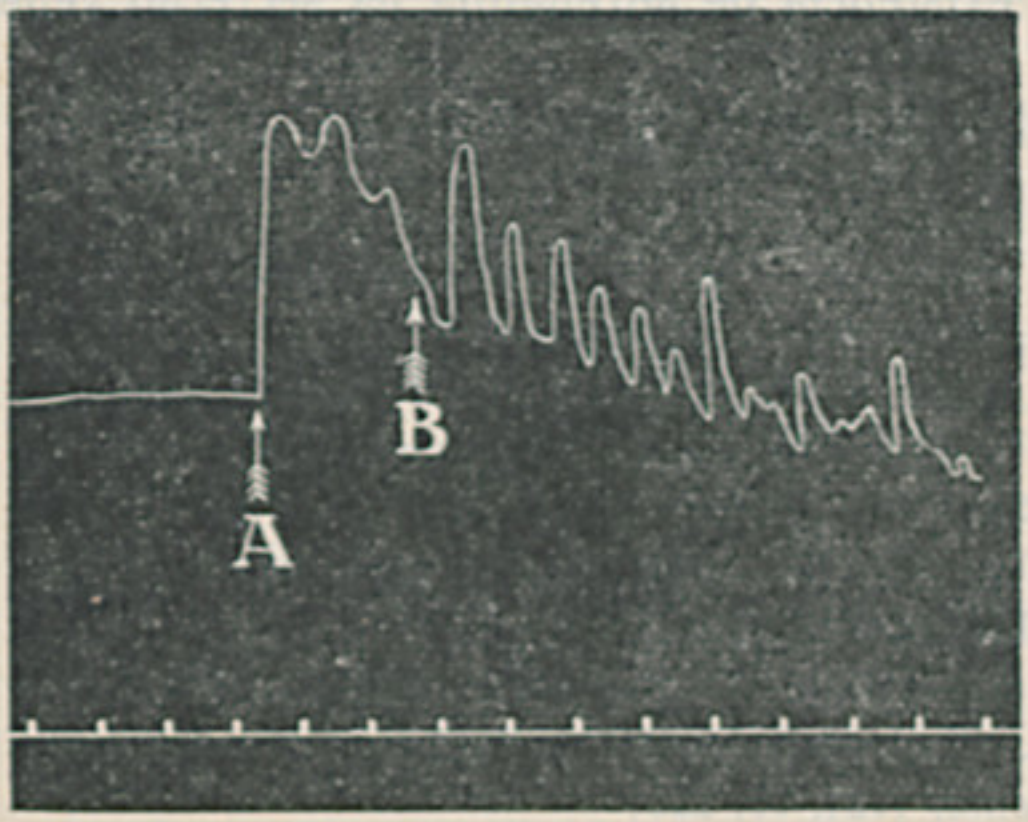


Figura 6 — Preparação de utero de rato (metade longitudinal do utero e respectivo corno uterino) immersa em 50 c.c. de solução de Ringer-Locke. Mesmo animal de Figura 5. Nos pontos indicados pelas flexas, foram addicionados: em A, 50 milligrs. de veneno (5 c.c. de uma solução a 1%, preparada 8 mezes antes) e em B, 50 milligrs. de veneno (5 c.c. de uma solução a 1%, preparada no dia da experiencia).

Assumindo como verdadeira a conclusão de Abel e Macht de que o veneno do sapo contém nunca menos de 5 % (podendo attingir a 6, 72 %) de adrenalina, e tendo nós usado em nossas experiencias soluções de veneno cujos titulos variaram entre 1:500 á 1:5.000, podemos admittir que as nossas soluções de veneno correspondiam a soluções de adrenalina em concentrações de 1:10.000 a 1:100.000. Gruber ([13]), que mais extensivamente estudou a acção da adrenalina sobre a musculatura do tracto digestivo da rã, concluiu que «as soluções fracas de adrenalina augmentam o tonus e em alguns cas s o numero e a força das contracções de ambas as camadas musculares do estomago, do intesino delgado, do recto e da cloaca da rã. As soluções fortes produzem relaxamento de todos estes orgãos". Nas suas experiencias, Gruber usou soluções de titulos variando entre 1:100.000 a 1:1.000.000.000, sendo que em poucos casos a solução attingiu ás proporçoes baixas de 1:10.000 e 1:1000. As soluções usadas em nossas experiencias (1:10.000 a 1:100.000) correspondem portanto as soluções fortes de Gruber e desta maneira ellas deveriam provocar a inhibição das preparações musculares do tracto digestivo do sapo, assumindo uma possivel similiaridade funccional do tracto digestivo deste animal com o da rã-sapo (Bull frog) usada por Gruber. Tal porém não succede. Não levando em conta os casos excepcionaes em que o veneno produziu effeitos inhibitorios e que podem ser perfeitamente explicados de accôrdo com o phenomeno inhibitorio de Wedenski, o veneno sempre se mostrou excitatorio, razão porque duvidamos da conclusão dos autores que acreditam existir adrenalina na secreção venenosa do sapo.

CONCLUSõES:

1. A secreção venenosa do sapo (Bufo Marinus) tem acção excitatoria sobre a musculatura lisa do tracto digestivo do coelho e do sapo, do utero do coelho e do rato, da bexiga e do estomago da cobaia.

2. Em alguns casos, quando o tonus da preparação muscular é normalmente elevado, o veneno do sapo póde provocar a sua inhibição, por um phenomeno identico ao da inhibição de Wendenski.

3. Os resultados obtidos com aquellas diversas preparações de musculo liso, não supportam as conclusoes a que chegaram Abel e Macht e Novaro sobre a existencia de adrenalina na secreção venenosa do sapo.

REFERENCIAS:

(1) Abel and Macht: Jour. of Pharmac. and Exp. Therap. 1911, 3, 319.
(2) Stewart: A Manual of Physiology. 1918, pag. 635.
(3) Swale Vincent: Introd. to the Study of Secretion. 1924, pag. 67.
(4) Bayliss: Principles of General Physiology. 1925, pag. 733.
(5) Novaro: Comp. Rend. Soc. Biol. 1923, 88, 371.
(6) Cit. por Sharpey-Schafer: The Endocrine Organs. 1924, pag. 152.
(7) Wieland: Bioch. Zeitschirift. 1921, 127.
(8) Commessati: Arch. f. Exp. Path. u. Pharmak. 1909, 60, 233.
(9) Waterman: Deut. Med. Wochensch. 1908, 34, 1102.
(10) Veach and Pereira: Science, 1924, 60, 225.
(11) Pereira: Jour. de Physiol. et Pathol. Gen. 1925, 23, 549.
(12) Veach and Pereira: Am. Jour. of Physiol. 1925, 74, 257.
(13) Gruber: Jour. of Pharmac. and Exp. Trerap. 1922, 20, 321.

SUR L'ACTION PHYSIOLOGIQUE DU VENIN DE CRAPAUD

III—VENIN DU CRAPAUD (BUFO MARINUS) ET MUSCLE LISSE

PAR LE

DR. JAYME R. PEREIRA

SOMMAIRE

Divers auteurs, se basant sur des preuves chimiques ont signalé la présence d'adrénaline en quantité élevée (5 °/°) dans le venin de crapaud; les preuves physiologiques sont au contraire peu nettes et d'autres auteurs ont nié l'existence de ce produit dans le venin.

L'Auteur a étudié comparativement l'action de l'adrénaline et du venin de crapaud (Bufo marinus) sur la fibre musculaire lisse du tractus digestif du lapin et du propre crapaud, de l'utérus du lapin et du rat, de la vessie et de l'estomac du cobaye, du cloaque du crapaud.

Résultats:—Le venin de crapaud en solution á 1:500 á 1:5000, exerce une action excitante sur la fibre musculaire lisse, même après l'action inefficace de l'adrénaline. En quelques cas, lorsque le tonus de la préparation musculaire est normalement élevé, le venin de crapaud peut provoquer son inhibition par un phénomène identique à celui de l'inhibition de Wedenski.

En dehors de ce cas particulier, le venin de crapaud ayant toujours montré une forte action excitante sur la fibre musculaire lisse, l'Auteur ne croit pas á l'existence de l'adrénaline dans cette sècretion.

PRESENCE DU BACTERIOPHAGE DANS L'EAU DES RIVIÉRES DE SÃO PAULO (*)

PAR LE

DR. JOSE' LEMOS MONTEIRO

(Assistant de l'Institut)

La vérification de la présence de principes lytiques dans certains cours d'eaux est ancienne.

Dèjá Hankin avait reconnu dans l'Inde l'action des eaux du Jumna et du Gange sur le vibrion cholérique, action qu'il comparait á celle d'une solution de sublimé; Frankland constata une action analogue des eaux du Támesis sur le b. coli et le bacille d'Eberth.

Depuis les travaux de d'Hérelle sur le phénomène du bactériophage, des principes lytiques, avec les caractères du bactériophage, ont été reconnus dans des eaux de fleuves, dans la terre, etc. et l'on peut déjá prèsumer qu'ils ont un rôle important dans la dépuration biologique de la nature, et, par conséquent, dans la défense sanitaire naturelle de l'humanité contre un certain nombre d'agents pathogènes.

Arloing et Chavanne (1), ont vérifié la prèsence de principe lytique dans les eaux de l'Isère, en France, en relation à diverses cultures microbiennes, mais surtout actif en relation au b. typhique et paratyphique A. Manolin et Costin (2) ont noté sa présence dans les eaux polluées, mélangées à du bouillon, aprés un séjour de 18 heures à 37° et filtration; à Buenos Aires, semblable constatation a été faite en relation aux eaux de puits: dans l'Amérique du Nord, L. Arnold (3) a vérifié la présence du bactériophage dans les eaux de la rivière de Chicago, et cherche à montrer la signification de la présence du principe lytique à la surface des eaux polluées, et, tout récemment, Arloing et Sempé (4) dans de nombreuses eaux fluviales et marines.

(*) Travail presenté a la Soc. de Medecine et Cirurgie de S. Paul, 5-4-26, avec un historique et consideractions sur l'importance e consequences scientifiques de la bactériophagie et publié dans les "Annaes Paulistas de Med. e Cir. n.os 3 e 4. Vol XVII. 1926.

(1) *F. Arloing et Chavanne*—Comptes Rendus Soc. Biologie, pag. 257, Vol. XCII—1925.

(2) *A. Manolin et G. Costin* — Comptes Rendus Soc. Biologie, pag. 384, Vol. XCIII—1925.

(3) *Lloyd Arnold*—The American Journal of Public Health, pag. 950, N.o 11, Vol. XV—1925.

(4) *F. Arloing et Sempé*—Comptes Rendus Soc. Biologie, pag. 244, Vol. XCIV—1926.

Nos recherches personelles ont été faites dans les eaux de deux rivières qui baignent la capitale de S. Paulo dont elles reçoivent les égouts; dans ce travail nous avons eu la précieuse collaboration de notre collègue le Dr. J. B. Arantes à qui nous adressons nos sincères remerciements.

Voici, en résumé, les résultats que nous avons obtenus.

Dans les eaux du *Pinheiros*, recueillies à leur passage sur le terrain de Butantan, apres que cette rivière ait traversé plusieurs quartiers de la ville, nous avons reconnu l'existence de bactériophage trés actif pour le bacille dysentérique Shiga et de faible activité en relation à des émulsions de b. paratyphique B., b. coli, et dysentériques, types Flexner, Strong et Hiss.

Dans l'eau du *Tiété*, recuillie à Ponte Grande, nous avons vérifié en deux essais, réalisés à des époques différentes, le bactériophage trés actif pour le b. dysentérique Shiga et agissant encore, quoique moins fortement, sur les b. paratyphique B., coli et dysentériques Flexner et Y.

L'eau de ces rivières, mélangée à des parties égales le bouillon, filtrée à la bougie et portée pendant une demie heure à 58°, posséde une petite action sur une émulsion de 1 c. c. de culture de b. dysentérique Shiga dans 10 c. c. de bouillon, action qui se vérifie aprés l'ensemencement en gélose inclinée (apparition de zones claires et de colonies atypiques, frangées etc.).

Mais dans l'eau mélangée à partie égale avec le bouillon et laissée à l'étuve à 37° pendant 24 heures, puis ensuite filtrée et chauffée une demie heure à 58°, l'action du principe lytique sur la même émulsion de B. Shiga est intense. Une goutte à peine de ce filtrat suffit pour lyser l'émulsion, l'ensemencement sur gélose inclinée restant sterile.

Nous avons vu que l'activité du bactériophage de l'eau de ces rivières était grande seulement apres un sejour de 24 houres à 37° en mélange avec du bouillon, c'est à dire aprés le développement pendant ce laps de temps des germes contenus dans l'eau.

On peut ainsi penser que l'action lytique intense du filtrat sur le b. dysentérique Shiga, est due à des produits de ces germes abondament développés aprés 24 heures à l'etuve à 37°.

La petite action antérieure de l'eau mélangée au bouillon, mais sans séjour à 37°, serait attribuable à ces mêmes produits, provenants des germes existants, mais qui sont en bien plus petit nombre, n'ayant pas été placés dans des conditions aussi favorable à leur développement que dans l'expérience précédente.

La question de l'antagonisme microbien, defendu par Lisbonne et Carrère, reçoit ainsi un nouvel appui.

Il serait intéressant de vérifier, par isolement, culture et recherche de l'action lytique, de tous les microorganismes contenus dans l'eau, si l'action bactériophagique sur le bacille dysentérique Shiga est due à des produits d'un seul d'entre eux, ou à l'action réunie de divers germes.

En tous cas, on ne peut nier l'antagonisme microbien dans la nature et il n'est pas déraisonnable de supposer que dans ces phénomenes les saprophytes jouent un rôle important; dans ce cas ils cesseraient d'être des germes banals pour devenir utiles et bienfaisants.

A DEFEZA CONTRA A MOSCA (1)

PELO

DR. VITAL BRAZIL

(Director do Instituto)

NOÇÕES PRELIMINARES — O QUE SE TEM FEITO

I

Um dos problemas sanitarios de maior interesse pratico é, sem a menor duvida, o da mosca. Basta compulsar a litteratura sobre o assumpto, tanto a que se refere ao estudo do papel deste nojento, incommodo e perigoso diptero, na transmissão das doenças, como a que diz respeito ao conhecimento de sua biologia e aos meios mais adequados a impedir os seus maleficos effeitos, para termos ideia da importancia da questão e do quanto tem ella occupado o espirito dos hygienistas e experimentadores.

Não pretendemos tratar do papel nocivo da mosca, nem mesmo passar em revista os numerosos trabalhos que, sobre esse ponto, regista a litteraura medica.

Admittida, como inconteste, essa nocividade, sobre a qual não se encontram divergencias, senão em questões de detalhes, limitar-nos-emos a estudar os meios de combate, tanto os que visam os seus effeitos maleficos, como os que têm, por objectivo, a sua destruição, apresentando, com este ultimo proposito, um methodo que se nos afigura de grande alcance, por se achar baseado em multiplas experiencias e por satisfazer os interesses em jogo,—o sanitario e o economico,—podendo ser applicado tanto nas pequenas agglomerações humanas, como nas grandes Capitaes.

Do ponto de vista sanitario, os meios que são naturalmente indicados para impedir a acção da mosca podem ser grupados do seguinte modo:

a) Os que visam a protecção dos alimentos susceptiveis de contaminação pelo seu contacto.

b) Os que têm por objectivo impedir o contacto desta com productos suspeitos.

c) Os que enfrentam a sua destruição.

---

(1) Memoria apresentada ao 3.º Congresso nacional de Hygiene, reunido em S. Paulo.—Novembro de 1926.

Gerando-se e alimentando-se em toda a sorte de immundices, a mosca, extremamente prolifera, frequenta, com persistente assiduidade, o domicilio, pousando, ora nos productos de excrecção humana, quer normaes, quer pathologicos, ora nos alimentos, constituindo, por isso, em certas regiões, um verdadeiro flagello difficil de combater ou evitar. A primeira indicacão de evitar o seu contacto perigoso e nojento com os alimentos é de facil comprehensão, mas de execucão difficil e de resultados pouco seguros. Os meios aconselhaveis em obediencia a esta indicação, comquanto não satisfaçam as exigencias do problema sanitario, devem comtudo ser tomados em consideração, por tratar-se, na mór parte dos casos, de medidas de caracter complementar. Comprehendem todos as suggestões de ordem pratica com o fito de proteger o alimento e o domicilio. Assim a telagem de portas e janellas, a cobertura dos pratos, das fructas, dos doces, do leite, etc., quer durante o seu preparo e exposição á venda, quer durante as refeicões, os assucareiros de formas especiaes para evitar a entrada de moscas no seu interior, o uso de vidros de côres convenientes nas janellas para afugental-as do domicilio, etc., e tantos outros meios têm sido recommendados e postos em pratica pela hygiene.

As medidas, que se podem pôr em pratica, com o fim de evitar que a mosca, pousando sobre os productos de excreccão e de secreção, se torne vehiculadora de germens pathogenicos, comportam os seguintes procedimentos:

1.º Remoção da materia fecal e de outros productos de excreção.

2.º Collecta, remoção e tratamento do lixo.

A noção de portadores de germens, que tanta luz trouxe sobre factos epidemiologicos incomprehendidos ou obscuros, antes de sua acquisição definitiva, veio augmentar a importancia pratica da remoção da materia fecal e outros *excreta* como medida sanitaria de elevado alcance. Sendo de relativa frequencia, os portadores de germens enterotropos, comprehende-se facilmente o papel que a mosca pode representar, como vehiculadora de taes germens, dada a sua predilecção pelos gabinetes reservados e pela materia fecal. Nas cidades, que dispõem de uma boa rêde de exgotos, este lado da questão se encontra convenientemente resolvido, bastando que uma boa fiscalisação mantenha em perfeito estado de aceio os apparelhos sanitarios.

Nos lugares de poucos recursos para o estabelecimento de um systema custoso, como é o da cannalisação geral de exgottos e nas zonas periurbanas das grandes cidades, é preciso aconselhar com insistencia os systemas de fossas que attendam, ao lado de outras exigencias sanitarias, as condições que difficultem ou impeçam o contacto da mosca com a materia fecal.

As fossas ou cloacas, que, com mais frequencia se encontram nas zonas ruraes e quasi que em toda a parte, onde não existe rêde de exgottos, são verdadeiros viveiros perigosos, pela attracção que exercem sobre as moscas que ahi vêm desovar, pondo-se em intimo contacto com as fezes de não pequeno numero de individuos, entre os quaes podem-se encontrar portadores de germens de predilecção enterica.

A proposito da frequentação dessas fossas pelas moscas, vem de molde citar-se o seguinte facto observado pelos medicos militares, durante a guerra de Cuba em 1892.

Tendo sido ordenado, como medida sanitaria para combater a epidemia de febre typhoide reinante no exercito, o lançamento de cal nas fossas, horas depois, foram observadas, no acampamento, grande numero de moscas pousando nos alimentos, tendo o signal probante de haverem passado por aquelles depositos de fezes, pela presença de cal nas patas.

Todo o systema de fossa, quer se trate dos mais rudimentares, constituidos por simples buracos cavados no solo, quer dos mais aperfeiçoados, e custosos, dotados de tanques septicos diluidores, e de leitos bacterianos, deve obdecer á condição indispensavel de evitar o contacto das moscas com a materia fecal.

O Dr. A. L. Otway, (1) major do corpo de saude do exercito inglez, em um excellente artigo, publicado, em janeiro deste anno, no Journal of the Royal Army Medical Corps, apresenta um dispositivo original e extremamente engenhoso, applicavel ás fossas e destinado a impedir a disseminação das moscas. Por esse dispositivo tanto as moscas que possam penetrar no interior das fossas, como as que ahi se geram, são apanhadas em uma sorte de armadilha. O principio, em que se funda o dispositivo *Otway*, é o da tendencia que têm a mosca de escapar por uma fresta luminosa quando se encontra encerrada n'um compartimento escuro. Assim a fossa deverá, de preferencia, ter as seguintes dimensões: 20 pés de comprimento, 4 pés de largura e 12 pés de profundidade. Será cuidadosamente coberta, em ordem a evitar-se toda e qualquer penetração de luz, a não ser por um unico orificio de 6 pollegadas aberto n'uma de suas extremidades e sobre o qual será collocada uma armadilha, destinada a captura das moscas que procuram sahir da fossa. N'outro ponto da fossa haverá a abertura normal para servir directamente os frequentadores da mesma ou para os despejos das fezes; esta abertura, porém, deverá ser munida de uma tampa para mantel-a fechada, fora das occasiões do serviço. Sobre a fossa deverá ser levantada uma casinha, cobrindo uma area um pouco mais espaçosa do que a superficie d'aquella. Esta casinha terá dois compartimentos; um maior, mantido, tanto quanto possivel, na obscuridade, onde se encontra a abertura para entrada das fezes; outro menor, bem illuminado, onde deve estar collocado o pequeno orificio, por onde procuram escapar-se as moscas e sobre o qual está collocada a armadilha. Esta é constituida por um cone de tela metallica de malhas estreitas, tendo na parte superior um pequeno orificio e directamente applicado e fixado sobre a abertura que illumina a fossa; sobre este cone colloca-se uma caixa de madeira de dimensões approximadas ás de uma caixa de kerozene, tendo na sua parte superior uma tela metallica fixa. As moscas, attrahidas pela faxa de luz, que penetra na fossa, atravez do orificio, coberto pelo cone de tela metallica, procuram escapar-se por ahi, ficando presas na caixa de cobertura, onde succumbem por falta de alimento. Entre o orificio da armadilha e o da entrada das fezes, deve mediar a distancia de 6 a 10 pés no minimo. Este dispositivo ensaiado em fossas construidas, sob a direcção do seu autor, deu os melhores resultados, permittindo determinar a quantidade e

qualidade das moscas que nas regiões tropicaes pódem produzir taes fossas. E' assim que Otway nos informa que em cinco ou seis dias estas fossas podem dar uma media de 250 mil moscas. Duas mil moscas foram cautelosamente examinadas de exemplares tomados ao accaso, sendo identificadas as seguintes especies:

1—Lucilia Cesar.

2—Calliphora vomitoria.

3—Mosca domestica.

4—Sarcophaga.

As duas primeiras especies predominaram em partes iguaes, sendo setenta vezes mais abundantes do que a mosca domestica. Só dois exemplares de Sarcophagas foram identificados.

Este systema de fossas, de todo o ponto de vista, recommendavel, nas regiões em que, não havendo rêde de exgottos, a mosca constitue um perigo e um flagello, é um complemento indispensavel a outras medidas mais radicaes de combate a esta praga, taes como a remoção e tratamento do lixo, e dos residuos de estribarias, estabulos, pocilgas, redis, etc.

REMOÇÃO E TRATAMENTO DO LIXO E DE TODOS OS RESIDUOS CAPAZES DE SERVIR A CREAÇÃO DE MOSCAS: —

E' sabido que a mosca domestica pode servir-se de toda a materia organica em fermentação para postura de seus ovos. Prefere, entretanto, o estrume do cavallo, ao de qualquer outro animal e na falta de qualquer um destes, dos residuos de cosinha ou de outros quaesquer detrictos fermentaveis. O lixo das cidades constituido, na sua maior parte, pelos restos de alimentos, colhidos no domicilio, pelo producto de varreduras de toda a sorte, por cadaveres de pequenos animaes collectados em toda a area urbana é um excellente meio para o seu desenvolvimento, sendo com estrume de estabulo e estribarias, o principal centro de proliferação do terrivel flagello nas grandes agglomerações humanas, em que a quantidade de lixo attinge a proporções formidaveis.

A destruição do insecto alado não póde ser encarada, senão como meio complementar, aleatorio, que não resolve o problema de combate ao flagello. A mosca deve ser attacada na sua phase larvaria, consequentemente nos meios que lhe servem de ninho. Desta noção deduz-se facilmente que as medidas fundamentaes de combate a mosca nos grandes centros urbanos, consistem na applicação de algum dos differentes methodos de tratamento do lixo, que se resumem:

1.° Na remoção rapida, para grandes distancias, dos centros populosos, de todo o lixo e de todo o residuo que possa servir para criação de moscas.

2.° Na incineração do lixo.

3.° Na destruição das ninhadas de moscas (ovos, larvas e nymphas), pelo tratamento do lixo por agentes chimicos.

4.° Na applicacão dos methodos biologicos, em ordem a contrariar ou impedir o desenvolvimento da mosca.

Examinemos cada um d'estes methodos.

A remoção diaria de todo o lixo de uma grande cidade, para uma distancia tal que colloque toda a população ao abrigo do flagello da mosca, é difficilima de ser posta em execução. Rarissimas são as cidades que conseguiram organisar bom serviço com esse objectivo. Varios factores contribuem para embaraçar a consecução do fim collimado. Em primeiro lugar as difficuldades de transporte para remoção de uma tão grande quantidade de lixo, exigindo grande abundancia de material rodante e enorme dispendio, nem sempre compativel com os recursos orçamentarios das municipalidades. Em segundo lugar a indisciplina de parte do povo e a grande somma de energia da parte das autoridades para vencer o natural interesse em reter na periferia urbana, uma parte da riqueza fertilisante, representada pelo lixo e principalmente pelo estrume animal.

De sorte que a remoção do lixo nas condições indicadas, talvez recommendavel em casos muito especiaes, não é uma medida praticavel, tratando-se de uma capital ou de uma cidade populosa.

A incineração de todo o lixo propriamente dito, assim como de tudo quanto possa servir a creação de moscas, seria uma medida radical, satisfazendo plenamente aos mais exigentes hygienistas. Choca-se, porém, de tal modo com o interesse economico, que não é praticavel. De facto, resume-se o methodo em despender dinheiro para destruir uma riqueza fertilisante que representa um valor economico respeitavel.

Quanto ao tratamento do lixo e do esterco por agentes chimicos, com o fim de destruir ovos, larvas, e nymphas de moscas, varios têm sido os processos aconselhados oriundos de innumeraveis trabalhos experimentaes.

Cook, Hutchinson e Scales (1914) aconselham o emprego do borax (tetra borato de sodio. Na^2 B^7 $10H^20$), depois da verificação da acção larvicida notavel d'esta substancia.

Vaillard (1914). Hewitt (1915), Eichardson, Wilhelmi (1919) e Von Schuckmann (1923) aconselham igualmente o borax para destruição das larvas.

Cook, Hutchinson e Scales (1915) preconisam como larvicida o *Helleborus albus* ou *Helleborus viridis*. O. Veiga, em memoria apresentada á primeira conferencia de microbiologia e Hygiene, reunida em Buenos Aires em 1916, demonstrou que a addição da cal extincta ao esterco, impede o desenvolvimento de larvas.

Wilhelmi (1919) e Von Schuckmann (1923) tambem verificaram os bons effeitos da cal tanto no tratamento do esterco, como no tratamento do lixo.

Igualmente preconisam a cal, Vaillard, Gerhard e Trembur, sob a forma de leite de cal.

Howard (1912), Vaillard e Hewitt, acham que tambem o chlorureto de calcio, pode ser empregado como larvicida. Gerhard, Wilhelmi e Von Schuckmann, não conseguiram, entretanto, resultados satisfatorios com este sal. Além destes, muitas outras substancias tem sido aconselhadas, para destruição de larvas de moscas taes como o sulfato de ferro, oleos diversos, o petroleo, e o saprol.

Teichmann (1918) aconselha o emprego do acido cyanhydrico. Este processo foi, porém, rejeitado como perigoso por diversos antores.

Os differentes processos chimicos de tratamento do lixo e do estrume, excellentes, quando applicados a quantidades relativamente pequenas de materia organica, como os residuos fornecidos por populações restrictas, não satisfazem, em absoluto, no caso mais importante e de maior alcance sanitario, do beneficio de todo o lixo de um grande centro populoso.

Qualquer dos agentes chimicos aconselhados, por mais baixo que seja o seu custo, tornaria extremamente dispendioso o processo quando applicado ao volume enorme de destrictos organicos colhidos em uma grande cidade.

Além d'essa consideração, ha ainda a objectar contra os processos chimicos, que um grande numero d'elles prejudicam a utilisação do esterco e do lixo, como adubo.

O estudo da biologia da mosca conduzio a creação de methodos extremamente engenhosos, de bons resultados, quando applicados em pequena escala mas que não resolvem definitivamente o problema. Neste caso está o methodo que se apoia na tendencia que têm as larvas de emigrarem, do monturo, onde se desenvolveram, onde ha calor e humidade, para logar secco e fresco, para ahi, se transformarem em nymphas. Taes observações feitas por Levy, Tuck e Richamond em 1913, e por Hutchison em 1915, levaram este ultimo a estabelecer o seu processo que consiste na construcção de uma bacia retangular cimentada, de cujo interior se levanta uma plataforma de madeira, onde se deposita o esterco ou o lixo; as larvas que terminaram a sua phase evolutiva procuram escapar-se e cahem no interior da bacia, onde são destruidas.

Blanchard, referindo-se a este processo, acha-o racional como base das medidas de luta contra as moscas.

A despeito d'esta respeitavel opinião, consideramos o processo exequivel, apenas, em casos restrictos. Para chegar-se a esta conclusão, basta considerar o tamanho da plataforma, ou o numero de plataformas necessarias para receber todo o lixo e todo o estrume produzido, n'um centro populoso, durante 30 dias, prazo este necessario para fermentação e deslarvação completa dos depositos.

Roubaud considera o processo de Hutchison, como uma solução incompleta do problema da extinção das larvas e propõe o seu processo bio-thermico, que consiste no aproveitamento da elevação da temperatura central dos montes de esterco para destruição dos ovos e larvas, cuja vitalidade é abolida a temperatura de 46°. Para isto aconselha uma estrumeira de forma especial, protegida contra as perdas de calor. As primeiras porções de esterco entrando em fermentação desenvolvem uma temperatura muito superior a 46°, podendo mesmo attingir a 65°, de sorte que o esterco fresco, collocado sobre o que fermenta, esterilisa-se com relação as moscas, pois os ovos n'elle contidos perdem a vitalidade.

O processo Roubaud é extremamente engenhoso e bem fundamentado em factos de observação biologica. Os seus resultados praticos não são, entretanto, completos, porque as larvas movimentam-se constantemente no interior da massa, em que se nutrem, podendo, consequentemente, fugir as altas temperaturas, emigrando para o esterco fresco ou para as camadas superficiaes.

O systema de cellulas Beccari, para o tratamento do lixo, deve

ser considerado como uma applicação do processo Roubaud. De facto, n'elle, é ainda o calor, desenvolvido pela fermentação do lixo, que determina a morte das larvas de mosca. A parte original do systema consiste no dispositivo das mesmas, facilitando e activando as fermentações, o que permitte uma maior elevação thermica do que a normalmente verificada nos monturos.

Sendo de 24 metros cubicos a capacidade de cada uma d'essas cellulas e durando o cyclo de fermentação cerca de 40 dias, facil é calcular-se o numero de cellulas necessarias, para cada caso particular.

Este systema que tem sido adoptado, ao que parece, com bons resultados tanto na Italia, como nos Esados Unidos, tem contra si, ser extremamente oneroso, maximé quando se trata do beneficio de um volume consideravel de lixo, de uma grande cidade. Em S. Paulo onde a quantidade de lixo pode ser orçada em perto de mil metros cubicos diarios, seriam necessarios 1600 cellulas, que ao preço minimo de cinco contos custariam oito mil contos.

II

PESQUISAS

NOVO METHODO DE COMBATE A MOSCA

Bem razão tinha Celli, quando affirmava que a luta contra a mosca devia basear-se no conhecimento exacto e completo da sua biologia.

Os melhores processos, até hoje, indicados, para esse fim, são os que se apoiam sobre factos colhidos na observação das differentes phases por que passa este pernicioso insecto. Foi a convicção do conceito emittido pelo notavel scientista italiano que deu origem aos processos de Hutchison, de Roubaud, de Otway e de O. Veiga, sendo o d'este ultimo baseado em observaçoes, feitas em Butantan (1916) sobre o effeito da cal como modificador dos meios propicios ao desenvolvimento das larvas. Foi ainda este mesmo conceito, que nos levou a retomar as nossas observações sobre o desenvolvimento das larvas no estrume do cavallo, para tirar d'elle uma applicação pratica, que parece resolver melhor do que os processos anteriormente indicados, o importante problema de combate ao perigoso diptero, tanto nas pequenas agglomerações humanas, como nos grandes centros populosos.

Tendo chegado a conclusão de que o processo da cal, muito bom em principio, não poderia generalisar-se, nem podia ser applicado em grande escala, pelo preço relativamente elevado para o tratamento do lixo e de todos outros residuos de uma grande cidade, tivemos a ideia de verificar o papel que teria a terra, como modificador do meio em que se desenvolve a larva, fazendo com esse fim a seguinte experiencia. A' mesma quantidade de estrume de cavallo (16 grs.) juntamos, quantidades variaveis de terra vermelha de barranco, desde 20 °/° de terra até 140 °/°; terra e estrume foram misturados intimamente e introduzidos em tubos de ensaio, tendo um d'elles recebido estrume só. Isto feito, introduzimos em cada um dos tubos cinco larvas de mosca, colhidas em estrume de 24 horas. A observação d'estes tubos, durante alguns dias, nos revelou o seguinte: no tubo testemunha (só estrume) e no que tinha apenas 20 °/° de terra, as larvas trabalharam activamente, desenvolvendo-se normalmente; nos de 40, 60 e 80 °/° de terra, as larvas trabalharam progressivamente menos, morrendo tanto mais rapidamente, quanto mais forte era a proporção de terra; finalmente nos tubos de 100, 120 e 140 °/° de terra, as larvas não conseguiram trabalhar; penetraram naturalmente no interior da massa não tendo sido encontradas posteriormente.

Esta experiencia nos mostrou, desde logo, que a mistura de terra ao estrume, em certas proporções, era desfavoravel ao desenvolvimento de larvas, levando-nos a reptil-a, em condições mais proximas das naturaes. Para isto tomamos tres frascos dos commumente usados para sangria de cavallo da capacidade de 2 litros, em cada um

dos quaes collocamos 200 grammas de estrume fresco. Conservamol-os abertos, expostos as moscas. Ao cabo de dois dias verificamos que havia em todos elles grandes quantidades de ovos e pequenas larvas. Deixamos então um d'elles sem tratamento; outro foi tratado por 40 grammas de terra; finalmente o terceiro recebeu 100 grammas de terra que foi misturado ao esterco. A observação d'estes trez frascos confirmou os primeiros resultados. No frasco testemunha, as larvas em plena actividade, desenvolveram-se normalmente; no segundo, tendo recebido apenas 20 °/° de terra, as larvas trabalharam com menos actividade, tendo, entretanto, conseguido desenvolver-se; no terceiro, porém, que recebera 50 °/° de terra, trabalharam, muito pouco, durante os dois primeiros dias, ao fim dos quaes succumbiram.

Estava, pois, bem estabelecido que a terra misturada ao estrume fresco na proporção minima de 50 °/° impedia o desenvolvimento das larvas. Com estes resultados confirmados por muitas outras experiencias, fomos conduzidos a outras indagações, como por exemplo, saber si qualquer terra teria a mesma acção, se larvas de qualquer idade, seriam igualmente sensiveis ao tratamento pela terra.

Para responder a primeira indagação examinamos trez sortes de terra: a vermelha de barranco, a de jardim e o barro de telha. As trez amostras foram seccas ao sol e pulverisadas, terminando-se a seccagem, pela passagem no forno Pasteur, a 160°, tendo verificado as seguintes perdas de peso, correspondentes ao indice hygrometrico de cada uma das amostras: terra vermelha 3,5 °/°; terra vegetal 3,7°/°; barro 4,4°/°.

Com amostras d'estas trez sortes de terra, instituimos experimentos analogos aos anteriores, tendo por objectivo a desejada comparação.

Verificamos que a terra vermelha e a terra vegetal tinham effeitos perfeitamente comparaveis, entre si, emquanto que o barro nos pareceu um pouco inferior.

Outros experimentos foram iniciados, com o fim de verificar-se, si a idade da larva tinha influencia sobre o gráo de resistencia a este processo de tratamento, tendo conseguido apurar que, effectivamente, a larva quanto mais nova menos resistente. Os melhores resultados são os obtidos com o estrume do mesmo dia, pois n'estas condições não se observa trabalho algum indicativo da existencia de larvas; com o estrume de um a trez dias, as larvas trabalham com grande difficuldade, succumbindo no quarto ou quinto; com estrume de cinco dias as larvas já são muito resistentes, vencendo por mais tempo a difficuldade do meio, emigrando para um ponto da superficie, onde formam colonias mais ou menos densas, ao abrigo da luz, mas fóra da massa compacta da mistura do estrume com terra, succumbindo afinal depois de muitos dias. Com estrume de mais de cinco dias muitas larvas, podem transformar-se em nymphas. Todas estas observações nos indicaram a conveniencia de tratar-se estrume o mais cêdo que fôr possivel, em todo o caso dentro dos trez primeiros dias.

Uma questão ainda mais importante de quantas temos tratado, a proposito de nossas experiencias, diz respeito a interpretação do effeito da terra como impediente do desenvolvimento das larvas nas

condições indicadas. Raciocinando sobre os factos observados, uma primeira explicação nos acudio a mente: precisando a larva de um certo gráo de humidade para viver, a mistura de terra secca ao estrume, em proporção conveniente, viria roubar uma parte da agua n'elle contida produzindo o effeito observado. Contra esta observação, militava, entretanto, o facto de se ter revelado menos activa justamente a terra mais hygrometrica, obtida pela seccagem e pulverisação do barro de telha. Si fosse esse, de facto, o mechanismo da acção da terra, quanto maior fosse o seu gráo hygrometrico, tanto mais energicamente exerceria sua acção, facto verificado em sentido contrario.

Para esclarecer mais este ponto, imaginamos substituir, na mistura, a terra, pela serragem secca, com uma grande capacidade de absorpção. Pois bem, este producto, empregado nas mesmas condições da terra não teve influencia alguma sobre o desenvolvimento das larvas. Era, pois, evidente que o effeito da terra secca, não podia ser attribuido só a sua capacidade hygrometrica e que um outro factor devia intervir no phenomeno, levando-nos a examinar, cautelosamente, todas as circumstancias, todos os detalhes registados durante as nossas observações. Foi então que nos acudio a mente um phenomeno da maxima importancia na biologia da mosca, no estado larvario, o qual nos daria a chave para explicação procurada. *A larva logo que sahe do ovo move-se constantemente no interior da massa, estrume ou lixo, onde se nutre.* Pois bem, um dos effeitos que observamos, ao juntarmos terra em proporção progressivamente crescente ao estrume, foi a diminuição progressiva dos movimentos das larvas, até a sua completa paralysação, que coincide com a morte d'estas. Parece-nos, pois, que a mistura de terra e estrume, em certa proporção, constitue um meio viscoso, em que a larva se move com extrema difficuldade, vindo a succumbir ao fim de algum tempo, por falta dos movimentos, que lhe são indispensaveis.

Em favor d'esta interpretação, falla, ainda, a circumstancia de favorecer a acção da terra, uma ligeira compressão exercida sobre a mistura, augmentando a compacidade da massa, conforme verificação experimental.

Quando a larva tem cinco ou mais dias, é bastante vigorosa pode vencer a viscosidade do meio, emigrando para um ponto da superficie, onde succumbe, por falta de nutrição, se não attingio a maturidade, ou transforma-se, em nympha no caso de haver attingido a maturidade.

Si ao em vez de terra secca ao sol, como faziamos a principio, empregamos terra ligeiramente humida, como quando é extrahida do barranco, os resultados são praticamente os mesmos, contanto que se augmente a proporção de terra.

Terminadas as experiencias de laboratorio, tratamos de verificar em maior escala a efficiencia do methodo. Para tal fim estabelecemos em Butantan uma estação experimental, para beneficiamento de todo o estrume das estribarias, e estabulos, das varreduras dos patios e do lixo das casas dos empregados.

Esta estação experimental consta de um galpão, com uma area de 391 m.², dividida em trez partes: a primeira destinada a peneira mechanica e deposito de terra peneirada, medindo 8 m. por 6 m.; a se-

gunda para deposito do material a ser tratado e installação do misturador, medindo 11,5 m. por 9,5 m.; a terceira composta de 3 depositos para o material tratado com a capacidade de 56 ms. cubicos cada um. Com este dispositivo, faltava-nos apenas, um bom misturador de estrume e terra. As primeiras experiencias em falta de qualquer machinismo apropriado, foram feitas a braço por meio de garfos, ancinhos e pás. Os resultados foram assaz mediocres pois não se consegue uma mistura homogenea, senão com muito trabalho.

Procuramos então no mercado, com o auxilio do snr. Serafim Fontes, uma machina que fizesse um trabalho analogo aquelle que nos preoccupava, tendo encontrado n'um misturador de concreto fabricado pelo Snr. Felinge, um typo, que com algumas modificações foi installado em a nossa estação experimental e está funccionando com resultados mediocres, pois a mistura obtida não satisfaz completamente, por não ser bem homogenea. Mesmo assim o resultado final satisfaz, quando se trata apenas de estrume, material mais facil de misturar-se a terra. Tratando-se, porém, do lixo da cidade, cujo beneficio estamos experimentando pelo novo processo, este mĩsturador deixa muito a desejar.

O lixo de S. Paulo é extremamente complexo, podendo ser assim separado:

1.° Papeis	13,4 °/°
2.° Latas	1,3 °/°
3.° Vidros	0,9 °/°
4.° Trapos	1,5 °/°
5.° Ferro	0,4 °/°
6.° Residuos de cosinha	82,5 °/°

Para tratamento conveniente, pelo novo processo será necessaria uma separação do lixo, com eliminação da parte não utilisavel coco adubo, trituração da parte residual e mistura d'esta com terra sendo que estas duas ultimas poderão ser levados a effeito ao mesmo tempo. Procuramos actualmente o melhor methodo de separação e trituração para applicação do novo processo ao lixo da cidade.

CONCLUSõES:

1.° Os meios de defesa contra a mosca comportam uma serie de medidas, que podem ser divididas em dois grupos: medidas secundarias ou complementares e medidas radicaes.

2.° No primeiro grupo estão comprehendidas todas as que visam a protecção dos alimentos do contacto da mosca; no segundo todas as que dizem respeito a sua destruição.

3.° As medidas do segundo grupo são as que mais particularmente devem prender a attenção do hygienista.

4.° Os methodos aconselhados para destruição do insecto alado, não têm grande alcance sanitario, constituindo recursos de emergencia. E' principalmente durante o periodo larvario que a mosca deve ser attacada.

5.º Os differentes methodos aconselhados, para esse fim, podem ser grupados em duas ordens. Os que têm por base a acção de substancias chimicas sobre as larvas, e os que se fundam em uma circunstancia qualquer da biologia da mosca. Estes ultimos devem ser preferidos, por serem os mais praticos.

6.º Entre os methodos biologicos de combate a mosca, merecem especial menção os de Levy, Tuck e Hutchinson, baseado na tendencia que tem as larvas de fugirem do centro do esterco no momento de se transformarem em nymphas, o de Roubaud, que aproveita o calor desenvolvido no proprio meio em que se desenvolvem as larvas, para sua destruição: finalmente o de Otway, applicavel em casos restrictos, mas bem fundamentado e muito engenhoso.

7.º O methodo Beccari, que está sendo adoptado com bons resultados na Italia e nos Estados Unidos, não é senão uma applicação particular do processo Roubaud.

8.º A mistura de terra secca, na proporção minima de 50 %, ao esterco é um excellente meio de combater a mosca no estado larvario. Esta mistura tem acção nociva sobre a vida da larva, por impedir-lhe ou difficultar-lhe os movimentos, indispensaveis a sua nutrição.

9.º A applicação d'este methodo no tratamento do lixo não foi ainda executado com inteiro exito, por falta de uma machina capaz de produzir uma mistura homogenea com esse material, semelhante a que se obtem com o esterco.

LA DÉFENSE CONTRE LA MOUCHE

PAR LE

DR. VITAL BRAZIL

SOMMAIRE

1.°—Les moyens de défense contre la mouche comprennent une série de mesures qui peuvent être divisées en deux groupes: mesures secondaires ou complementaires et mesures radicales.

2.°—Dans le premier groupe sont comprises toutes celles qui visent à protéger les aliments du contact de la mouche; dans le second, toutes celles qui tendent á sa destruction.

3.°—Les mesures du second groupe sont celles qui doivent plus particulièrement retenir l'attention de l'hygieniste.

4.°—Les méthodes recommandées pour la destruction de l'insecte ailé n'ont pas une grande valeur sanitaire, ne pouvant être que des moyens d'émergence. C'est surtout pendant la période larvaire que la mouche doit être attaquée.

5.°—Les differentes méthodes indiquées dans ce but peuvent être divisée en deux classes: celles basées sur l'action de substances chimiques sur les larves et celles qui s'appuient sur une circonstance quelconque de la biologie de la mouche. Ces dernieres doivent être preferées, étant les plus pratiques.

6.°—Entre les procédés biologiques de combat de la mouche, il faut surtout mentioner ceux de *Levy*, *Tuck* et *Hutchinson* basés sur la tendance des larves à fuir le centre du fumier au moment de leur transformation em nymphes; celui de *Roubaud* utilisant pour la destruction des larves la chaleur dégagée par le propre fumier oú elles vivent; et enfin celui de *Otway* très ingenieux et bien fondé, mais applicable seulement en des cas limités.

7.°—Le procédé *Beccari*, dejá appliqué avec bons resultats en Italie et aux Etats Unis n'est qu'une application particulière du procédé Roubaud.

8.°—Le mélange de terre sèche au fumier, dans la proportion de 50 por 100 est un excellent moyen de combattre la mouche pendant son état larvaire. Ce mélange possède un effet nocif sur la vie de la larve, dont elle empêche ou gêne les mouvements indispensables à sa nutrition.

9.°—L'application de ce procédé au traitement des ordures n'a pas encore été rèalisée avec un succès complet,, par suite du manque de machine capable de former avec elles un mélange homogène, êgal à celui obtenu avec le fumier.

LITERATURA

Otway (A. L.)—A method of excreta disposal um the tropics which entirely prevents fly dissemination. Journal of the Royal Army Medical Corps. N.° 1—Vol. XLVI—Jan. 1926.

Rosenau (M. J.)—Preventive Medicine and Hygiene.—1921.

Celli (A.)—Manuale dell'Igienista.—pag. 1124.

Chantemesse et *Borrel*.—Mouches et cholera.

Howard (L. O.)—The insecte book.—pag. 167.

Grahm Smith.—Flies in relation to disease.—1924—Cambridge.

Maurano (H. R.)—A mosca perante a hygiene.—Memoria apresentada ao 1.° Congresso de Medicina, realisado em S. Paulo em 1916.

Veiga (O.)—A prophylaxia da mosca. Methodo biochimico. Memoria apresentada a 1.ª Conferencia Sul Americana de Microbiologia, parazitologia e hygiene, realisada em Buenos Aires em 1916.

Cook (F. C.), *Hutchison* (R. H.) and *Scales* (F. M.)—Experiments in destruction of fly-larvae in horse-manure. Bull. U. S. depart. Agric.—1914 n.° 118.

Os mesmos:—Further experiments in destruction of fly-larvae in horse manure. Bull. U. St. dep. Agric.—1915, n.° 245.

Wilhelmi (J.)—Versuche zur Bekampfung der in Kot, Mist und anderen organischen Abfallstoffen leboden Muscidenbrut, insbesondere der gemeine Stechfliege (Stomoxys calcitrans) mit Kalisalzen und anderen Chemikalien. I. Laboratoriums versuche. Mitteilungen aus dan Dandesanstalt fur Wasserhygiene zu Berlin-dahlem, 1919, fasciculo 25, p. 190.

Schuckmann (W.)—Uber Mittel zur Fliegenbekampfung. Zeitsch f. angew. Entomol, 1923, t. 9, p. 81.

Vaillard.—Au sujet des mesures à prendre contre les mouches. Bull. Off. Intern. Hygiene Publ. 1913, t. 5, p. 1313.

Vaillard.—Pour lutter contre les mouches. Da vie agric. et mr. Paris, 1914, t. 3, p. 373.

Hewitt (C. G.)—House fly control. Agric. Gaz. Canadá, Ottawa, 1915, t. 2, p. 418.

Richardson (C. H.)—Fly control on the college farm. Rept. Entomol. depart., New Jersey Agric. Coll. Exp. Stat. for 1914, Paterson, 1915.

Cook (F. C.) and *Hutchinson* (R. H.)—Experiments during 191[illegible], inthe destruction of fly-larvae in horse-manure. Bull. Unit. St. Agric. depart., 1916, n.° 408.

Gerhard (W. P.)—Die gefaheliche Hausfliege—Gesundh. Ing. 1911, t. 34, p. 947.

Trembur (H.)—Infektiose darmkrantheiten und Fliegen. Deut. militararztl. Zeitsch., 1908, 37, p. 556.

Howard (L. O.)—The house-fly, disease carrier. London, John Murray, 1912.

Ross (T. S.)—Flies in a jail. Indian Med. Gazette, 1916, 51, p. 131.
Galli—Valerio (B.)—L'etat actual de nos connaissances sur le rôle des mouches dans la dissémination des maladies parasitaires et sur les moyens de lutte à imployer contre elles. Centralb. J. Bakt. 1910, Ite. Abt. Orig. t, 54, p. 193.
Bordas (F.)—Assainissement des cantonnements et des champs de bataille. Comp. send. Acad. Sciences, 1915, t. 160, p. 779.
Roubaud (Et.)—Destruction des mouches et desinfection des cadavres dans la zone des combats. Com. Rend. Acad. Aci. 1915, t. 160,.p. 92.
Kleine (F.)—Fliegenbkampfung.—Illust. Landwietsch Ztg. 1915, 35.
Foreman (F. W.) and *Graham-Smith* (G. S.)—Investigarions on the privention of muisances arisig from flies and putrepatuso. Journ. of Hyg., 1917, t. 16, p. 109.
Teichmann (E.)—Die Bekampfung der Fliegenplage. Zeit. J. angew Entom, 1918, 4, p. 347.
Moller (W.)—Die Bekampfung der hygienisch wichtingen tierischen Schadlinge. Cent. J. Bakt. 1922, Ite. Abt. Orig., t. 89, p. 37.
Wilhelmi (J.)—Mullbescitigung und Fliege. Veroffentl, a. d. Geb. d. Mediz-Verwalt., 1922, t. 17, p. 205.
Levy (E. C.) and *Tuck* (W. T.)—The maggot-trap, a new weapon in our warfare against typhoid-fly. Amer. Journ. of Publ. Health, 1913, 3, p. 657.
Cory (E. N.)—The control of the nouse-fly by the maggot-trap. Maryland, State Collect. Agric. Exp. Stat. College Park, 1918, Bull. n.º 213.
Blanchard (Raphael)—La lutte contre les mouches. Bull. Ligue Sanit. Française, 1915, n.º 5, (Apud.—Bull. Inst. Pasteur, 1916, 14, p. 186).
Roubaud (Et.)—Les producteurs de myasis et agents similaires chez l'homme et les animaux. Etude sur la faune parasitaire de l'Afrique occidentale française. Paris, Masson e Comp. (Apend. Bull. Inst. Pasteur, 1915, vol. 13, p. 345.
Roubaud (E.)—Etudes biologiques sur la mouche domestique. Méthode biothermique de destruction des oeufs dans le tas de jamier. Compt. Rend. Soc. Biol. 1915, t. 78, p. 615.
Roubaud (E.)—Production et autodestruction par le fumier de cheval des mouches domestiques. Compt. Rend. Acad. Sciences, 1915, . 161, p. 325.
Roubaud (E.)—La fermentation du tas de fumier au service de la bassecour dans la lutte contre les mouches. Bull. Mus. Hist. Nat. 1921, p. 48.
Noel (P.)—La guerre aux mouches. Bull. du Lab. Region Entom. Agric. Rouen, 1913, p. 4.
Tragardh (J.)—On the chemotropism of insects and its significance for economic entomology. Bull. Entom. Research, London, 1913, 4, p. 113.
Portschinsky (I. A.)—Hydrotaea dentipes, ets biology, and the destruction by its larvae of the larvae of Musca domestica. Mem. Bur. Entom. Scienc. Comm. of the. Centr. Boad of Land. Adm. and Agric. St. Petesburg, 1910, 8.

O SÔRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS PELA TECHNICA ACTUALMENTE USADA NO INSTITUTO PASTEUR DE PARIS, COM SÔROS ACTIVOS, EM CONFRONTO COM A REACÇÃO DE WASSERMANN.

PELO

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

(Assistente do Instituto)

I

LIGEIRAS NOTAS SOBRE A EVOLUÇÃO DO SÔRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS COM SÔRO ACTIVO

Desde as primeiras experiencias de *Nagelschmidt*, publicadas em 1904, até a nossa data, medeia um espaço de tempo rico em trabalhos tendo por fim descobrir uma reacção que seja o mais sensivel indicador capaz de revelar o estigma immunitario da syphilis.

Até hoje o methodo de *Wassermann* tem-se mantido e acreditamos que se manterá por muito tempo como methodo estalão entre as reacções para o sôro diagnostico da syphilis. E', na realidade, um methodo universalmente reconhecido como bom; mas que, devido á multiplicidade de technicas empregadas, ultimamente tem se notado um ligeiro descredito ao seu valôr, graças aos resultados contradictorios fornecidos pelos laboratorios.

As variações são tantas ao seu methodo inicial, que é difficil encontrar dois laboratorios que o executem pelo mesmo processo.

Impõe-se, portanto, uma revisão; ou que o nosso prospero Estado trate de regulamentar o *Wassermann*.

Tratando-se de um methodo complicado, que exige muito bôa technica do seu executor, surgiram logo simplificações: umas baseando-se em certas reacções precipitantes dos sôros syphiliticos em relação a alguma substancia lipoide; outras, baseando-se nos mesmos principios de *Wassermann*, apresentam como simplificação a suppressão do complemento de cobaio, de sôro hemolytico anti-carneiro e do antigeno de figado syphilitico, por terem constatado a existencia de complemento em todos os sôros frescos, de amboceptor natural contra os globulos de carneiro no sangue humano e de lipoides em todos os orgãos.

Não cuidaremos aqui da sôro precipitação na syphilis, mas sim das simplificações do methodo original de *Wassermann* com sôro activo.

Foi *J. Bauer* (1) o primeiro a se servir da propriedade hemolytica do sôro humano para os globulos de carneiro, mas usava a sensibilisadora natural dos sôros aquecidos. A estes juntava o antigeno, complemento de cobaio e, após a fixação, globulos de carneiro não sensibilisados.

Maior simplificação ao methodo de *Wassermann* foi introduzida por *H. Hecht* (2). Este, além da sensibilisadora já usada por *Bauer*, lançou mão tambem da alexina natural dos sôros não aquecidos.

Da simplificação de *Bauer* á de *Hecht* foi facil o transito, pois se estudava nessa occasião os inconvenientes do uso dos sôros aquecidos devido á thermolabilidade dos anticorpos em geral e particularmente da thermolabilidade das reaginas syphiliticas; dahi o exame de sôros não aquecidos e o aproveitamento da sua alexina.

O methodo de Hecht, tomando doses fixas de sôro fresco e de globulos, não levando em conta a variabilidade do poder hemolytico natural dos sôros, deu desde logo grande numero de resultados inexactos admittidos por todos que o usaram.

Comtudo, esse methodo, sobre ser original, veio de molde a provocar grande curiosidade pela sua simplicidade e elegancia, procurando outros experimentadores corrigir-lhe os defeitos, mas seguindo os principios do aproveitamento da sensibilisadora e da alexina encontradas normalmente nos sôros não aquecidos.

Surgem em seguida as modificações á reacção de *Hecht*.

Dos primeiros methodos apparecidos para corrigir os defeitos do de Hecht, deve-se apontar o de *Margaret Stern* (3), que, embora usando o complemento natural do sôro fresco, lança mão systematicamente do sôro hemolytico anti-carneiro. Corrigia assim um dos defeitos do methodo de *Hecht*, o qual forçosamente teria que dar reacções positivas falsas com os sôros pobres em hemolysinas naturaes, mas nos sôros ricos em amboceptores o complexo hemolytico ficaria muito forte.

As doses de antigeno e de globulos de carneiro usados por *Marg. Stern*, eram menores do que as empregadas na reacção de *Wassermann*.

Em estudos comparativos feitos entre o seu e os methodos de *Wassermann*, de *Hecht* e de *Bauer*, *Stern* achou o seu methodo mais sensivel. Comtudo, ha neste methodo um ponto a corrigir, como acabamos de assignalar: o seu complexo hemolytico, que é muito forte.

Levaditi e *Latapie* (4) introduziram a seguinte modificação á reacção de *Hecht:* tomavam apenas tres tubos, pondo em todos elles 0,1 do sôro fresco a examinar, no primeiro tubo 0,1 de antigeno (de figado de heredo syphilitico), no segundo 0,2 de antigeno, completando em todos os tubos a quantidade de 0,4 com o que faltar com agua physiologica a 8 °/∞. Em seguida agitavam e punham na es-

---

(1)—Deutsche, 1908, n.º 16, p. 698.

(2)—Wiener Klinische Wochenschrift, 1908, p. 1742; 1909, p. 265, 883; 1910, Zeit. f. Immun. p. 572.

(3)—Zeitschrift für Immunistatsforschung, 1909, vol. 1, n.º 3, p. 422.

(4)—La Presse Médicale, 1910, 16 Avril, p. 276; 1911, 4 Novembre, p. 889.

tufa a 37° durante uma hora e meia, juntando depois 0,1 de globulos de carneiro a 5 °/° em cada tubo. Repostos na estufa, fazem a leitura dos resultados quando a hemolyse é completa no terceiro tubo testemunha. Não se dando a hemolyse no tubo testemunha, as causas seriam devidas á insufficiencia do sôro em complemento, ou á sua pobreza em sôro hemolytico. No caso de pobreza de sôro hemolytico, juntavam 0,1 de amboceptor de coelho anti-carneiro préviamente dosado; não havendo ainda hemolyse no tubo testemunha, ha probalidade de faltar complemento no sôro, e neste caso levavam todos os tubos mais 0,1 de complemento de cobaio diluido ao quinto.

Acham os A. A. que a primeira modificação dá indicações precisas em mais de 90 °/° dos casos.

M. Weinberg (1), no seu methodo exposto sob o titulo de "Technica racional da reacção de fixação", basea-se no prolongado estudo que fizéra das propriedades hemolyticas e anti-hemolyticas dos sôros e estuda dois processos: um rapido, de technica simplificada, usando sôros activos; outro lento, com sôros aquecidos.

A nós só nos interessa o primeiro processo, com sôros não aquecidos, e só delle falaremos.

Weinberg procedia da seguinte maneira, no processo rapido: usava 16 tubos, dos quaes 10 para determinar o indice hemolytico do sôro a examinar e seis para a reacção propriamente dita. Determinava o indice hemolytico collocando 0,1 de sôro fresco em cada um dos 10 tubos e doses crescentes de globulos de carneiro a 5 °/° de 0,1 a 1 c. c., completando o volume de 1, 2 c. c. com agua physiologica. Em todos os 6 tubos da reacção era collocado 0,1 do sôro fresco a examinar e nos tubos 1 e 4—0,1, e nos tubos 2 e 5—0,2 de antigeno, que não é collocado nos tubos 3 e 6; completavam o volume em cada tubo com agua physiologica para 0,4. Depois de uma hora na estufa a 37°, juntavam 0,1 de globulos nos tubos 1, 2 e 3, e 0,2 de globulos nos tubos 4, 5 e 6, lendo o resultado após mais meia hora na estufa a 37°. A reacção dos tres primeiros tubos, é, portanto, repetida nos outros tres tubos, com o dobro da quantidade de globulos.

Os tubos para a determinação do indice hemolytico são collocados na estufa ao mesmo tempo que os tubos da realção, e a leitura, após uma hora.

A parte verdadeiramente interessante do methodo de *Weinberg* é que a sua verificação do indice hemolytico do sôro não serve para determinar a quantidade de globulos a juntar á reacção, processo este ao qual confluem os autores, mas sim para julgar do valor das reacções negativas ou positivas.

Busila (2) recorre ao sôro de cobaio para corrigir os sôros frescos com poder hemolytico insufficiente, fazendo a reacção no mesmo dia da extracção do sangue. Usa tambem o sôro hemolytico no segundo tempo da reacção, quando este fôr necessario.

Chabanier, M.lle Lebert e *L. M. Bétancês* (3) fazem a reacção em dois tempos, utilisando-se dos sôros activos: no primeiro tempo,

---

(1)—Annales de L'institut Pasteur, 1912, p. 424.
(2)—La Presse Médicale, 1915, 23 Septembre.
(3)—Comptes rendus de la Soc. de Biol., 1917, 2 de Juin.

verificam se no complexo hemolytico existe quantidade sufficiente de complemento e de sensibilisadora anti-carneiro; no segundo, realisam a reacção de fixação, se possivel, utilisando apenas as propriedades naturaes do sôro, e no caso de carencia de complemento, ou de sensibilisadora, juntam complemento de cobaio, ou sensibilisadora anti-carneiro. E' uma technica tambem permittindo fazer a reacção em qualquer sôro não aquecido, juntando, confórme a indicação do primeiro tempo da reaccão, que é feita apenas em dois tubos, só sensibilisadora, ou só complemento se um destes faltar, ou nada juntando se existirem em dóse sufficiente.

Tribondeau (1), na sua variante ao processo de *Hecht*, acha que a determinação do indice hemolytico para depois serem juntados os globulos á reacção é mais morosa e complicada, e diz que a póde substituir por um simples exame dos tubos testemunhas feito 1/4 de hora depois da distribuição dos globulos de carneiro.

A sua reacção é feita em 5 tubos, usando como antigeno os lipoides de *Noguchi* em emulsão a 1 para 60: no tubo 1, tubo testemunha, não váe antigeno, juntando 0,8 de agúa physiologica e 0,1 do sôro a examinar: no segundo tubo, 0,8 da emulsão do antigeno e 0,1 do sôro: no terceiro tubo, 0,4 de antigeno, 0,4 de agua physiologica e 0,1 do sôro; no quarto tubo, 0,2 de antigeno, 0,6 de agua physiologica e 0,1 do sôro, pondo no ultimo tubo 0,1 de antigeno, 0,7 de agua physiologica e sempre a mesma quantidade do sôro fresco a examinar, isto é, 0,1.

Agita e põe na estufa a 37°, durante uma hora.

Addiciona em seguida 0,1 de globulos de carneiro a 5 °/°. Agita e repõe na estufa. Após 15 minutos examina os tubos testemunhas, marcando com uma cruz aquelles em que a hemolyse não fôr completa. Repõe tudo na estufa donde retira definitivamente no fim de mais 1[illegible] minutos.

Na leitura dos resultados, as reacções em que o tubo testemunha não estiver marcado com uma cruz, só serão levados em conta os tubos de diagnostico em que houver hemolyse, sendo considerados como hemolyse total toda a hemolyso parcial. Nas reacções em que o tubo testemunha estiver marcado com uma cruz, só tem valor o resultado negativo.

Com os sôros insufficientemente hemolyticos, a reacção póde ser reforcada com sôro humano negativo dosado.

O processo de *Tribondeau* tambem é passivel de erros. A pequena e fixa quantidade de globulos será violentamente hemolysada com os sôros ricos em hemolysinas, não revelando as reacções fracamente positivas.

Ronchèse (2) procura corrigir o inconveniente da presença ás vezes encontradas no sôro humano de dose muito forte de sensibilisadora natural. Dósa a alexina natural juntando apenas a quantidade justa de sensibilisadora hemolytica. Não usa a sensibilisadora hemolytica anti-carneiro, mas sim systema hemolytico anti-humano.

Diz *Ronchèse* que o seu methodo é o primeiro que realisa a uni-

---

(1)—Comptes rendus de la Soc. de Biol., 1917, 16 de Juin.

(2)—La presse Médicale, 1917, n.° 70, p. 712.

formidade do valor do complexo—complemento mais hemolysina. Basea-se no supprimento ou substituição reciproca do complemento e da hemolysina.

Ha tambem uma outra variante de *Ronchèse* ao methodo de *Hecht* no caso de não se dispôr de sôro de coelho anti-homem, indispensavel ao seu systema hemolytico anti-humano. Acha que quando o complemento é o proprio do sôro a examinar, a quantidade de sôro póde variar sem isto importar na intensidade da reacção: "A fracção do complemento fixado é unicamente funcção da dose de antigeno e do estado physico-chimico do sôro". Isto auctorisa a variar a quantidade de sôro até obter o poder hemolytico desejado.

Alfred Bauer e *Hallion* (1) determinam preliminarmente a força hemolytica dos sôros juntando quantidades variaveis de globulos de carneiro.

M. Rubinstein (2) modifica a technica de *Hecht*, usando 6 tubos, todos com 0,1 de sôro fresco, dos quaes: 3 só servem para determinar o titulo hemolytico do sôro com 0,1-0,2 e 0,3 de globulos de carneiro a 5 °/°; os outros 3, tambem com as mesmas quantidades de globulos dos tubos anteriores, determinam o titulo hemolytico em presença do antigeno, ao mesmo tempo que dão os resultados da sôro-reacção. A idfferença que existir entre o titulo hemolytico determinado nas duas séries de tubos indicará o poder anti-complementar do antigeno.

A reacção é negativa quando ha mais ou menos igual titulo hemolytico entre o da mistura sôro mais antigeno e o titulo hemolytico do sôro; e é positiva quando o titulo hemolytico fôr elevado e o impedimento da hemolyse se der no primeiro tubo da reacção.

Quando a reacção mostrar igualdade de titulos nas duas séries de tubos, ella deve ser considerada como suspeita.

Telmon (3) acha que se deve supprimir o excesso nocivel de complemento procurando conservar a dóse util.

Examina o sôro após 48 horas na temperatura ambiente para verificar a sua riqueza em complemento, o que faz em um só tubo: agua physiologica 0,4, mais sôro a examinar 0,1. Põe o tubo na estufa a 37°, durante hora e meia. Junta depois 0.1 de globulos de coelho a 6 °/°, repondo o tubo na estufa. Váe verificando o numero de minutos que são necessarios para a hemolyse total. Os sôros que hemolysarem em menos de 5 minutos são considerados como ricos em complemento, sendo experimentados doze a vinte e quatro horas depois. Quando a hemolyse se dér de sete minutos para mais, póde ser feita a reacção.

A reacção é feita em 4 tubos, todos com 0,1 de sôro: os tubos 2, 3 e 4 com 0,1-0,15 e 0.2 de antigeno, completando o volume de 0,5 com agua physiologica. Estufa durante hora e meia; depois, em cada tubo, 0,1 de globulos de coelho a 6 °/°. A leitura é feita quando o tubo testemunha estiver completamente hemolysado. Centrifuga e lê o grau de hemolyse dos tubos da reacção.

---

(1)—Sémaine Médicale, 1911, n.° 9, p. 106.
(2)—Comptes rendus Soc. Biol., 20-1-917.
(3)—La Presse Médicale, 1917, n.° 40, p. 411.

Telmon não discute a questão dos sôros incapazes de hemolysar 0,1 de globulos e o seu processo é impraticavel para quem faz grande numero de reações de uma vez, pois terá que levar mais de 5 minutos para juntar os globulos em todos os tubos e a leitura ainda será mais demorada.

A falta de bom éxito assignalada na reacção de *Hecht* e suas modificações corre por conta, principalmente, por não levarem uns em consideração o desigual poder hemolytico dos sôros frescos, outros por não aproveitarem a determinação do indice hemolytico para variar a addicção de globulos a cada sôro nos tubos de reacção, technica esta que nos parece a melhor.

Este ultimo processo foi adoptado por *Gradwohl* (1), que só usa sôros activos e recentes, aproveitando-lhes o complemento e as hemolysinas naturaes.

Pela technica de *Gradwohl*, são precisos 14 tubos, dos quaes, os 10 primeiros para a determinação do indice hemolytico e os 4 ultimos para a reacção propriamente dita. Nos 10 primeiros tubos põe-se 0,1 do sôro a examinar em cada um, em seguida globulos de carneiro a 5 °/° de 0,1 a 1 c. c., juntando-se agua physiologica para igualar a quantidade de liquido que deverá ser de 1, 2 c. c. em todos os tubos. Os tubos são levados ao banho maria, onde permanecem meia hora, lendo-se a maior quantidade de globulos hemolysados, que será o indice hemolytico do sôro.

Em seguida é feita a reacção addicionando-se a cada um dos 4 tubos restantes 0,1 do sôro a examinar; recebendo os tres primeiros tubos 0,1-0,15 e 0,2 do antigeno dosado; o quarto tubo fica como testemunha do sôro. Em seguida juntam-se os globulos de accordo com o indice hemolytico determinado, completa-se o volume dos tubos com agua physiologica, agita-se, deixando-se em banho maria a 37°, durante 30 minutos.

Gradwohl não accrescenta em cada tubo da reacção e ao tubo testemunha a quantidade justa de globulos determinada pela dosagem. Sendo o indice igual a 4, será addicionado 0,1 de globulos: estando o indice entre 5 e 7, utilisa 0,15; utilisando 0,2 quando estiver entre 8 e 10. O indice sendo superior a 10, a dosagem é repetida e os globulos usados proporcionalmente ao indice obtido.

J. A. Kolmer (2) faz a diluição de globulos de carneiro a 5 °/° retirando os globulos do deposito do tubo centrifugador, o que torna a diluição mais concentrada do que commumente se usa. A determinação do indice hemolytico e a reacção são feitas ao mesmo tempo. Conhecido o indice hemolytico *Kolmer* junta os globulos aos tubos de reacção e testemunha, como faz *Mutermilch* na technica do Instituto Pasteur de Paris, e que adiante veremos.

Muitas outras technicas de sôro diagnostico da syphilis, com sôro activo, poderiamos citar, mas apenas apontamos as principaes.

Todas ellas procuram corrigir a variabilidade do poder hemolytico natural dos sôros frescos, que em uns é muito forte, em outros até ausente: e, sem um complexo hemolytico bem dosado, perde todo o valôr qualquer reacção de desvio de complemento.

---

(1)—American Journal of Syphilis, 1917, f. I. p. 450.

(2)—Infection, Immumty and Specific Therapy, 2.ª ed., 1917.

Tratando-se de methodos rapidos, methodos de simplificação, propende naturalmente a nossa sympathia para aquelles que no limite do possivel reunam a simplicidade á precisão.

O uso exclusivo do proprio sôro humano negativo para corrigir o poder hemolytico fraco ou ausente de alguns sôros—parece-nos ser o melhor, evitando assim de introduzir albuminas extranhas na reacção; e é facil esse processo por ser commum fazer-se de uma só vez muitas reacções, quasi sempre existindo alguns sôros negativos que poderão ser immediatamente empregados nesses raros casos.

A techniça actualmente usada no Instituto Pasteur de Paris, por *Mutermilch*, para o sôro diagnostico da syphilis, com sôro activo, é, a nosso ver, uma das melhores technicas que conhecemos, razão pela qual vimos apresentar os resultados da nossa investigação sobre o seu valor, confrontando-a com a reacção de *Warssermann*.

Antes, porém, vamos relatar o papel saliente obtido por esta reacção na conferencia realizada em Copenhague, em 1923, sob o patrocinio da Sociedade das Nações.

II

UM TORNEIO DE SÔRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS

Sob a egide da Sociedade das Naçoes, realisou-se no Instituto Sôrotherapico de Copenhague, de 19 de Novembro a 3 de Dezembro de 1923, uma conferencia com o fim de estudar os differentes methodos de sôro diagnostico da syphilis.

Nessa assembléa de technicos estavam representados os mais notaveis Institutos do mundo pelos seus maiores luminares.

Eis a lista dos que compareceram e tomaram parte nas pesquizas:

Dr. Harrison, Dr. Wyler—Medical Research Council de Londres.

Prof. Hirszfeld, Mme. Milinska—Instituto de Hygiene de Varsovia.

Prof. Madsen, M. Moerch—Instituto Sôrotherapico de Copenhague.

Dr. Meinicke, Mme. Meinicke—Instituto das Molestias do Pulmão, Westphalia.

Prof. Mueller, Mme. Berckzeller, Dr. Brandt—Laboratorio de sôro Diagnostico de Allgemeines Krankenhaus de Vienna.

Dr. Mutermilch—Instituto Pasteur de Paris.

Prof. Otto, Dr. Mumter—Instituto R. Koch de Berlim.

Dr. Renaux, Mlle. Jobart—Instituto Pasteur de Bruxellas.

Prof. Sachs, Dr. Klopstock—Instituto para o estudo do cancer de Heildelberg.

Em numeros mais ou menos iguaes de sôros foram feitas reacções de fixação de complemento com sôros inactivados e sôros frescos, e reacçoes de floculação: *Sachs-Georgi*, sigma reacção, D. M. (terceira modificação de *Meimicke*) e o seu novo methodo M. T. R. (Meinicke Trübungs-Reaktion).

As reacções com sôros frescos foram feitas unicamente por *Mutermilch.*

Nas reacções de fixação de complemento só *Mutermilch* e *Renaux* usaram extracto alcoolico de coração de vitello exgotado pela acetona (antigeno de *Bordet* e *Ruelens*).

Todos os outros experimentadores empregaram antigenos cholesterinados e extractos de figado heredo-syphilitico.

As reacções de floculação foram executadas pela technica dos seus autores e com extractos por elles fornecidos.

Mutermilch, fazendo, na Presse Médicale (1), um apanhado dos resultados a que chegaram os diversos experimentadores e relatando as conclusões da conferencia, aborda questões que assim resumimos:

1)—Dos 5 methodos empregados, qual foi o mais sensivel?

2)—Dos methodos usando o desvio do complemento, qual o mais sensivel, o de sôro aquecido, inactivado, ou o de sôro não aquecido, sôro activo?

3)—Quaes os extractos que deram melhores resultados? Houve vantagem no emprego de varios extractos?

1—Tirada a porcentagem das reacções positivas pelo methodo do desvio do complemento e pelos methodos de floculação, o resultado foi o seguinte: nas reacções por desvio do complemento deram resultado positivo 56 a 63 °/°; nas de floculação: reacção de *Sachs-Georgi,* 48 a 56 °/°; sigma-reacção, 40 a 50 °/°, terceira modificação de *Meinicke,* 30 a 51 °/°; com a M. T. R. as reacções positivas foram de 45 a 54 °/°.

Deante desses numeros a *conclusão tirada pela conferencia foi que as reacções que usaram a fixação do complemento mostraram-se mais sensiveis do que as reacções de floculação.*

2—*Mutermilch* reuniu no quadro abaixo o numero de reacções positivas de 4 experimentadores que examinaram mais ou menos igual quantidade de sôros.

QUADRO Nº 1

	Total	Numero das reacções positivas	Porcentagem das reacções positivas.
Hirzsfeld	178	101	56,7%
Madsen	179	80	44,7%
Mutermilch	178	112	62,9%
Renaux	179	101	56,3%

Vê-se claramente nesse quadro que a maior porcentagem de reacções positivas foi obtida por *Mutermilch,* com sôros activos (62,

(1)—La Presse Médicale, n.º 65, 13 Aout, 1924.

9 °/°), notando-se que todos esses casos eram de syphilis clinicamente diagnosticada. *A conferencia registou* esse facto, deixando affirmado *que o methodo do Instituto Pasteur de Paris (Mutermilch, sôros frescos), deu, nos casos de syphilis verificada, um numero de resultados positivos mais elevado do que os methodos utilisados pelos outros pesquizadores.*

Com a technica usada por *Mutermilch* houve tres casos de reacções fortemente positivas e dois casos de reacções fracamente positivas, que por todos os outros methodos foram negativas.

Tendo já a conferencia assignalado officialmente que a technica do Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos, foi mais sensivel, por essa razão poder-se-ia tambem admittir ser ella a unica capaz de revelar esses cinco casos, talvez de syphilis ignorada. Comtudo, no protocollo official da conferencia, foi accrescentado: "O processo utilisando o sôro activo (technica praticada no Instituto Pasteur de Paris) é suspeito de dar resultados não especificos em numero mais elevado do que as outras technicas. Deve-se, por consequencia, submette-la a uma experiencia ulterior, principalmente com sôros tomados depois de um tempo bastante prolongado antes da experiencia".

Diz *Mutermilch*, no artigo que estamos resumindo, que muitos membros da conferencia acharam ter sido elle beneficiado por ter obtido todos os sôros recentemente colhidos, ao que responde com as seguintes palavras: "é exacto, que os sôros muito velhos, não inactivados, têm uma ligeira tendencia a se tornarem positivos, devido a uma labilidade das globulinas que se produz no fim de certo tempo. mas esta tendencia não começa a se manifestar senão no fim de 15 a 20 dias, o que praticamente é sem interesse".

3)—Como acima ficou declarado, só *Mutermilch* e *Renaux* usaram o antigeno de Bordet, ao passo que os outros experimentadores lançaram mão de mais de um antigeno e antigenos cholesterinados. No entanto, como vemos no quadro 2 (*), resumo das reacções de desvio do complemento, os resultados desses dois pesquizadores foram iguaes ou superiores aos dos outros.

(*) Como o quadro anterior, este foi retirado do trabalho de Mutermilch, já citado.

QUADRO Nº 2

	Total	+	—	±	% +	% —	% ±
Harrison	144	86	51	7	59,7	35,4	4,9
Hirzsfeld	178	101	72	5	56,7	40,4	2,8
Madsen	179	80	87	12	44,7	49,1	6,2
Mutermilch	178	112	61	5	62,9	34,3	2,8
Muller	165	97	60	8	58,9	36,3	4,8
Otto	148	76	62	10	51,3	41,9	6,8
Renaux	179	101	70	8	56,3	39,1	4,6
Sachs] Meinicke	75	35	36	4	46,6	48.0	5,4

+: reacção positiva; ±: reacção duvidosa —: reacção negativa.

A conferencia assignalou esses factos declarando *que os extractos de coração forneceram melhores resultados e que os resultados obtidos pelos methodos baseados em muitos extractos não se mostraram superiores aos que usaram um só.*

III

A TECHNICA DE SÔRO DIAGNOSTICO DA SYPHILIS, COM SÔROS ACTIVOS, EMPREGADA NO INSTITUTO PASTEUR DE PARIS, POR MUTERMILCH.

A reacção é feita em 6 pequenos tubos: 3 para a reacção de fixação e os outros 3, collocados atraz, para a determinação do indice hemolytico.

Os tubos da reacção recebem: o primeiro, 0,1 de antigeno, 0,2 de agua physiologica e 0,1 do sôro a examinar; o segundo, 0,2 de antigeno, 0,1 de agua physiologica e 0,1 do sôro; o terceiro tubo recebe 0,1 do sôro e 0,3 de agua physiologica, servindo de testemunha.

Nos 3 tubos para a determinação do indice hemolytico vão 0,3-0,6 e 0,9 de globulos de carneiro a 5 °/° e 0,1 do sôro em cada um.

Depois de bem agitados todos os tubos, vão para a estufa a 37°, onde permanecem uma hora e meia.

Faz-se em seguida a leitura do indice hemolytico do sôro para serem juntados aos tubos da reacção quantidades variaveis de globulos de accôrdo com esse indice, que é igual á maior quantidade de globulos capaz de hemolysar. Assim, se 0,1 do sôro hemolysar no maximo 0,6 de globulos, o indice hemolytico será igual a 6. Mas

Mutermilch não manda juntar aos tubos da reacção senão a terça parte do indice determinado. Se 0,1 do sôro hemolysar 0,3 de globulos, será juntado nos 3 tubos apenas 0,1 de globulos. Se 0,1 do sôro hemolysar 0,6 de globulos, será juntado 0,2 de globulos, juntando-se 0,3 de globulos quando o indice hemolytico fôr igual a 9.

E' cautelosa a determinação de *Mutermilch* de só juntar a terça parte de globulos do indice determinado, devido ao rapido enfraquecimento do poder alexico do sôro durante a sua permanencia na estufa. Já vimos tambem ser esse mais ou menos o criterio seguido por *Gradwol*.

QUADRO Nº 3

Determinação do indice hemolytico do sôro.

Tubos	Sôro a determinar o indice.	carneiro a 5% Globulos de
1	0,1	0,3
2	0,1	0,6
3	0,1	0,9

QUADRO Nº 4

Reacção.

	Antigeno	Sôro não aquecido	Agua physiologica	Uma hora e meia na estufa a 37º	Conforme o indice hemolytico fôr igual a 0,3 0,6 ou 0,9 de globulos, juntar a cada tubo :	Meia hora na estufa a 37º
1	0,1	0,1	0,2		0,1-0,2 ou 0,3	
2	0,2	0,1	0,1		0,1-0,2 ou 0,3	
3	—	0,1	0,3		0,1-0,2 ou 0,3	

Ha casos de indice hemolytico igual a zero, isto é, 0,1 de sôro não ser capaz de hemolysar nem 0,1 de globulos, o que se poderá verificar fazendo a determinação do indice como vimos atraz quando tratamos da technica de Weinberg.

Em um estudo que *Weinberg* (1) fez em 400 sôros, encontrou 9 com indice hemolytico igual a zero; em 23 °/° não passou de 3; 50 °/° dos casos o indice foi de 4 a 7; em 10 °/°, de 10 a 11, sendo que muito raramente o indice foi encontrado mais elevado.

Laredde e *Rubinstein* tambem determinaram o indice hemolytico em 1223 sôros, tendo encontrado 4, 7 °/° de indice igual a zero,

(1)—Loc. cit.

14, 3 °/° de indice igual a tres, 9, 9 °/° de indice igual a seis, 3, 7 °/° de indice igual a nove e 2, 6 °/° de indice igual a dez.

Tambem *Verbizier* e *Marchand*, em trezentos casos, obtiveram os seguintes resultados: 12, 33 °/° de indice igual a zero, 13, 6 °/° de indice igual a tres, 9 °/° de indice igual a seis e 7, 6 °/° de indice igual a oito. Estes A. A. liam a hemolyse após meia hora apenas na estufa, razão pela qual obtiveram maior porcentagem de indice hemolytico igual a zero.

Pela technica do Instituto Pasteur de Paris, descripta por *Levadite* e *Latapie* em 1910, nos casos de insufficiencia hemolytica natural dos sôros usavam alexina de cobaio, ou sensibilisadora de coelho, ou ambas, confórme o que determinasse o exame prévio a que eram submettidos os sôros. Não assim actualmente: *Multermilch usa, com os sôros de indice hemolytico inferior a* 3, *systematicamente do proprio sôro humano fresco negativo, préviamente dosado.*

Para isso toma-se um sôro negativo ou a mistura dos sôros negativos das reacções que se acabam de fazer. Dilue-se a mistura ao meio, ao quarto, ao oitavo, etc., com agua physiologica, procedendo-se a uma reacção para cada diluição, só modificando a quantidade de globulos a juntar no segundo tempo, que será sempre 0,1, como se vê no quadro n.° 5.

QUADRO Nº 5

Dosagem de uma mistura de sôros humanos negativos frescos.

Tubos	Antigeno	Agua physiologica	Mistura de sôros ½	Mistura de sôros ¼	Mistura de sôros ⅛	Uma hora e meia na estufa a 37°	Globulos de carneiro a 5 %	Meia hora na estufa a 37°.
1	0,1	0,2	0,1	—	—		0,1	
2	0,2	0,1	0,1	—	—		0,1	
3	—	0,3	0,1	—	—		0,1	
4	0,1	0,2	—	0,1	—		0,1	
5	0,2	0,1	—	0,1	—		0,1	
6	—	0,3	—	0,1	—		0,1	
7	0,1	0,2	—	—	0,1		0,1	
8	0,2	0,1	—	—	0,1		0,1	
9	—	0,3	—	—	0,1		0,1	

Depois de dosado o sôro ou a mistura de sôros diluidos, cujas substancias hemolyticas vão ser utilisadas, toma-se seis tubos, servindo os tres primeiros como testemunhas e os tres ultimos para a reacção. Nos tres tubos testemunhas a unica modificação da distribuição exposta no quadro 2, é que em vez de 0,1 do sôro a exami-

nar colloca-se 0,1 da mistura dos sôros cuja maior diluição produziu hemolyse na dosagem que acabamos de ver, e a quantidade de globulos que é sempre 0,1. Nos tres tubos da reacção a distribuição é a mesma dos tubos testemunhas, juntando-se 0,1 do sôro a examinar além de 0,1 do sôro dosado diluido ao maximo e menos 0,1 de agua physiologica em cada tubo para uniformisar a quantidade de liquido.

QUADRO Nº 6

Tubos	Antigeno	Sôro a examinar	Mistura de sôros diluida ao maximo	Agua physiologica	Uma hora e meia na estufa a 37°	Globulos de carneiro	Meia hora na estufa a 37°
1	0,1	—	0,1	0,2		0,1	
2	0,2	—	0,1	0,1		0,1	
3	—	—	0,1	0,3		0,1	
4	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	
5	0,2	0,1	0,1	—		0,1	
6	—	0,1	0,1	0,2		0,1	

Havendo hemolyse nos tres tubos testemunhas o resultado da reacção pode ser lido definitivamente; no caso contrario, não se dando hemolyse nesses tubos, a reacção terá que ser repetida, sendo que a unica modificação a fazer na distribuição do quadro 6, é substituir a quantidade do sôro hemolytico diluido ao maximo por uma quantidade duas vezes maior. Assim, se no primeiro caso foi usado 0,1 da diluição ao quarto, deve ser usado depois 0,1 da diluição ao meio. Convém, para se não perder muito tempo, fazer de uma vez a reacção com essas duas doses do sôro hemolytico humano dosado.

Com o liquido cephalo rachidiano a reacção pode ser feita da mesma maneira que com os sôros destituidos de poder hemolytico. Só ha a considerar que, sendo o liquido cephalo rachidiano póbre em anti-corpos especificos, a quantidade usada deverá ser muito maior que a de sôro: 0,3-0,5 a 1 c. c., como aconselha o autor da reacção.

QUADRO Nº 7

Tubos	Antigeno	Liquido cephalo rachidiano	Mistura de sôros diluida ao maximo	Agua physiologica	Uma hora e meia na estufa a 37°.	Globulos de carneiro	Meia hora na estusa a 37°.
1	0,1	0,3 a 1cc.	0,1	0,1		0,1	
2	0,2	0,3 a 1cc.	0,1	—		0,1	
3	—	0,3 a 1cc.	0,1	0,2		0,1	

Preparo do antigeno. O antigeno aconselhado é o de *Bordet* e *Ruelens*, ligeiramente modificado e que para aqui transcrevemos do trabalho de *Mutermilch*: moer 100 grammas de coração de vitello, juntar 125 c. c. de acetona e deixar em contacto um a dois dias na temperatura ambiente; eliminar a acetona por filtração em papel, juntando de novo 200 c. c. de acetona. Deixar na temperatura ambiente seis a ouito dias agitando todos os dias. Filtrar novamente e pôr mais um pouco de acetona fresca durante um a dois dias. Filtrar e seccar o tecido cardiaco na estufa a 37°. Addicionar em seguida 200 c. c. de alcool a 95°, deixando agir durante 10 a 12 dias na temperatura ambiente, agitando todos os dias. Filtrar.

A emulsão do antigeno deve sempre ser feita juntando-se a agua ao antigeno gotta a gotta, agitando-se constantemente.

A diluição aconselhada é a de 1/20, mas *Mutermilch* só considera como bom o antigeno que em diluiçoes concentradas (1/5) não dê resultados positivos com sôros negativos, e que em altas diluições (1/160 ou 1/320) dê ainda reacções positivas com os sôros syphiliticos.

O antigeno deve ser experimentado em todas essas diluições com sôros positivos e negativos.

Os antigenos usados nas nossas reacções foram experimentados nas diluições de 1/10 até 1/200, com sôros fortemente positivos e com sôros negativos, dando bons resultados.

Devido á actividade desigual de alguns corações, sempre usamos no preparo de um antigeno, quer seja elle para a reacção de *Wassermann* ou para alguma reacção de floculação, de seis a nove corações, seguindo o conselho dos que mais estudaram o assumpto (*Noguchi, Coca* e *L'Esperance*, etc.). E assim preparamos o antigeno de *Bordet* e *Ruelens*, que nos serviu.

IV

CONFRONTO COM A REACÇÃO DE WASSERMANN

Fizemos, como se vê no quadro 8, duzentas e cincoenta reacções, confrontando o methodo de sôro activo usado no Instituto Pasteur de Paris, por *Mutermilch*, com a reacção de *Wassermann*.

Damos na parte referente á reacção de *Mutermilch* o resultado da leitura do indice hemolytico de cada sôro. Onde houve apenas hemolyse parcial, ou ausencia de hemolyse com 0,3 de globulos, assim como nos liquidos cephalo rachidianos, a reacção foi feita com uma mistura de sôros negativos dosada segundo recommenda o methodo; em seguida vê-se o resultado da reacção com 0,1 e 0,2 de antigeno. Na parte do quadro que trata da reacção de *Wassermann*, damos os resultados obtidos com os dois antigenos por nós usados.

QUADRO Nº 8

	Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.						Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
					Bordet e Ruelens			
		0,3	0,6	0,9	0,1	0,2	Bordet e Ruelens	Noguchi
1	P. R. — 27-6-925	H	H	H	—	—	—	—
2	H. — 27-6-925	H	Hp	0	++++	++++	++++	++++
3	R. F. — 27-6-925	H	Hp	0	—	—	—	—
4	A. G. — 27-6-25	H	H	H	—	—	—	—
5	J. S. — 27-6-925	H	H	H	—	—	—	—
6	4615 — 15 7 925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
7	4628 — 15-7-925	H	H	H	—	—	—	—
8	4610 — 15-7-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
9	4614 — 15-7-925	H	H	H	—	—	—	—
10	4660 — 17-7-925	H	H	H	++	++	++	++
11	4637 — 17-7-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
12	4648 — 17-7-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
13	4661 — 17-8-925	H	H	Hp	—	—	—	—
14	M. B. — 17-7-295	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
15	M. C. — 17-7-925	H	H	H	+++	++++	+++	+++
16	5018 — 31-7-925	H	H	H	—	—	—	—
17	4958 — 31-7-925	H	H	Hp	—	—	—	—
18	4966 — 31-7-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
19	4967 — 31-7-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
20	R. V. — 7-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
21	M. A. — 7-8-925	0	0	0	—	—	—	—
22	G. V. — 14 8-925	H	H	H	—	—	—	—
23	F. G. — 14-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
24	R. P. A. — 14-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
25	A. F. — 14-8-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
26	1037 — 14-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
27	C. C. S. — 21-8-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
28	P. R. — 21-8 925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
29	F. R. — 21-8-925	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
30	O. M. — 21-8-925	H	H	Hp	—	—	—	—
31	M. D. — 11-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—

	Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos						Pela reacção de Wassermann	
	NOMES	Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
					Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
		0,3	0,6	0,9	0,1	0,2		
32	S. S. — 11-9-925	Hp	Hp	0	++++	++++	++++	++++
33	F. P. — 11-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
34	R. M. — 11-9-925	H	Hp	Hp	+++	++++	++	++
35	M. G. — 4-(-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
36	E. J. — 4-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
37	F. C. — 4-9-925	Hp	Hp	0	++++	++++	++++	++++
38	J. P. — 4-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
39	E. A. — 4-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
40	A. R. — 4-9-925	H	H.	Hp	—	—	—	—
41	O. A. — 4-9-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
42	M. J. — 4-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
43	M. P. — 4-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
44	J. S. — 11-9-9.....	H	Hp	Hp	+++	++++	+++	+++
45	I. V. — 11-9-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
46	M. P. — 11-9-925	H	H	H	—	+	—	—
47	J. A. — 11-9-925	H	Hp	Hp	+	+++	+++	+++
48	C. M. — 11-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
49	M. G. S. — 18-9-925	H	H	H	++++	++++	++++	++++
50	H. M. — 18-9-925	H	Hp	Hp	+++	+++	+++	+++
51	M. E. — 18-9-925	H	H	0	++++	++++	++++	++++
52	F. P. — 18-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
53	E. L. C. — 18-9-925	H	H	Hp	+++	++++	++	++
54	F. S. — 18-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
55	J. L. — 18-9-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
56	O. R. L. — 18-9-925	H	H	Hp	++	+++	++	+
57	F. G. — 18-9-925	Hp	Hp	Hp	+++	+++	++++	++++
58	M. G. — 18-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—

		Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.					Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
	NOMES	0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2		
59	A. J. — 18-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
60	F. C — 18-9-925	H	H	H	++++	++++	++++	++++
61	R. U. — 25-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
62	J. S. — 25-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
63	A. T. — 25-9-925	H	H	Hp	++++	++++	++	+
64	C. C. — 25-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
65	R. M. — 25-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
66	A. A. — 25-9-925	Hp	0	0	++	+++	++	+
67	P. B. C. — 25-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
68	J. B. N. — 25-9-925	H	Hp	Hp	++++	++++	+++	+++
69	P. S. — 25-9-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
70	J. M. L — 25-9-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
71	A. C. — 25-9-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
72	R. S. — 25-9-925	H	H	Hp	—	—	—	—
73	L. R. — 25-9-925	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
74	A. R. S. — 25-9-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
75	C. C. — 16- 10 925	H	H	Hp	—	—	—	—
76	A. M. — 16-10-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
77	J. M. — 16-10-925	H	H	Hp	—	+	—	—
78	N. B. — 16-10-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
79	A. A. — 16 10-925	H	Hp	Hp	+	++	+	+
80	J. P. — 16-10-925	Hp	0	0	—	—	—	—
81	F. G. — 30-10-925	Hp	Hp	0	—	—	—	—
82	C. A. — 30-10-925	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
83	C. M. — 23-10-925	Hp	Hp	Hp	+++	++++	++++	+++
84	J. L. — 23-10-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
85	M. B. — 23-10-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—

		Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.						Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno			Antigenos	
	NOMES	0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens			Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2			
86	G. P. — 23-10-25	Hp	Hp	Hp	++++	++++		++++	++++
87	J. A. — 23-10-925	H	Hp	Hp	—	—		—	—
88	R. S. — 23-10-925	0	0	0	—	—		—	—
89	A. Q. — 23-10-925	Hp	Hp	Hp	—	—		—	—
90	J. M. A. — 23-10-925	Hp	Hp	Hp	+++	++++		+++	+++
91	P. N. — 23-10-925	Hp	Hp	Hp	—	—		—	—
92	R. C. — 23-10-925	0	0	0	—	—		—	—
93 (*)	M. J. P. — 23-10-25	Hp	Hp	Hp	++++	++++		++++	++++
94	699 — 23-10-925				—	—		—	—
95	A. G. — 30-X-925	H	H	H	++++	++++		++++	++++
96	M. F. G. — 3010-25	H	H	Hp	—	—		—	—
97	N. C. — 30-10-925	H	H	Hp	—	—		—	—
98	V. M. — 30-10-925	H	H	H	—	—		—	—
99	O. L. — 30-10-925	H	H	H	—	—		—	—
100	B. R. — 30-10-925	H	H	H	—	—		—	—
101 (*)	J. F. O. — 30-10-925	H	H	H	++	+++		—	—
102	1248 — 30-10-925				—	—		—	—
103	C. N. — 30-10-925.	H	H	H	—	—		—	—
104	M. F. — 6-11-926	H	H	Hp	—	—		—	—
105	L. A. P. — 6-11-925	H	Hp	Hp	—	—		—	—
106	L. R. — 6-11-925	H	Hp	Hp	++++	++++		++++	++++
107	J O — 6-11-925	H	H	Hp	—	—		—	—
108	A. A. — 6-11-925	H	H	H	—	—		—	—
109	C. B. — 6-11-925	0	0	0	—	—		—	—
110	A. D. — 6-11-925	H	H	Hp	—	—		—	—
111	U. — 6-11-925	H	H	Hp	—	+		—	—
112	R. N. B. — 6-11-925	Hp	Hp	Hp	++++	++++		++++	++++

		Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.						Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno			Antigenos	
	NOMES	0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens			Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2			
113	F. — 6-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—		—	—
114 (*)	M. — 6-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—		—	—
115	724 — 6-11-925				—	—		—	—
116	M. C. C. — 13-11-25	H	Hp	Hp	+	+		+	+
117	J. L. P. — 13-11-925	H	H	Hp	++++	++++		++	++
118	B. S. — 13-11-925	H	H	Hp	—	—		—	—
119	J. F. — 13-11-925	H	H	Hp	++++	++++		++++	++++
120	J. F. — 13-11-925	H	H	H	++++	++++		++	++
121	N. S. — 13-11-925	H	Hp	Hp	++++	++++		++++	++++
122	J. M. — 13-11-925	H	H	Hp	—	+		+	+
123	J. B. P. — 13-11-925	H	H	Hp	++++	++++		+ +	++
124 (*)	H. I. — 23-11-925				—	—		—	—
125	U. N. — 27-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—		—	—
126	A. G. C. — 27-11-925	Hp	Hp	Hp	—	—		—	—
127	P. C. — 27-11-925	Hp	Hp	Hp	++	++++		+++	+++
128	F. F. — 27-11-925	0	0	0	—	—		—	—
129	M. L. — 27-11-925	H	H	Hp	—	—		—	—
130	G. O. — 27-11-925	Hp	Hp	0	—	—		—	—
131	M. C. — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—		—	—
132	E. S. — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—		—	—
133	J. L. M. — 27-11-925	0	0	0	—	—		—	—
134	J. F. O. — 27-11-925	H	H	Hp	—	—		—	—
135	79 — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—		—	—
136	B. — 27-11-925	H	Hp	Hp	+++	++++		+++	+++
137	1348 — 27-11-925	H	H	H	—	—		—	—
138	A. N. A. — 27-11-925	H	Hp	Hp	—	—		—	—
139	O. B. C. — 27-11-925	H	H	H	—	—		—	—

		Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.					Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
	NOMES	0,3	0,6	0,9	Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
					0,1	0,2		
140	S. G. — 27-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
141	A. D. — 4-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
142	L. S. — 4-12-925	H	H	Hp	+++	+++	++	++
143	M. P. — 4-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
144	X. B. — 4-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
145	J. A. — 4-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
146	C. G. — 4-11-925	Hp	Hp	Hp	+++	+++	+++	+++
147	J. D. — 11-12-925	H	H	H	—	—	—	—
148	L. M. — 11-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
149	R. G. — 11-12-925	H	H	H	—	—	—	—
150	R. M. — 11-21-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
151	A. J. — 11-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
152	M. F. — 11-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
153	I. M. R. — 18-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
154	E. R. — 18-11-925	H	H	Hp	—	—	—	—
155	O. A — 18-12-925	H	Hp	Hp	—	—	—	—
156	C. O. — 18-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
157	C. F. — 18-12-925	H	H	Hp	+	+	+	+
158	J. D. O. — 18-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
159	1467 — 18-12-925	H	Hp	Hp	++++	++++	+++	++++
160	V. A. — 18-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
161	X. — 18-12-925	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
162	J. R. — 20-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
163	A. M. — 20-12-925	H	H	Hp	++	++	++	++
164	V. A — 20-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
165	A. B. — 20-12-925	H	Hp	Hp	+	+	+	+
166	C. M. — 20-12-925	H	Hp	Hp	—	++	++	+

	NOMES	Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.					Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
					Bordet e Ruelens			
		0,3	0,6	0,9	0,1	0,2	Bordet e Ruelens	Noguchi
167	J.R. — 20-12-925	H	H	H	++++	++++	+	+
168	M. A. D. — 20-12-925	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
169	I. B. — 20-12-925	H	H	H	—	—	—	—
170	P. F. A. — 22-12-925	H	H	Hp	—	—	—	—
171	J. D. G. — 22-12-926	H	H	H	—	—	—	—
172	J. P. — 22-1-926	H	H	Hp	—	—	—	—
173	R. F. C. M. – 22-1-26	H	Hp	Hp	—	—	—	—
174	D. M. — 29-1-926	0	0	0	+	+	+++	+++
175	C. O. — 29-1-926	H	H	0	—	—	—	—
176	A. B. — 29-1-926	H	Hp	0	—	—	—	—
177	A. C. — 29-1-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
178	A. M. — 29-1-926	H	Hp	0	—	—	—	—
179	T. A. S. 29-1-926	Hp	0	0	—	—	—	—
180	A. M. — 29-1-926	Hp	Hp	0	—	—	—	—
181	H. F. S. — 29-1-926	Hp	Hp	0	—	—	—	—
182	A P. N — 29-1-926	H	Hp	0	++++	++++	++++	++++
183	A. B. — 29-1-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
184	A. C. — 29-1-926	0	0	0	+++	++++	+++	++
185	M. P. L. — 29-1-926	Hp	Hp	Hp	—	—	—	—
186	A. B. — 29-1-926	Hp	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
187	M. L. — 29-1-926	H	Hp	Hp	+	+++	—	—
188	F. — 29-1-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
189	J. A. R. — 29-1-926	H	H	0	—	—	—	—
190	C. H. — 29-1-926	H	Hp	0	—	—	—	—
191	V. L. — 29-1-926	Hp	Hp	Hp	+++	+++	+++	+++
192	L. A — 29-1-926	H	0	0	—	—	—	—
193	E. C. — 29-1-926	H	H	H	—	—	—	—

		Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.					Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
	NOMES				Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
		0,3	0,6	0,9	0,1	0,2		
194	H. C. — 29-1-926	H	H	H	—	—	—	—
195	J. R. L. — 12-2-926	H	H	Hp	—	—	—	—
196	R. R. — 12-2-926	H	H	Hp	—	—	—	—
197	M. C. — 12-9-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
198	A. G. — 12-2-926	H	H	H	—	—	—	—
199	H. S. — 12-2-926	Hp	Hp	Hp	++++	++++	+	+
200	R. G. — 12-9-926	H	H	H	—	—	—	—
201	J. D. — 16-4-926	H	H	H	—	+	—	—
202	M. D. — 16-4-926	H	H	H	++	+++	—	—
203	A. D. — 16-4-926	H	H	H	—	—	—	—
204	J. F. S. — 16-6-926	H	H	Hp	—	—	—	—
205	J. C. — 23-4-926	H	H	H	—	—	—	—
206	T. J. — 23-4-926	Hp	0	0	—	—	—	—
207	O. S. — 23-4-926	H	H	H		—	—	—
208	M. D. — 30-4-926	H	H	H	—	—	—	—
209	L. M. — 30-4-926	H	H	H	—	—	—	—
210	A. P. — 30-4-926	H	H	H	—	—	—	—
211	A. R. — 30-4-926	H	H	H	++++	++++	++++	++++
212	F. R. C. — 7-5-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
213	A. C. — 7-5-926	H	H	Hp	—	—	—	—
214	V. M. — 7-5-926.	H	Hp	Hp	—	—	—	—
215	S. B — 7-5-925	H	H	H	—	—	—	—
216	C. T. — 7-5-926	H	H	H	—	—	—	—
217	E. C. — 7-5-926	H	Hp	Hp	—	++	—	—
218	M. S. — 7-5-926	H	H	H	—	—	—	—
219	M. C. — 7-9-926	H	H	Hp	—	—	—	—
220	J. — 18-5-926	H	H	H	—	—	—	—

		Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.					Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
	NOMES				Bordet e Ruelens		Bordet e Ruelens	Noguchi
		0,6	0,6	0,9	0,1	0,2		
221	A. J. C. S. — 18-5-25	H	H	H	++++	++++	++++	++++
222	A. — 18-5-926	Hp	Hp	Hp	++	++++	++	+++
223	J. S. — 21—5—925	H	H	Hp	+++	++++	+	+
224	E. C. — 21-5-926	H	H	H	—	—	—	—
225	V. A. — 21-5-926	H	H	Hp	—	+++	+	+
226	A. M. 21-5-926	H	H	Hp	—	—	—	—
227	E. C. — 21-6-926	Hp	0	0	+++	++++	++	+++
228	K. A. — 21--6-926	H	H	Hp	—	—	—	—
229	J. S. — 21-6-926	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
230	O. F. — 21-6 926	H	H	Hp	—	—	—	—
231	J. G. R. F. — 21-6-26	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
232	W. T. — 28-5-926	H	H	Hp	++++	++++	++++	++++
233	L. O. — 28-5-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
234	B. M. — 28-5-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
235	A. E. — 28-5-926	H	H	Hp	+	++	—	—
236	F. R. — 28-5-926	H	H	Hp	—	—	—	—
237	C. L. — 28-5-926	H	H	Hp	—	++	—	—
238	A. T — 28-6-926	H	Hp	Hp	—	++	—	—
239	O. — 18-6-926	H	H	Hp	—	—	—	—
240	N. — 18-6-936	H	Hp	Hp	—	—	—	—
241	A. A. — 18-6-925	H	H	H	—	—	—	—
242	C A. R. — 25-6-926	H	Hp	Hp	+	+	+	+
243	M. R. — 25-6-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
244	A. A. S. — 2-7-926	H	H	H	++++	++++	++++	++++
245	L. F. — 2-7-926	H	H	Hp	—	—	—	—
246	M. B. — 2-7-926	H	H	H	—	—	—	—
247	M. — 2-7-926	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++

	NOMES	Pela technica actualmente empregada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos.					Pela reacção de Wassermann	
		Indice hemolytico			Antigeno		Antigenos	
					Bordet e Ruelens			
		0,3	0,6	0,9	0,1	0,2	Bordet e Ruelens	Noguchi
248	B. R. — 9-7-926	H	Hp	Hp	++++	++++	++++	++++
249	M. D. — 9-7-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—
250	L. O. — 23-7-926	H	Hp	Hp	—	—	—	—

H: hemolyse; Hp: hemolyse parcial; O: ausencia de hemolyse;
—: reacção negativa; (*) reacções feitas com liquido cephalo rachidiano.

As reacções positivas são assignaladas com uma a quatro cruzes conforme a sua intensidade.

V

DISCUSSÃO

Como acabamos de ver, em duzentos e cincoenta exames feitos ao mesmo tempo pelas reacções de Wassermann e de Mutermilch, 79 (31, 6 °/°) foram positivas na reacção de Wassermann e 90 (36 °/°) na reacção de Mutermilch. E' provavel haver uma maior sensibilidade na reacção de Mutermilch, embora para se fazer semelhante affirmação com segurança precisassemos do controle da clinica.

Se tomarmos as reacções que foram positivas pelos dois methodos, isto é, 79 reacções, vemos que 53 foram consideradas como dando desvio de igual intensidade tanto na reacção de Wassermann como na de Mutermilch, correspondendo o numero de cruzes, embóra na leitura assim praticada haja desvantagem para a reacção de Mutermilch que é feita com um só antigeno nas duas doses de 0,1 e 0,2. Constatamos tambem que dessas 79 reacções, 21 (26, 7 °/°) tiveram mais cruzes na reacção de Mutermilch do que na de Wassermann, e apenas 5 (6, 3 °/°) mostraram-se mais fortemente positivas nesta reacção do que naquella. Portanto, mais uma prova da maior sensibilidade da reacção de Mutermilch, maior sensibilidade tambem assignalada na conferencia de Copenhague, como vimos atraz.

No quadro 9 damos o resumo dos resultados das 250 reacções feitas.

QUADRO Nº 9

	Total	Numero de reacções positivas	Porcentagem de reacções positivas	Maior sensibilidade entre as reacções positivas pelos dois methodos.	Porcentagem de maior sensibilidade entre as reacções positivas pelos dois methodos
Reacção de Wassermann	250	79	31,6%	5	6,3%
Reacção de Mutermilch	250	90	36%	21	26,7%

Apropositado é agóra entrar na discussão do assumpto sem nos estirarmos niamiamente sobre elle.

Para medir o valôr da reacção usada no Instituto Pasteur de Paris, com sôros activos, para o sôro diagnostico da syphilis, foi escolhida a reacção de *Wassermann*, geralmente tida e havida por todos como reacção padrão.

Infelizmente não pudemos verificar se nos casos positivos com sôro activo e negativo no *Wassermann*, de que lado estaria a observação clinica.

A reacção de *Wassermann*, com ser uma reacção de indiscutivel valôr, é feita de maneira differente em cada laboratorio. E' o que

temos visto; cada um de nós se julga no direito de a praticar da maneira que a nossa observação acha ser a melhor, quando não procura faze-la da maneira mais facil. Dahi sobre vindo a discordancia dos resultados de exames feitos ao mesmo tempo em diversos laboratorios e a sua inevitavel consequencia—o descredito da reacção.

Já vimos mesmo escripto sobre a reacção de *Wassermann* "que talvez ella tenha em seu activo mais maleficios do que beneficios, prestados á humanidade". São exaggeros a que chegam todos aquelles que não consideram a relatividade dos factos; embóra imperfeita e de difficil execução devido ás inumeras causas de erro que contornam a sua technica, ella tem grande valôr, embóra deva merecer dos clinicos uma confiança relativa.

Como nos servimos da reacção de *Wassermann* para medir o valor da reacção de *Mutermilch* com sôro activo, torna-se quasi indispensavel que digamos, embóra sumariamente, como ella foi feita.

Não cabe no espaço deste trabalho abordar questões tão discutidas como sejam as inumeras variantes de technica da reacção de *Wassermann*. Apenas diremos que o nosso complexo hemolytico é rigorosamente dosado no momento da reacção.

Como diz *Ronchèse* (1), isso póde ser feito de duas maneiras: usando a mesma dose de complemento, para o que é preciso ser titulado préviamente o sôro de cobaio e juntado á reacção em quantidades diferentes segundo o titulo determinado (*Lerede e Rubinstein*); ou então usar o mesmo volume de sôro de cobaio, sendo que, neste caso, para compensar o poder conplementar tão variavel desse sôro, ajustar o complexo hemolytico com doses variaveis de sôro hemolytico (*Wassermann* e *Lange*).

Geralmente seguimos o primeiro processo: tomamos uma mistura de sôros de 3 a 4 cobaios conservados em jejum e sangrados de manhãn, mistura diluida a 1/10, da qual tomamos doses crescentes (0,1-0,15-0,2-0,25-0,3), respectivamente em cinco tubos, juntamos 1 c. c. de globulos sensibilisados com 3 unidades, inteiramos com agua physiologica o volume de 3 c. c., pomos na estufa a 37° durante 30 minutos, fazendo em seguida a leitura. Tomamos sempre duas unidades complementares. Quando, embóra muito raramente, seriamos forçados a usar mais de 0,5 da diluição dos sôros de cobaios, fazemos, então, nova dosagem do nosso systema hemolytico com o auxilio do segundo processo, augmentando uma ou duas unidades de sôro hemolytico aos globulos já sensibilisados com as tres unidades, repetindo o ensaio anteriormente feito com as mesmas doses crescentes do complemento deluido a 1/10. Regulo de maneira a tomar sempre de 0,3 a 0,4 da diluição a 1/10 da mistura dos sôros dos cobaios, mas sempre duas unidades complementares.

Não tomamos de 0,5 para cima levando em conta as recommendações de muitos (*Sormani, Kaupe, Kretchmer, Lerede* e *Rubinstein*) que acham ser a dose de 0,05 de sôro muito elevada, diminuindo o numero de reacções positivas, tendo Ronchèse (2) procurado demonstrar que neste caso o volume do sôro de cobaio age pela ação neu-

---

(1) La Reaction de Bordet-Wassermann pour le séro-diagnostic de la syphilis. Paris, 1919.

(2) Comptes rendus de la Soc. de Biol., 27 Juillet, 1918.

tralisante das suas albuminas, questão, aliás, muito discutivel. Ainda recentemente o *Dr. Arlindo de Assis* (1), em trabalho "Sobre a influencia da albumina do complemento na dosagem das reacções de fixação", põe em cheque a opinião de Ronchèse que acabamos de citar. Acha que a massa de albumina existente no sôro de cobaio diluido que se usa nas experiencias de fixação é muito pequena para ser responsabilisada como factor capaz de ter influencia na dosagem da reacção de fixação. Das suas experiencias, muito demonstractivas, conclue: "Não nos parece, por isso,, que, nas condições que apresentamos, seja licito imputar á albuminas do sôro complementar a menor influencia na apreciação da intensidade fixadora".

A lei chamada do supprimento ou substituição baseada nos estudos de *Hideyo Noguchi* (2), nos autoriza a seguir as duas maneiras acima espostas de dosar o complexo hemolytico. *Noguchi* verificou que o amboceptor augmenta progressivamente a actividade do complemento; assim, em presença de uma unidade de amboceptor, geralmente é preciso 0,1 de complemento para produzir hemolyse. Ao passo que, empregando-se 4, 8, 20 unidades de amboceptor, póde-se obter o mesmo resultado com 1/3, 1/5 e 1/10 da mesma quantidade de complemento (0,1).

Convem assignalar que este supprimento não se faz de maneira regular, como tambem a diminuição do complemento abaixo de uma certa concentração não póde mais ser compensado por um excesso de amboceptor, e reciprocamente (*Rodet* e *Fabre*).

O nosso *Wassermann* é feito com dois antigenos: o de *Bordet* e *Ruelens* e o de *Noguchi*.

Haveria muito que dizer sobre a escolha de antigenos. Ha sobre o assumpto um magnifico trabalho publicado este anno, no qual são estudados diversos antigenos, trabalho feito sobre a mesma direcção, em diversos dos melhores laboratorios dos Est. Unidos da America do Norte, relatado por *Ruth Gilbert* e *Virginia Langworth* (3).

Nesse trabalho foram tomados para estudos, entre outros, os seguintes antigenos: o do Laboratorio do Estado de N. Y. (cholesterinado), o de *Müller* (cholesterinado), o de *Kolmer* (cholesterinado), o de *Bordet* e *Ruelens* e o de *Noguchi*.

Ficou constatado que os antigenos do Laboratorio do Estado de N. Y. e o de *Müller*, ambos cholesterinados, deram mais alta porcentagem de reacções positivas nos casos de syphilis verificada; no grupo de casos presumivelmente não syphiliticos foram elles que deram maior numero de reacções positivas, talvez falsas. O antigeno de *Kolmer* foi o menos sensivel, ficando o antigeno de *Bordet* e *Ruelens* e o de *Noguchi*, no meio, entre os menos sensiveis, com a vantagem sobre estes de dar muito menos reacções positivas com sôros de doentes clinicamente não syphiliticos. Acham ser essencial tomar-se dois antigenos, um que seja altamente sensivel, como o antigeno cholesterinado do Laboratorio do Estado de N. Y. ou o antigeno, tambem cholesterinado, de Müller; outro, que tenha pequena ou ne-

---

(1) Sciencia Medica, anno IV, n.º 4, 30 de Abril, 1926.

(2) Joltrain (Ed.). Nouvelles Méthodes de séro-Diagnostice. Paris, 1916, p. 58.

(3) Standardization of the Wassermann Test—The American Journal of Syphilis, 1926, Vol. X, n.º 1, p. 101.

nhuma tendencia a dar reacções positivas senão em casos de syphilis activa, como por exemplo o antigeno de *Bordet* e *Ruelens*.

Temos dado sempre preferencia aos antigenos não cholesterinados, mas não podemos deixar de reconhecer a utilidade que haveria em seguirmos as recommendações das recentes pesquizas dos laboratorios dos Estados Unldos.

E' verdade que na conferencia de Copenhague, que nos referimos atraz, foram melhores os resultados obtidos pelos methodos usando um só antigeno, não cholesterinado, aos methodos usando muitos antigenos e alguns cholesterinados, mas não ha negar que é cauteloso usar-se dois antigenos.

Ha tambem quem adopte uma mistura de antigenos.

Como estamos discutindo o assumpto do nosso trabalho não nos podemos deixar de referir ao aquecimento ou inactivação dos sôros usado na reacção de *Wassermann* e a sua consequencia na pesquiza da sensibilisodora syphilitica.

E' sabido que o sôro tem um complemento proprio, variavel em sua quantidade de um caso a outro, razão pela qual, na reacção de Wassermann, tornando-se indispensavel uma quantidade medida de complemento, este é destruido pelo aquecimento a 56°, durante meia hora, e substituido por sôro fresco de cobaio rigorosamente dosado. Mas, acontece que esse aquecimento—segundo observaram primeiramente *Hans Sachs, Altmann, Leberer, Noguchi, Thempsen, Busila, Weinberg, Steinitz, Halion, e Bauer*, etc., e pódem observar todos aquelles que quizerem repetir as experiencias desses observadores, como fizemos—diminúe a sensibilidade da reacção, isto devido, como demonstrou muito bem, entre outros, Busila (1), no seu artigo sobre "Uma sensibilisadora syphilitica thermolabil", que os sôros positivos podem ter, uns, sensibilisadoras thermolabeis, outros, sensibilisadoras thermoestaveis, podendo alguns conter a mistura dessas duas variedades de anti-corpos.

Já é conhecido que a sensibilisadora syphilitica do proprio liquido cephalo rachidiano tambem pode ser parcial ou inteiramente thermolabil, como a dos anti-corpos em geral. Portanto, quando a reacção de *Wassermann* é positiva no liquido e negativa no sangue, não quer sempre dizer que a sensibilisadora esteja ausente neste, mas sim que tenha dsapparecido pelo aquecimento devido a sua thermolabilidade, ao passo que o liquido não é aquecido para ser submettido a essa reacção.

Quando as duas sensibilisadoras thermolabil e thermoestavel existem conjuntamente em um sangue, ou liquido, assim mesmo a reacção feita com sôro activo é mais forte de que a feita com sôro aquecido. Existindo só a sensibilisadora thermolabil, com a technica original do aquecimento a reacção será negativa; ao passo que, na technica com sôro activo, a reacção poderá ser até fortemente positiva. Quando só existir a sensibilisadora thermoestavel as reacções pelas duas technicas serão mais ou menos da mesma intensidade.

Convem tambem assignalar que já foi por diversos experimentadores observado ser principalmente no começo da syphilis, no fim de um tratamento e na syphilis latente que se notam a presença ex-

---

(1) Loc. cit.

clusiva dos anti-corpos thermolabeis, o que não deixa de ter interesse clinico.

Ao rematar estas considerações sobre a acção do aquecimento do sôro no sôro diagnostico da syphilis, não podemos deixar de assignalar que ha tambem os que julgam que a inativação, se de um lado enfraquece os anti-corpos syphiliticos, de outro estabilisa esses anti-corpos, eliminando as reacções não especificas, tendo *Bôas* notado que os sôros dos tuberculosos, cancerosos, nephriticos, etc., fixam o complemento em presença de um antigeno lipoidico desde que se use sôro activo, o que se não daria com o sôro após inativação.

Não é nosso intento passar em revista aqui todos os pontos fracos da reacção de *Wassermann*, apenas de passagem citamos alguns com o fito de justificar as discordancias por nós encontradas nos resultados das reacções de *Wassermann* e de *Mutermilch*.

A reacção de *Wassermann* é muito bôa, mas não é perfeita. Ha nella ainda um ponto que tambem não queremos deixar de assignalar.

E' sabido que o sôro humano contem normalmente uma sensibilisadora hemolytica, como tambem complemento, variando ambos em sua riqueza de um sôro para outro.

A propriedade heterolytica do sôro humano para com os globulos vermelhos de carneiro compõe-se da sensibilisadora e do complemento que podem ser determinados conjuntamente, como é feito na determinação do indice hemolytico do sôro, ou tambem podem ser determinados separadamente.

Ora, na reacção de *Wassermann*, com o aquecimento do sôro, este perde o complemento que vae ser substituido pelo complemento de cobaio rigorosamente dosado, mas conserva a sensibilisadora hemolytica que é thermoestavel, a qual não é levada em conta na reacção. No entanto, da mesma fórma que o complemento, a sensibilisadora hemolytica do sôro humano varia enormemente de um sôro para outro, não podendo deixar de influir no resultado da reacção.

Weinberg denominou indice da sensibilisadora hemolytica anti-carneiro, normalmente encontrada no sôro humano, a quantidade de globulos de carneiro a 5 °/° dissolvidos por 0,1 de sôro inativado em presença de sôro de cobaio diluido a 50 °/°.

No quadro abaixo vê-se a determinação desse indice por nós feito em 17 sôros.

Determinação da propriedade heterolytica de sôros humanos aquecidos 30 minutos a 56°.

Sôros	Tubos	Sôro aquecido	Complemento a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
1	1	0,1	0,1	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	HP
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	0
2	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
3	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
4	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
5	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	2,3	HP
	3	"	"	0,5	0
	4	"	"	0,7	0
	5	"	"	0,9	0

Sôros	Tubos	Sôro aquecido	Complemento a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
6	1	0,1	0,1	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
7	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
8	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	HP
	3	"	"	0,5	0
	4	"	"	0,7	0
	5	"	"	0,9	0
9	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
10	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
11	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H

Sôros	Tubos	Sôro aquecido	Complemento a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
12	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H
13	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	HP
14	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	HP
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	HP
15	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	HP
16	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	HP
	3	"	"	0,5	HP
	4	"	"	0,7	HP
	5	"	"	0,9	0
17	1	"	"	0,1	H
	2	"	"	0,3	H
	3	"	"	0,5	H
	4	"	"	0,7	H
	5	"	"	0,9	H

Como acabamos de ver, é desigual e ás vezes grande a quantidade de sensibilisadora anti-carneiro existente no sôro humano. Em quasi 50 °/° dos casos do nosso quadro, 0,1 de sôro aquecido poude sensibilisar 1 c. c. de globulos de carneiro a 5 °/° substituindo o sôro hemolytico. Um sôro humano póde dissolver globulos de carneiro 20 vezes mais do que um outro sôro, ambos aquecidos.

Na reacção de *Wassermann* o systema hemolytico é dosado sem o sôro a examinar; a quantidade de complemento e de sôro hemolytico juntados é uniforme para todas as reacçoes feitas na occasião, podendo dizer-se que a quantidade de complemento será na realidade igual em todas as reacções por estarem os sôros inativados, mas a sensibilisadora hemolytica tem que ser desigual de uma reacção para outra, devido a levar cada sôro tambem a sua sensibilisadora hemolytica natural, não destruida pelo aquecimento e não previamente dosada. Ora, já vimos atraz que a sensibilisadora hemolytica ou amboceptor augmenta progressivamente a actividade do complemento; portanto, contendo cada sôro quantidades tão desiguaes de amboceptor, como nos mostra o ultimo quadro, cada reacção terá o seu systema hemolytico de força desigual, mas força desigual devido sempre á maior actividade do complexo hemolytico por um excesso da sensibilisadora hemolytica, excesso que constitue indiscutivelmente mais uma causa de erro na reacção de *Wassermann*, pois é sabido que "Uma quantidade de anti-corpus syphiliticos, justa sufficiente para fixar 0,1 de complemento com duas unidades de amboceptores, não é mais efficaz em presença de uma quantidade maior" (Joltrain).

Em um sôro rico em anti-corpos um excesso de hemolysina terá pequena acção, mas nos sôros fracamente positivos a sua acção poderá dar como resultado uma reacção negativa.

De passagem convem ainda assignalar que os sôros de cobaios usados como complemento na reacção de *Wassermann* tambem têm propriedade heterolytica para com os globulos de carneiro, propriedade essa de desigual poder, como vemos no quadro seguinte, em que determinamos as heterolysinas de 8 sôros de cobaios.

Determinação da propriedade heterolytica de sôros de cobaios (sôros não aquecidos).

Sôros	Tubos	Sôro de cobaio a 50 %	Globulos de carneiro a 50 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
1	1	0,1	0,1	0
	2	0,3	"	0
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	H
2	1	0,1	"	0
	2	0,3	"	0
	3	0,5	"	0
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	HP
3	1	0,1	"	0
	2	0,3	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
4	1	0,1	"	0
	2	0,3	"	HP
	3	"	"	H
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
5	1	0,1	"	0
	2	0,3	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	HP

Sôros	Tubos	Sôro de cobaio a 50 %	Globulos de carneiro a 5 %	Resultado após 30 minutos na estufa a 37°.
6	1	0,1	0,1	H
	2	0,3	"	H
	3	0,5	"	H
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
7	1	0,1	"	0
	2	0,3	"	HP
	3	0,5	"	H
	4	0,7	"	H
	5	0,9	"	H
8	1	0,1	"	0
	2	0,3	"	HP
	3	0,5	"	HP
	4	0,7	"	HP
	5	0,9	"	H

Como na reacção de *Wassermann* o systema hemolytico é dosado com o complemento do dia e este deverá ser de uma mistura de sôros de dois a quatro cobaios, as suas heterolysinas para com os globulos de carneiro ficam tambem dosadas no conjuncto do complexo hemolytico, não podendo, portanto, influir na reacção. Será, comtudo, mais uma causa de erro para aquelles que não fazem essa dosagem, e maior ainda quando, além de não a fazerem, tomam o sôro de um só cobaio, que poderá ser rico em complemento e rico em heterolysina anti-carneiro, tornando o systema hemolytico inesperadamente muito forte sem o saber o experimentador.

Ao terminar queremos apenas que vejam neste modesto trabalho o producto de um esforço que, em nosso conceito, não passa da enunciação de problemas.

Ha muita cousa ainda a rever e a fazer sobre as questões que acabamos de abordar; e embóra já esteja na consciencia de quasi todos que a reacção de *Wassermann* é, na sôro diagnose da syphilis, a reacção na qual maior confiança tem-se depositado, comtudo, ella tambem apresenta muitos pontos fracos, como provam á saciedade as considerações que vimos relembrando.

Somos da opinião de *Rubinstein* que affirma ser o uso simultaneo dos methodos de sôro aquecido e de sôro activo "indispensavel ao sorologista para a probidade de seu trabalho e utilidade de seus resultados".

RESUMO

Não se podendo negar a existencia de duas sensibilisadoras syphiliticas, uma thermolabil e outra thermoestavel, tanto no sangue como no liquido cephalo rachidiano, a reacção de *Wassermann*, executada segundo a sua technica original, com sôro aquecido, não poderá ser sempre uma prova de ausencia de sensibilisadora syphilitica, que poderá ser parcial ou totalmente thermolabil.

E' indispensavel, portanto, que acompanhe a reacção de *Wassermann* uma reacção complementar em que seja usado o sôro activo, reacção capaz de revelar ambas as sensibilisadoras.

A reacção de *Mutermilch*, com sôros activos, actualmente usada no Instituto Pasteur de Paris, sendo, como acabamos de ver, uma reacção facil, sensivel e precisa,—impõe-se como uma das melhores reacções complementares á reacção de *Wassermann*, tornando-se, talvez, preferivel usa-la só a ter que usar a reacção de *Wassermann* sem o seu auxilio ou sem o auxilio de uma bôa reacção com sôro activo.

A reacção de *Mutermilch* mostrou-se mais sensivel do que a reacção de *Wassermann*.

Em 250 exames feitos entre sôros e alguns liquidos cephalo rachidianos—31, 6 °/° foram positivos na reacção de *Wassermann* e 36 °/° na reacção de *Mutermilch*.

Todos os exames que foram positivos na reacção de *Wassermann* (79), foram tambem positivos na reacção de *Mutermilch*.

Houve 11 reacções positivas (4, 4 °/°) na reacção de *Mutermilch*, nos 250 exames feitos, que foram negativas na reacção de *Wassermann*.

SOMMAIRE

L'existence de deux sensibilisatrices syphilitiques, une thermolabile et une thermostable, tant dans le sang que dans le liquide cephalo rachidien ne pouvant être mise en doute, le réaction de *Wassermann*, exécuté suivant sa technique originale, avec le serum chauffé, ne pourra pas toujours denner la preuve de l'absence de sensibilisatrice syphilitique, qui pourra être partiellement ou totalement thermolabile.

Il est donc indispensable que la réaction de *Wassermann* soit completée par une autre réaction, utilisant le serum actif et capable de révéler les deux sensibilisatrices.

La réaction de *Mutermilch*, faite avec les seruns actifs, utilisée actuellement à l'Institut Pasteur de Paris, étant une réaction facile, sensible et précise, s'impose comme l'une des meilleures réactions complémentaires de la réaction de *Wassermann;* il est même peut être préféreble de l'utiliser seule plutôt que d'utiliser la réaction de *Wassermann* sans elle ou sans une autre bone réaction avec serum actif.

La réaction de Mutermilch s'est montrée plus sensible que celle de *Wassermann*.

Em 250 examens, surtout de seruns et quelques liquides céphalo rachidiens, 31, 6 °/° ont été positifs avec la réaction de *Wassermann* et 36 °/° avec celle de *Mutermilch*.

Tous les examens positifs dans la réaction de *Wassermann* (79) ont été également positifs dans celle de *Mutermilch;* 11 réactions positives (4, 4 °/°) avec la réaction de *Mutermilch* ont été négatives avec celle de *Wassermann*.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO VENENO DAS ARANHAS

(CONTINUAÇÃO)

(*Segunda memoria*)

LYCOSA RAPTORIA—CTENUS NIGRIVENTER—GENERO LATRODECTUS—GENERO GRAMMOSTOLA—LASIODORA CURTIOR E ACANTHOSCURIA STERNALIS.

PELOS

DRS. VITAL BRAZIL E J. VELLARD.

Em nosso trabalho anterior, estudamos as principaes propriedades dos venenos de aranhas, para orientar pesquizas posteriores sobre os venenos de nossos principaes grupos indigenas. Foram assim estudados os venenos do *Ctenus ferus*, do *Ctenus nigriventer*, da *Trechona venosa*, da *Nephila cruentata* e finalmente da *Lycosa raptoria*, especie esta muito abundante na Capital e no interior do Estado de S. Paulo.

De accôrdo com o programma preestabelecido, completaremos, n'esta nova contribuição, o estudo do veneno da *Lycosa raptoria* e do *Ctenus nigriventer*, especies muito importantes, por serem as responsaveis pela quasi totalidade de accidentes de araneismo, observados, tanto na Capital, como no interior do Estado. Tendo já sido estudadas experimentalmente estas duas especies de venenos, occupar-nos-emos d'elles principalmente sob o ponto de vista pratico, referindo os principaes accidentes observados pessoalmente no homem, assim como o resultado do tratamento especifico pelos sôros que preparamos.

Passaremos em seguida ao estudo do genero Latrodectus e de algumas Theraphosidae ou aranhas caranguejeiras, do genero Grammostola, frequentes nos Estados do Sul, a *Grammostola acteon* e a *Grammostola longimana*, particularmente interessantes por serem ophiophagas, a *Lasiodora curtior*, e a *Acanthoscuria sternalis*, communs, a primeira no Estado do Rio e a segunda no Estado de S. Paulo.

CAPITULO I

LYCOSA RAPTORIA—SORO ANTI-LYCOSICO.
CTENUS NIGRIVENTER—SOROS ANTI-CTENO E ANTI-CTENOLYCOSICO.

Segundo se encontra registado, em a nossa primeira contribuição, o veneno da Lycosa raptoria é desprovido de effeito geral; possue, ao contrario, forte acção necrosante local. No meio de um edema consideravel, acompanhado de phlyctenas, apparece uma pequena placa branca de necrose, seguida de eschara secca que se elimina do oitavo ao decimo dia, deixando uma ferida de cicatrisação difficil. As cicatrizes de apparencia cheloide, retractis, são muitas vezes dolorosas. Conforme a localisação e a extensão das lesões, as consequencias do accidente podem ser mais ou menos graves, podendo determinar a impotencia funccional de um dos membros (Obs. n.° 11) ou a eventração, etc. De um modo geral, porem, o prognostico é na maioria dos casos benigno, operando-se a cura em 6 ou 8 semanas. A temperatura e o pulso não são modificados e a dôr pouco accusada, salvo nos dois primeiros dias após o accidente.

Experimentalmente conseguimos reproduzir nos animaes, coelhos e cobaios, as mesmas lesões observadas nos accidentes naturaes, fazendo injecções intradermicas do veneno.

A injecção sub-cutanea, ao contrario, não determina senão uma tumefação passageira.

Trata-se, pois, de um veneno muito especializado, de acção electiva sobre os elementos do derma, determinando uma necrose secca, de typo muito particular, absolutamente distincto dos grandes edemas hemorrhagicos, acompanhados de esphacelos, não só da pelle, como de todos os tecidos subjacentes, provocados frequentemente pela acção dos venenos ophidicos, dotados de propriedades proteolyticas e coagulantes.

Conseguimos obter contra este veneno, no carneiro, um sôro especifico muito activo, injectando debaixo da pelle diariamente doses progressivamente crescentes de veneno. A dosagem d'este sôro foi estabelecida, de accôrdo com o methodo original, descripto no trabalho anterior, por unidades anti-necrosantes, visto ser impossivel dosal-o pelos methodos anti-toxicos geralmente em uso. A unidade anti-necrosante corresponde a dose do sôro capaz, por injecção endovenosa, de impedir a acção necrotica de uma dose padrão de veneno, fixada, por differentes motivos em 5 milligrammas, quando injectada intradermicamente na orelha do coelho. A dosagem é calculada pela diluição do sôro e indicada em unidades anti-necrosantes. O primeiro sôro que preparamos dosou 250 u. a. n.

* * *

A *Lycosa raptoria* é extremamente abundante em todo o sul do Brazil. Numerosos exemplares d'esta especie temos recebido de

varias localidades do interior dos Estados de S. Paulo, Minas Geraes, Matto Grosso, Paraná, Santa Catharina e Rio Grande do Sul. Não é rara no Estado do Rio.

Como já o indicamos, no trabalho anterior, é encontrada sob as pedras, pedaços de madeira, buracos dos muros e paredes, no interior de casas velhas ou pouco aceiadas, nos barrancos, etc. Penetra com muita frequencia no interior das habitações, principalmente a noite, occultando-se não raro nas vestes, facto este que explica o grande numero de individuos que são picados, quando vão vestir-se. Os accidentes determinados por esta especie são mais frequentes no verão.

Sôro anti-lycosico. A principal caracteristica d'este veneno é sua acção necrosante local, provocando a eliminação de vasta placa cutanea. A observação repetida d'esta acção estrictamente limitada ao derma, tanto nos accidentes naturaes, como nas experiencias de laboratorio e a impossibilidade de reproduzir experimentalmente as lesões typicas, por injecções hypodermicas, nos levaram a indagar si não seria mais conveniente e mais efficaz para obtenção de um sôro curativo, levar o antigeno directamente ao tecido dermico, orgão sensivel e logicamente mais activo na producção de anti-corpos.

As nossas primeiras experiencias, para resolver esta questão, foram feitas no coelho, experiencias estas que, de accôrdo com os dados consignados no quadro abaixo não foram muito animadoras.

Tentativa da immunisação do Coelho contra o veneno de Lycosa raptoria
Quadro synoptico das experiencias.

INJECÇÕES	COELHO N. 56 pesando 2190 grs.	COELHO N. 308 pesando 2000 grs.	COELHO N. 300 pesando 1710 grs.	COELHO N. 57 pesando 2500 grs.	OBSERVAÇÕES
Injecção intra dermica:					O **Coelho n. 57,**
Em 15-IV	0,5 mg.	0,5 mg.	——	——	succumbiu 48 ho-
» 18-IV	0 5 »	0 5 »	——	——	ras depois da 3.ª
» 22-IV	0,5 »	0,5 »	——	——	injecção, tendo a-
» 25-IV	0,5 »	0,5 »	——	——	presentado pela au-
» 30-IV	1, »	1, »	——	——	topsia, pontos he-
» 5- V	1,5 »	1,5 »	——	——	morrhagicos no pul-
» 9- V	2, »	2, »	——	——	mão, hematuria,
» 14- V	2,5 »	2,5 »	——	——	diarrhéa, etc.
» 18- V	3, »	——	——	——	—::—
Injecção subcutanea:					O **Coelho n. 308**
Em 15-IV	——	——	0,5 mg.	——	morreu 1 hora de-
» 18-IV	——	——	0,5 »	——	pois da 8.ª injec-
» 22-IV	——	——	0,5 »	——	ção, tendo igual-
» 25-IV	——	——	0,5 »	——	mente apresentado
» 30-IV	——	——	1, »	——	fócos hemorrhagi-
» 5- V	——	——	1,5 »	——	cos do pulmão, he-
» 9- V	——	——	2, »	——	maturia e diarrhéa.
» 14- V	——	——	2,5 »	——	—::—
» 18- V	——	——	3, »	——	Os **Coelhos ns.**
Injecção intra-muscular:					**56 e 300,** não suc-
Em 15-IV	——	——	——	0,5 mg.	cumbiram; apre-
» 18-IV	——	——	——	0,5 »	sentaram, porém,
» 22-IV	——	——	——	0,5 »	forte reacção local,
					que forçou a sus-
					pensão da immu-
					nisação

Este primeiro insuccesso, tendo sido attribuido principalmente a impropriedade d'esta especie animal para o fim em vista, dada a sua extrema sensibilidade ao veneno de Lycosa, resolvemos a empregar o carneiro, que já uma vez nos havia dado excellente resultado.

Dois carneiros, marcados respectivamente com as letras C e D, sensivelmente do mesmo peso foram tomados para experiencia. O carneiro C receberia as injecções de veneno por via intradermica; e o designado pela letra D seria injectado por via sub-cutanea. O ponto escolhido para as injecções intradermicas foi a principio a face superior da orelha, por ser, ahi, de mais facil observação a reacção local. Mais tarde fomos obrigados a passar a outra região, para

não repetirmos, sempre, no mesmo lugar, as injecções, dando preferencia a pelle do abdomen, previamente preparada.

Em razão da forte reacção local apresentada pelo carneiro, que recebia o veneno por injecção intra-dermica, fomos obrigados, principalmente no começo da immunisação a proceder com muita cautela na progressão das doses, afim de evitar a necrose. Assim esperavamos, antes de passar a uma dose superior, que a inferior não determinasse mais reacção importante. Posteriormente verificamos igualmente a conveniencia de diluir, o mais possivel, a solução de veneno, com o fim não só de evitar-se a acção necrotica, como de collocar o antigeno, em maior extensão, em contacto com os elementos activos na producção de anti-corpos.

Esta primeira experiencia durou de 4 de Junho a 6 de Agosto. A dose inicial de 1 milligramma, tendo provocado no carneiro C, forte reacção local, foi repetida um certo numero de vezes, até tornar-se bem tolerada; depois do que havendo já um certo gráo de immunidade, a quantidade de veneno a injectar-se, poude ser facilmente elevada. Não houve, em nenhum dos dois carneiros em experiencia, modificação de peso. A temperatura, porém, foi constantemente mais elevada no animal, que recebia o veneno por injecção intra-dermica.

O carneiro C., por via intradermica e o carneiro D., por via sub-cutanea receberam respectivamente 1 milligramma de veneno nos seguintes dias do mez de Junho: 4-5-6-8-9-10-12 e 13. Nos dias 15-16 e 17 receberam 2 milligrammas, nos dias 18-19 e 20 receberam 2,5 milligrammas; nos dias 22 e 23 receberam 3 milligrammas; no dia 25 receberam 3,5 milligrammas; nos dias 26 e 27 receberam 4 milligrammas. Por falta de veneno a immunisação foi suspensa, sendo retomada a 16 de Julho, quando injectamos 2 milligrammas; a 17 injectamos 4 milligrammas; a 18 injectamos 4,5 milligrammas; a 20 injectamos 6 milligrammas; a 21 injectamos 7 milligrammas a 23 injectamos 8 milligrammas; a 24 injectamos 9 milligrammas; a 25 injectamos 11 milligrammas; a 27 injectamos 13 milligrammas; a 28 injectamos 15 milligrammas; a 29 injectamos 17 milligrammas; a 30 injectamos 19 milligrammas; a 31 injectamos 21 milligrammas.

Immunisação de dois Carneiros contra o veneno de Lycosa raptoria: Um d'elles (C) recebendo o veneno por injecção intra dermica; o outro (D) recebendo-o por via hypodermica.

QUADRO SYNOPTICO, MOSTRANDO A MARCHA DA IMMUNISAÇÃO

Datas das injecções.	Carneiro C, recebendo veneno por via intra dermica.	Carneiro D, recebendo veneno por via hypodermica.	OBSERVAÇÕES
4 - VI	1 milligrammas	1 milligrammas	A temperatura do Carneiro D. foi constantemente mais elevada do que a do Carneiro C.
5 - VI	1 »	1 »	
6 - VI	1 »	1 »	
8 - VI	1 »	1 »	
9 - VI	1 »	1 »	Por falta de veneno a immunisação foi suspensa a 27 de Junho, sendo retomada a 16 de Julho.
10 - VI	1 »	1 »	
12 - VI	1 »	1 »	
13 - VI	1 »	1 »	
15 - VI	2 »	2 »	
16 - VI	2 »	2 »	
17 - VI	2 »	2 »	
18 - VI	2,5 »	2,5 »	
19 - VI	2,5 »	2,5 »	
20 - VI	2,5 »	2,5 »	
22 - VI	3 »	3 »	
23 - VI	3 »	3 »	
25 - VI	3,5 »	3,5 »	
26 - VI	4 »	4 »	
27 - VI	4,0 »	4,0 »	
16 - VII	2 »	2 »	
17 - VII	4 »	4 »	
18 - VII	4,5 »	4,5 »	
20 - VII	6 »	6 »	
21 - VII	7 »	7 »	
23 - VII	8 »	8 »	
24 - VII	9 »	9 »	
25 - VII	11 »	11 »	
27 - VII	13 »	13 »	
28 - VII	15 »	15 »	
29 - VII	17 »	17 »	
30 - VII	19 »	19 »	
31 - VII	21 »	21 »	
1 - VIII	21 »	21 »	
7 - VIII	Sangria exploradora	Sangria exploradora	

Sangria exploradora no dia 7 de Agosto.

A dosagem comparada dos sôros d'estes dois animaes revelou claramente a superioridade do methodo intra-dermico para o preparo do sôro anti-lycosico pois o carneiro que recebeu veneno por esta via forneceu um sôro que quasi attingio a 10 unidades, emquanto que outro alcançou apenas uma unidade, como se vê do seguinte quadro:

Dosagem dos Sôros dos Carneiros C. e D.

N.º dos Coelhos	Veneno de lycosa, injecção intra-dermica.	Sôro do Carneiro C. injecção na veia.	Sôro do Carneiro D. injecção na veia.	OBSERVAÇÕES
61	5 milligrammas	1 c. c.	——	Ligeiro edema, sem placa necrotica.
22	5 »	0,1 c. c.	——	Pequena placa, sem perfuração da orelha.
12	5 »	——	1 c. c.	Larga placa, sem perfuração da orelha.
74	5 »	——	0,1 c. c.	Grande placa, com perfuração da orelha.

Por falta de veneno, o carneiro D. foi abandonado, sendo retomado o carneiro C. apenas a 23 de Setembro.

A 23-IX....5 milligrs. em 1 c. c.
A 25-IX....5 milligrs. em 1 c. c.
A 26-IX....6 milligrs. em 1 c. c.
A 28-IX....7 milligrs. em 1 c. c.
A 29-IX....8 milligrs. em 1 c. c.
A 30-IX....9 milligrs. em 1 c. c.
A 1-X....10 milligrs. em 1 c. c.
A 2-X....11 milligrs. em 1 c. c.
A 3-X....12 milligrs. em 1 c. c.
A 5-X....14 milligrs. em 1 c. c.
A 6-X....16 milligrs. em 1 c. c.
A 7-X....18 milligrs. em 1 c. c.
A 8-X....20 milligrs. em 1 c. c.

A reacção local forte, sem attingir comtudo a necrose, não permettio exceder a dóse de 20 milligrammas. O Sôro dosado a 13 de Outubro não alcançava 50 u. a. n.

A fim de verificar si o volume da injecção exerceria alguma influencia, no sentido de diminuir a reacção local e facilitar o contacto do antigeno com maior extensão do tecido dermico, permettindo, além d'isso augmentar as doses de veneno, retomamos, depois do repouso de uma semana, o curso da immunisação, empregando uma solução de veneno, em que 1 c. c. correspondia a 1 milligramma d'este.

A 20-X..10 milligrs. em 10 c. c.
A 21-X..12 milligrs. em 12 c. c.
A 23-X..16 milligrs. em 16 c. c.
A 26-X..20 milligrs. em 20 c. c.
A 28-X..25 milligrs. em 25 c. c.
A 30-X..30 milligrs. em 30 c. c.
A 4-XI.. 40 milligrs. em 40 c. c.
A 6-XI.. 50 milligrs. em 50 c. c.
A 10-XI.. 60 milligrs. em 60 c. c.
A 14-XI.. 70 milligrs. em 70 c. c.
A 18-XI.. 80 milligrs. em 80 c. c.
A 23-XI.. 90 milligrs. em 90 c. c.
A 28-XI..100 milligrs. em 100 c. c.

Nenhuma reacção necrotica foi observada durante este tratamento.

A dosagem do sôro d'este animal a 3 de Dezembro alcançou 300 u. a. n.

E' pois, possivel, empregando unicamente injecções intradermicas, provocar immunidade muito solida contra o veneno de Lycosa, sendo esta immunidade de origem local, acompanhada da formação de anti-corpos que passam para circulação.

O emprego de injecção intradermica permitte obter dosagem mais elevada com quantidades mais fracas de veneno. Na primeira immunisação que fizemos contra o veneno de Lycosa, o carneiro B. recebeu 440 glandulas de veneno o que corresponde pelo menos a 600 milligrammas, para attingir a dosagem de 250 u. a. n. emquanto que carneiro C, alcançou a dosagem de 300 u. a. n. depois da injecção de 100 milligrammas. Em nossas immunisações posteriores, não excedemos a 120 milligrammas, alcançando sempre dosagem entre 300 a 350 u. a. n.

Ctenus nigriventer, sôro anti-cteno e sôro anti-ctenolycosico.

Depois da Lycosa é o Ctenus nigriventer a especie de aranha, que mais frequentemente determina accidentes em S. Paulo.

Esta especie é muito commum na capital e no interior de S. não muito rara nos Estados de Santa Catharina e Rio Grande do Sul; no litoral é substituida pelo *Ctenus ferus*. Como a Lycosa penetra frequentemente nas habitações occultando-se de preferencia dentro do calçado. Um certo numero de accidentes, por nós observados, foram devidos a esta circunstancia especial.

Paulo, Paraná, Matto Grosso, Minas Geraes, Goyaz, e Rio de Janeiro;

No trabalho anterior indicamos as caracteristicas principaes d'este veneno, estabelecendo as doses minimas mortaes para os animaes de laboratorio. Veneno de acção especial sobre o systema nervoso determina no começo violentas convulsões tonicas, seguidas de paralysia e de morte, observando-se além disso no decurso de envenenamento dyspnéa muito acentuada, hypersecreção de todas as glandulas e ausencia completa de reacção local.

Os accidentes determinados, por esta especie, no homem, não são raros; são algumas vezes graves, podendo, em certos casos, ser rapidamente mortaes.

O quadro clinico é sempre muito impressionante, evoluindo com grande rapidez. Nos casos graves, immediatamente após a picada, comparada pelas victimas a um golpe de faca, começam violentas dores, que se irradiam por todo o membro offendido e algumas vezes se generalisam; observam-se, com frequencia, vertigens e perturbações visuaes; os pacientes profundamente abatidos se queixam continuamente de violentas dores, de caimbras espasmodicas e de frio intenso. A hyperesthesia é accusada; o menor toque pode provocar uma crise de caimbras dolorosas; grande tremor sacode o paciente, ou, nos casos mais brandos limita a sua acção ao membro offendido; alguns doentes se contorcem de dor; o corpo é banhado de suor profuso; as vezes ha retenção de urina. Um facto constante e caracteristico é a accelaração consideravel do pulso, muitas vezes filiforme,

incontavel, coincidindo ordinariamente com abaixamento progressivo da temperatura. A discordancia mais ou menos accentuada entre o pulso e a temperatura permitte fazer um juizo da gravidade do envenenamento.

Com o tratamento pelo sôro especifico é principalmente sobre essa discordancia que se observa sua acção.

O pulso torna-se progressivamente menos rapido, emquanto que a temperatura eleva-se a normal; as dores e as caimbras se espaçam pouco a pouco, substituidas por uma dormencia do membro offendido; a transpiração anormal para; a retenção da urina pode persistir por 24 horas. Em muitos casos, nota-se nos dias seguintes constipação rebelde. Não ha albuminuria.

No tratamento especifico do araneismo ha a difficuldade pratica de distinguir as especies determinadoras dos accidentes, mesmo com a apresentação dos exemplares respectivos, pois, não é facil, para pessoas não especialisadas classificar rapidamente a aranha causadora do accidente. Foi essa consideração que nos levou a preparar além do sôro anti-lycosico e anti-cteno, o bi-valente anti-cteno-lycosico, que permitte tratar efficazmente a grande maioria d'este genero de accidentes, entre nós.

Com este objectivo, nossa primeira tentativa de immunisação contra o veneno do *Ctenus nigriventer*, foi levado a effeito no carneiro B, que já havia sido immunisado contra o veneno de *Lycosa raptoria*, fornecendo o primeiro sôro anti-lycosico. Immunisando-o contra o veneno de Ctenus, mantendo actividade do sôro em relação ao veneno da Lycosa, por meio de algumas injecções d'este ultimo veneno, obtivemos um sôro bastante activo contra estes dois venenos. Posteriormente immunisamos outros animaes, apenas contra o veneno de Ctenus nigriventer.

A primeira immunisação durou trez mezes. As injecções eram feitas, diariamente, no tecido cellular subcutaneo, em grande volume de sôro physiologico obedecendo a technica geral que seguimos na immunisação contra outros venenos; dose inicial extremamente fraca, augmentando diariamente, segundo progressão arithmetica e cada semana segundo progressão geometrica. Estas injecções principalmente, as primeiras, são extremamente dolorosas. A medida, porém que o animal progride no processo de immunisação, a que foi submettido, tolera melhor as injecções. Não observamos modificação alguma no peso e na temperatura do animal, assim não registamos reacção local alguma.

Eis o protocollo d'esta primeira immunisação:

Carneiro B. — Pesando 52 kgs. Recebendo veneno de Ctenus por injecção hypodermica, tendo sido immunisado anteriormente contra o veneno de Lycosa. Antes de começar a injectar veneno de Ctenus, verificamos que o sôro d'este animal na dose de 1 c. c. de mistura, in vitro, durante uma hora, com uma minima mortal de veneno de Ctenus, mal protegia contra a morte.

Cobaio 476, peso 400 grammas, testemunha, recebe por injecção intramuscular 0,3 de milligramma de veneno de Ctenus mais 1 c. c. de sôro physiologico; morte em 2 horas e 22 minutos.

Cobaio 285, peso 410 grammas, recebe por injecção intramuscular 0,3 de milligramma de veneno mais 1 c. c. de sôro do carneiro B, depois de contacto de uma hora in vitro; paralytico em 1 hora, restabelecido em 48 horas.

Sem contacto prévio do veneno e sôro, o cobaio morre tão rapidamente como o testemunha.

Cobaio 170, peso 300 grs., testemunha, recebe 0,3 mg. de veneno mais 1 c. c. de sôro physiologico; morte em 52 minutos.

Cobaio 259, peso, 280 grs. recebe 0,3 mg. mais 1 c. c. de sôro do carneiro B, morte em uma hora.

A immunisação contra o veneno de Ctenus foi começada a 6 de Abril; a dose inicial foi de 0,06 de glandula, correspondendo aproximadamente a 0,1 de milligramma de veneno, tendo-se empregado um soluto envelhecido, e de acção toxica muito attenuada. Posteriormente a immunisação foi continuada com veneno secco dissolvido em sôro physiologico no momento de ser empregado.

O volume de cada injecção foi fixado em 50 c. c.

1.ª semana: 0,6 0,12 0,18 de glandulas de Ctenus.
2.ª semana: 0,48 0,60 0,72 0,84 0,96 1,08 de glandulas de Ctenus.
3.ª semana: 1,24 1,8 de glandulas de Ctenus mais 100 mg. de veneno de Lycosa mais 2,28 2,52 de glandulas de Ctenus.
4.ª semana: Sangria para sôro anti-lycosico. Dosagem 250 u. a. n.
5.ª semana: 3,6 4,08 4,56 5,04 5,52 6, glandulas de Ctenus.
6.ª semana: 6,96 9,84 10,8 11,76, glandulas de Ctenus.
7.ª semana: 13,68 15,6 17,52 21,36 23,28, de glandulas de Ctenus.
8.ª semana: 28,20 31,20 36, glandulas de Ctenus.
9.ª semana: Repouso.
10.ª semana: 10-12-16-18 mgs. de veneno de Ctenus.
11.ª semana: 25-35-45 mgs. de veneno de Ctenus.
12.ª semana: 60 mgs. de veneno de Ctenus mais 60 mgs. de veneno de Lycosa mais 90 mgs. de veneno de Lycosa mais 75 mgs. de veneno de Ctenus.
13.ª semana: Sangria exploradora a 1.º de Julho e sangria definitiva no dia 2 de Julho.

Dosagem: 1 c. c. do sôro do carneiro B. neutralisa 0,6 mg. de veneno de Ctenus nigriventer e contem 200 u. a. n. em relação ao veneno de Lycosa raptoria.

Methodo de dosagem do sôro anti-cteno. Com o intuito de uniformisar a dosagem dos sôros anti-araneicos, procuramos applicar a avaliação do poder anti-toxico d'este sôro, o mesmo methodo que descrevemos e usamos para a dosagem do sôro anti-lycosico, isto é, injecção intra-dermica na orelha do coelho e concomittantemente injecção endovenosa do sôro. Verificamos, entretanto, que esse methodo excellente quando se trata de apreciar o valor antinecrosante do sôro anti-lycosico, não dava resultado satisfatorio na dosagem do sôro anti-cteno. A razão d'esta divergencia de resultado reside essencialmente na diversidade do modo de acção dos dois venenos; emquanto que um destituido de acção geral, tem forte acção necrosante local, revelando pronunciada electividade de fixação para o tecido dermico, o outro, sem o minimo effeito local, é dotado de

acção toxica geral, que se manifesta de modo violento e rapido. Sendo o veneno de Ctenus, comparavel, pelo seu modo de agir aos venenos ophidicos, tivemos, então, a ideia de applicar á dosagem do sôro anti-cteno, o mesmo methodo que empregamos para determinar o valor anti-toxico dos sôros anti-peçonhentos; mistura in vitro de 1 c. c. do sôro a dosar com doses variaveis de veneno, contacto durante uma hora e injecção endovenosa da mistura no animal sensivel. No caso da dosagem do sôro anti-cteno, empregamos, como animal sensivel o coelho, por ser esta especie muito mais sensivel ao veneno do ctenus do que o pombo, animal preferido para a dosagem dos sôros anti-peçonhentos.

Este segundo methodo é o melhor, de accôrdo com os resultados dos seguintes experimentos:

Dosagem por injecção intradermica do veneno e endovenosa do sôro.

Pesquisa da minima mortal por via intradermica:

Coelho 88—peso 1100 grammas recebe 1 milligramma de veneno de ctenus, por injecção intradermica na orelha. Apresentou-se paralytico dentro de uma hora, restabelecendo-se no dia seguinte.

Coelho 35—peso 1000 grammas, recebe pela mesma via 1,5 mg. do mesmo veneno; morte em uma hora e 40 minutos. A minima mortal por via intradermica está, pois, entre um e um e meio milligramma.

Coelho 481—peso 1200 grammas, testemunha, recebe em injecção intradermica 2 milligrammas de veneno; morte em 58 minutos.

Coelho 12—peso 1150 grammas, recebe por via venosa 1 c. c. do sôro do carneiro B, e uma hora depois 2 milligrammas de veneno de Ctenus, por via intradermica. Morte em uma hora e 25 minutos.

Dosagem por injecção endovenosa da mistura sôro mais veneno depois de contacto de uma hora:

A minima mortal do veneno de Ctenus nigriventer, por injecção endovenosa, estabelecida por experiencias anteriores é um pouco inferior a 0,3 do milligramma, para o coelho de um kilo e pouco.

Coelho 26—peso 1100 grammas; recebe 1 c. c. do sôro mais 1 mg. de veneno; morte em 2 minutos.

Coelho 39—peso 1050 grammas; recebe 1 c. c. do sôro mais 0,8 mg. do veneno, morte em 36 horas.

Coelho 93—peso 1100 grammas; recebe 1 c. c. do sôro mais 0,6 mg., não apresentou symptomas de envenamento.

Este sôro (carneiro B.) alcançou, pois, por este methodo de dosagem 0,6 mg. por c. c. em relação ao veneno de *Ctenus nigriventer.*

Immunisação por via intradermica e por via subcutanea, contra o veneno de Ctenus. Como complemento d'estas pesquizas, tentamos

immunisar unicamente contra o veneno de Ctenus nigriventer, dois outros carneiros, um por via intradermica, outro por via subcutanea afim de verificar si a via de introducção exercia qualquer influencia sobre a producção do anti-corpo. Depois de trez mezes de tratamento, a razão de trez injecções de veneno por semana, o sôro d'estes dois animaes tinha o valor anti-toxico equivalente, não indicando vantagem alguma na introducção do antigeno por via intradermica, como verificamos para o veneno de Lycosa.

Os carneiros F. e G. começaram a receber veneno de Ctenus nigriventer, a 12 de Outubro de 1925, o F. por injecções intradermicas nos flancos, o G. por injecções subcutaneas nas espaduas. As doses de veneno e o volume das injecções foram sempre as mesmas para os dois animaes

1.ª semana: 0,001-0,002-0,003 mg. de veneno de Ctenus.
2.ª semana: 0,005-0,007-0,012 mg. de veneno de Ctenus.
3.ª semana: 0,02-0,04-0,06-0,08-0,1 mg. de veneno de Ctenus.
4.ª semana: 0,2-0,25-0,3-0,4 mg. de veneno de Ctenus.
5.ª semana: 0,8-1 mg. de veneno de Ctenus.
6.ª semana: 1,4-1,8-2,2-2,6-3 mg. de veneno de Ctenus.
7.ª semana: 3,8-4,6-6,2-7,8-10 mg. de veneno de Ctenus.
8.ª semana: 14 mgs.-16 mgs.-18 mgs.-20 mgs. de veneno de Ctenus.

Sangria exploradora a 21 de Dezembro e dosagem do poder anti-toxico, pelo methodo de mistura do sôro e veneno.

Sôro do carneiro F.

Coelho que recebe 1 c. c. de sôro mais 0,7 mg. de veneno, morte em 25'.—Coelho, que recebe 1 c. c. de sôro mais 0,6 mg. de veneno, paresia pouco accusada, restabelecendo-se.

Sôro do carneiro G.

Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 0,8 mg. de veneno; paresia muito pronunciada, restabelecendo-se no dia seguinte.—Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 1 mg. de veneno; morte em 3 minutos.

O carneiro G. immunisado por via subcutanea, tendo fornecido sôro um pouco mais activo do que o carneiro F, continuou a receber injecções de veneno:

A 23-XII-25 mgs.; a 28-XII 40 mgs.; a 4-I de 1926 60 mgs.; a 8-I os sôros dos dois carneiros são novamente dosados:

Sôro do carneiro F.

Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 0,6 mg. de veneno. Não apresentou symptomas.

Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 0,8 mg. de veneno. Paralytico em 1 hora, restabelecendo-se.

Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 1 mg. de veneno. Morte em 5 minutos.

Sôro do carneiro G.

Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 0,8 mg. de veneno. Forte paresia, restabelecendo-se.

Coelho recebendo 1 c. c. de sôro mais 1 mg. de veneno. Morte em 15 minutos.

E' interessante notar que a dosagem do sôro do carneiro F, a despeito da parada das injecções, alcançou quasi que o mesmo titulo anti-toxico do sôro do carneiro G, que recebera mais trez fortes doses supplementares de veneno.

Sangria definitiva a 12 de Janeiro para sôro anti-cteno directo.

Ao contrario do que nos foi dado observar com o veneno de Lycosa, o veneno de Ctenus, quando injectado no derma, não determina uma formação de anti-corpos mais intensa, do que quando é introduzido no tecido cellular subcutaneo.

Este modo de comportar-se dos dois venenos, em relação a formação de anti-corpos e a via de introducção dos mesmos no organismo, nos fornece mais um exemplo frisante de tropismo dos venenos, demonstrando que o orgam sensivel é o maior elaborador de anti-corpos. Assim o veneno Lycosico de accentuado tropismo dermico, tem na pelle o maior productor de anti-toxina; emquanto que o veneno de Ctenus de acção nulla sobre a pelle quando injectado n'este orgam, não produz mais anti-corpos, do que quando é introduzido por outra via, indo actuar sobre o systema nervoso, para o qual revela notavel predilecção.

O facto importante não é, pois, propriamente a via de introducção de veneno no organismo, mas a sua affinidade especial para elementos bem determinados. Quando é possivel, como no caso do veneno de Lycosa, levar directamente o antigeno em contacto com os elementos sensiveis, determina-se como vimos a immunidade rapida d'estes elementos e esta immunidade de origem local ou organica se traduz pelo apparecimento mais abundante de anti-corpos no sôro; quando não é possivel impregnar directamente o orgam sensivel, como no caso do veneno da Ctenus, não ha vantagem em escolher a via intradermica, de preferencia a subcutanea.

Primeira applicação do sôro anti-cteno lycosico no homem:

Pouco tempo depois de haver obtido este sôro, tivemos occasião de applical-o, com exito completo, em um caso gravissimo de picada de Ctenus nigriventer, occorido em Butantan. Tratava-se de um homem de 45 annos, sem antecedentes nervosos, empregado da secção agricola do Instituto, que, trabalhando descalço, em uma palhada, foi picado ás 10 horas e 40 minutos da manhã, na face dorsal do pequeno dedo do pé esquerdo, por Ctenus nigriventer, de tamanho medio, que elle logo matou e foi identificado no laboratorio. Immediatamente depois da picada comparada pelo paciente ao golpe de faca, sentiu violentas dores que se irradiavam para o pé e para a perna. Quiz entrar em sua casa, proxima do lugar onde occorreu o accidente e, por ter sido tomado de perturbação visual, passou pela frente de sua porta, sem a ter visto, vindo cahir, sem forças, um pouco adiante. Diante da gravidade do caso, foi conduzido em troly,

amparado por dois homens, ao nosso laboratorio, onde o examinámos ás 11 horas e 1/4, tendo reconhecido immediatamente pessimo estado geral.

Fizemol-o deitar-se, pois não podia manter-se em pé, não enchergava bem, respondendo com muita difficuldade as perguntas que lhe eram dirigidas, queixando-se continuadamente de violentas dores geraes e de frio intenso. Transpirava abundante e continuamente, notando-se hyper-secreção nasal e salivar, o que obrigava o doente a assoar-se e a cuspir constantemente. E' agitado por tremores generalizados; o pé e a perna esquerdos são atacados de caimbras continuas; o mais ligeiro toque augmenta as crises dolorosas. Não se observa vestigio algum de picada. O pulso é irregular, marcando 112 pulsações por minuto e a temperatura de 36 gráos e dois decimos. As 11 horas e 45 minutos, uma hora depois do accidente, injectámos na nadega esquerda 15 centimetros cubicos de sôro antictenus; o doente toma com difficuldade um pouco de café. Durante a hora seguinte o pulso torna-se de mais a mais rapido, filiforme, quasi incontavel: a temperatura continua a baixar: o estado geral se aggrava, o pulso a 122: temperatura 35°. As 12 ½ horas, nova injecção hypodermica de 10 c. c. de sôro. A 1 ½ da tarde o seu estado é um pouco melhor (pulso a 98 e temperatura 36°, 4). A temperatura começa a subir, as dores se attenuam, o doente responde facilmente as perguntas. Desde então as melhoras se accentuam rapidamente. A' tarde, ainda que muito fraco, o doente sente-se muito melhor e pede para regressar ao seu domicilio; ás dores e caimbras são limitadas ao membro ferido. A' noite o paciente dorme e na manhã seguinte não ha a notar senão um pouco de dor no pé offendido; não houve reacção local.

Durante a phase aguda, o estado do doente impediu examinar os reflexos tendinosos: na manhã seguinte eram normaes. Como phenomeno interessante a registrar, houve forte retenção de urina; a primeira emissão, de 250 c. c., não teve lugar sinão 24 horas depois do accidente; era ligeiramente avermelhada, mas não continha traços de albumina. No dia seguinte, isto é, 48 horas depois do accidente, este homem, completamente restabelecido, voltava ao trabalho, não se queixando mais senão de forte contipação de ventre, que persistiu por mais de uma semana, obrigando o paciente a usar de repetidos purgativos, facto identico ao que foi observado no caso de Baerg nos Estados Unidos, em consequencia da picada de Latrodectus.

A observação deste caso é das mais interessantes, confirma perfeitamente as experiencias de laboratorio e mostra a gravidade possivel das picadas de Ctenus, que podem produzir rapidamente a morte, como já tem sido observada por alguns dos nossos collegas; demonstra, principalmente, uma vez mais o valor da sorôtherapia especifica quando todos os outros recursos da therapeutica são impotentes.

ESPECIFICIDADE DOS SOROS ANTI-ARANEICOS.

Em trabalho precedente indicamos que os sôros anti-bothropico, anti-crotalico, e anti-escorpionico não possuem acção sobre os venenos de Ctenus e de Trechona. Acabamos de ver, além

d'isso que um sôro muito activo em relação ao veneno de Lycosa, não possue senão fraca acção sobre o veneno de Ctenus, depois de contacto, durante uma hora in vitro.

Procurando completar estes primeiros dados, temos indagado si o sôro anti-lycosico attenuava a acção de outros venenos necrosantes e si este sôro e o anti-cteno neutralisava o veneno de Trechona venosa.

ACÇÃO DO SORO ANTI-LYCOSICO EM RELAÇÃO AO VENENO DE NEPHILA CRUENTATA.

Coelho 21—Recebe no derma da face superior da orelha 12 mgs. de veneno de Nephila cruentata, em 1 c. c. de sôro physiologico e 1 c. c. de sôro anti-lycosico dosando 250 u. a. n., por via venosa; trez dias depois grande escara local, seguida de perfuração da orelha, tão rapida e intensa, como no animal testemunha.

ACÇÃO DO SORO ANTI-LYCOSICO EM RELAÇÃO AO VENENO DE TRECHONA VENOSA.

Testemunha—Pombo 68, recebe 0,02 mgs., de veneno de Trechona por via venosa; paralytico em 4 horas, morto em 6 horas.

Pombo 110—Recebe por via venosa 0,02 mgs. de veneno de Trechona em 1 c. c. de sôro physiologico mais 1 c. c. de sôro anti-lycosico dosando 250 u. a. n., morto em 5 ½ horas.

ACÇÃO DO SORO ANTI-CTENO-LYCOSICO EM RELAÇÃO AO VENENO DE TRECHONA VENOSA:

Testemunha—Pombo 15—Recebe, por via venosa, 0,005 mgs. de veneno de Trechona venosa, em 2 c. c. de sôro physiologico; paralytico em 1 hora; morte no 2.º dia depois da injecção.

Pombo 29—Recebe, por via venosa, depois de uma hora de contacto, in vitro, 0,005 mg. de veneno de Trechona mais 1 c. c. de sôro anti-cteno lycosico; paralytico em uma hora; amanheceu morto no 2.º dia depois da injecção.

Pombo 88—Recebe, por via venosa, depois de uma hora de contacto, in vitro, 0,005 mg. de veneno de Trechona mais 1 c. c. de anti-ctenolycosico; paralytico em uma hora; morto no 3.º dia depois da injecção.

Verifica-se, pois, estreita especificidade entre o sôro e o veneno que servio para immunisação do animal productor do mesmo, sendo que um sôro de grande valor especifico, não tem acção mesmo quando é ensaiado em relação a um veneno de effeitos semelhantes ao que foi empregado na immunisação.

DIFFERENCIAÇÃO ENTRE O VENENO E O SORO SANGUINEO DAS ARANHAS.

Baseando sobre a diversidade de symptomas provocados pela injecção do veneno e do sôro sanguineo da mesma especie de aranha e sobre a semelhança de acção. ao contrario, dos sôros sanguineos de aranhas de especies muito affastadas, concluimos, em a nossa primeira memoria, pela independencia completa d'estas duas substancias. Possuindo agora um sôro altamente anti-toxico em relação ao veneno de Ctenus nigriventer, conseguimos demonstrar, de modo categorico, que a nossa primeira conclusão era de todo o ponto de vista verdadeira. Para levar a effeito essa demonstração pesquisamos o valor anti-toxico eventual do nosso sôro anti-cteno em relação ao sôro sanguineo do Ctenus nigriventer, tendo verificado, de accôrdo com os dados experimentaes, registados em seguida, que mesmo depois de contacto in vitro, durante uma hora, o sôro anti-cteno, nenhuma acção exerce sobre a toxicidade do sôro sanguineo d'esta especie. Não ha, pois, razão de confundir-se como o fazem certos autores a toxicidade do veneno com a do sôro da mesma aranha.

Pombo 69—Recebe, por via venosa, 1 c. c. de sôro sanguineo de Ctenus nigriventer mais 1 c. c. de sôro physiologico; morte em 2 minutos.

Pombo 92—Recebe, por via venosa, 1 c. c. de sôro sanguineo de Ctenus nigriventer mais 1 c. c. de sôro anti-cteno, depois de 1 hora de contacto, in vitro, morte em 3 minutos.

ACCIDENTES PROVOCADOS PELAS ARANHAS, OBSERVADOS PESSOALMENTE EM BUTANTAN, DE ABRIL DE 1925 A AGOSTO DE 1926.

Em nossa primeira memoria, relatamos sómente 4 casos de araneismo, por nós observados e algumas observações feitas por collegas; depois da publicidade désse trabalho e de algumas notas prévias sobre o mesmo thema, recebemos de varios pontos numerosas communicações sobre estes accidentes; a maior parte destas informações são muito incompletas, sendo no entanto, interessantes por mostrar a frequencia e a gravidade dos accidentes araneidicos. Geralmente os pacientes terminam por curar-se, mais ou menos rapidamente, deixando ou não, ulceração local, alguns foram fataes, entre elles recebemos recentemente uma communicacão de Jahu' feita pelo Dr. Paulo Martins, tendo sido a causa o Ctenus nigriventer.

Além dessas observações incompletas, observamos pessoalmente em 15 mezes mais de 30 accidentes devidos á aranhas, sendo a maior parte d'elles tratado pelo sôro especifico.

Destes accidentes 5 foram occasionados por Lycosa raptoria e 8 por Ctenus nigriventer, sendo as aranhas identificadas no nosso laboratorio; os outros podemos classificar, pela descricão feita pelos pacientes e pelos symptomas, que foram causados 12 por Lycosa e 6 por Ctenus: um só caso, aliás muito benigno, pode ser attribuido a uma das Salticidae, a Menemerus bi-vittatus.

(*) Posteriormente foi observado mais um caso devido a Acanthoscuria sternalis.

Deixamos de lado alguns casos muito benignos, nos quaes as causas dos accidentes não foram determinadas, e que provavelmente não foram occasionados por aranhas.

Não voltaremos a descrever os symptomas determinados pela Lycosa ou Ctenus, symptomas caracteristicos ou sufficientes para re conhecer a aranha causadora do accidente; lembraremos apenas que o veneno de Lycosa possue uma acção local necrosante e cutanea sem alteração notavel do pulso e da temperatura, ao passo que o Ctenus possue acção muito energica sobre o systema nervoso, caracterisado por dores intoleraveis com paraxysmos, caimbras, tremores, suores profusos, hypothermia, tachycardia e arythmia, sempre muito accusadas.

Em nenhum caso observamos albuminuria, mas, com a Ctenus ferus houve retenção de urina com constipação intestinal.

Daremos aqui alguns dos accidentes observados em Butantan durante 15 mezes, alguns destes accidentes já foram referidos:

1.º Aranha não classificada, provavelmente Lycosa; accidente ligeiro. 3 de Abril de 1925. M. F. menina de 23 mezes, de Pinheiros, picada ás 8 horas da manhan no dedo grande do pé direito, por uma aranha que seus paes não souberam descrever, quando brincava no jardim; ás 9 horas e 50 minutos ella veio ao Instituto; o pé estava entumecido e vermelho, a dôr localisada no pé só era sentida quando se lhe tocava; depois de algumas compressas de agua quente, o pé desinchou e na manhãn seguinte estava quasi normal.

2.º Provavelmente Lycosa; accidente grave. ....

Snra. F. S. com 17 annos; a 9 de Junho ao vestir-se foi picada no cotovello por uma pequena aranha cinzenta. A dôr muito intensa desde o momento da picada, impedio-a de dormir durante trez dias quando começou a minorar; durante esse tempo ella teve febre e arrepios, depois da picada o braço começou a inflamar e no quarto dia appareceu-lhe 4 grandes plytenas; applicação local de pomada mercurial e xarope como medicação interna. A 15 de Junho quando veio ao Butantan, a paciente trazia o braço quasi dobrado de volume e o edema não lhe permittia senão movimentos muitos limitados; não accusava reacção ganglionar notavel; a face externa do ante-braço apresentava uma larga zona de 15 centimetros de largura por 10 centimetros de comprimento, mais ou menos, em via de necrose cutanea e um sulco de eliminação, e 3 grossas phlyctenas. Como já havia muito tempo decorrido depois do accidente receitamos pomada de lanolina e oxido de zinco. A doente não voltou ao laboratorio.

3.º Ctenus nigriventer; accidente benigno.

Foi victima do accidente a senhora de um dos empregados do Instituto de Butantan, sendo mordida na face inferior do dedo grande do pé, no momento em que calçava o sapato; tratando-se de uma operaria habituada a andar descalça, os ferrões da aranha não penetraram no derma devido a resistencia da pelle, occasionando ligeira inflamação e dores intensas, mas que duraram sómente poucas horas desapparecendo todos os symptomas. No momento da picada como os ferroes não penetrassem bem no derma o esposo da victima pode observar uma gotta de veneno na superficie da pelle na região picada. Tratando-se de um accidente muito benigno não fize-

mos tratamento algum. A aranha foi identificada no nosso laboratorio.

4.º M. M. homen de 35 annos, picado mais ou menos as 2 horas da tarde no dedo index da mão esquerda, por uma aranha que estava escondida no seu sapato e que ficou por alguns segundos suspensa do seu dedo; vertigem, perturbações visuaes immediatas, porem passageiras.

As 3 horas o paciente foi trazido ao Butantan, soffrendo dores intoleraveis com paroxysmos, generalisadas, acompanhadas de tremores, ligeira exsudacção, hypersecreção nasal e lacrymal; pulso 124, temperatura 37.º, 5; recebeu 10 c. c. de sôro anti-ctenolycosico; uma hora depois da injecção as dores começam a melhorar e o pulso baixa a 95; e 3 horas depois da injecção o pulso baixa a 85, regular e forte, as dôres são muito mais toleraveis e com grandes intervallos; o doente sente-se bem melhor e pede para regressar a sua casa.

5.º Senhora M. O. picada por uma aranha provavelmente um Ctenus nigriventer, na mão direita; dôr muito violenta, localisada no braço sem reacção local. Injectamos 5 c. c. de sôro anti-ctenolycosico, 6 horas depois do accidente. Na manhan seguinte todos os symptomas tinham desapparecido.

6.º Lycosa raptoria, accidente muito grave. (Estampa 13).

S. T., menino de 11 annos, residente em Sant'Anna; a 20 de Dezembro de 1925 estando deitado sobre um forno, nú, foi picado na verilha direita por uma aranha que fugio; soffreo dores muito fortes que duraram 2 ou 3 dias; no logar da picada formou-se um erythema e o edema estendendo-se pela inguinal até abaixo do umbigo; alguns dias mais tarde se formou uma grande eschara que cahio no oitavo dia; como tratamento, applicaram no local pomada mercurial. A 7 de Junho, quando o paciente veio pela primeira vez ao Butantan, o edema tinha desapparecido, o pulso e a temperatura eram normaes, uma larga ulceração, pondo a nú os musculos subventraes, se estendia desde a crysta iliaca até a linha alva, tendo na sua maior largura dois dedos tranversaes, deixando temer uma eventração. Depois de 2 applicações locaes de sôro secco normal, a ferida entrou em periodo de cicatrisação.

7.º G. R., com 11 annos, residente no Bosque da Saude, picada as 10 horas da manhãn por uma aranha que se achava escondida em um sacco de pennas; dores muito violentas, com tumefação de toda a mão e até um 1/3 do ante-braço.

As 4 horas da tarde recebeu 10 c. c. de sôro anti-lycosico; a dor e o edema desappareceram.

8.º Senhora A., com 32 annos residente na Avenida Angelica, foi picada, a 9 de Janeiro de 1926 quando se vestia, na região escapular direita, por uma aranha escondida em suas vestes e que se evadio. Sentio immediatamente dores ligeiras e que foram se tornando cada vez mais intensas, ficando intoleraveis 4 horas depois do accidente. Na manhã seguinte quando a paciente veio ao Instituto, havia tumefação local de mais ou menos 10 centimetros de diametro, com uma phlyctena mediana; erythema generalisado em todo o

corpo, a dor tinha completamente desapparecido durante a noite.

Injectamos 5 c. c. de sôro anti-lycosico (1.250 u. a. n.). 48 horas depois da injecção, a erupção havia desapparecido assim como o edema; nada mais existia além de uma pequena crosta secca no logar do phlyctena, que cahio depois de alguns dias deixando uma pequena cicatriz.

9.º Provavelmente Lycosa raptoria.

Senhora G. O, com 48 annos picada no dedo annular direito a 6 de Fevereiro por uma aranha cinzenta, escondida em um feixe de lenha; 3 horas mais tarde sentio ligeiras dores locaes, tendo a face dorsal da mão entumecida e vermelha. Injectamos 5 c. c. de sôro anti-lycosico (1250 u. a. n.). No dia seguinte todos os symptomas tinham desapparecido.

10.º Menina M. A. com 13 annos, residente em Osasco, picada a 6 de Fevereiro de 1926 durante a noite na espadua direita por uma aranha que ella não pode descrever e que provavelmente era uma Lycosa; dor moderada tendo forte edema e erythema local; 8 horas depois da picada recebeu 5 c. c. de sôro anti-lycosico (1250 u. a. n.). As dores e o edema desappareceram em 24 horas não deixando mais do que uma pequena phlyctena e uma ligeira esfoliação sem ulceração.

11.º Accidente grave por Lycosa raptoria. (Estampa).

F. A. M., homem de 51 annos residente em Villa Marianna, picado em sua casa em 26 ou 27 de Janeiro de 1926, por uma aranha que elle não póde descrever, em cima do calcanhar. Dôres muito fortes, seguidas de edema em todo o pé, suffusão sanguinea, phlyctena com apparição de uma placa branca de necrose e ulceração posterior. A 20 de Fevereiro veio ao Butantan, pela primeira vez; trazia uma ulceração profunda na face posterior do pé, larga de 4 c. e com 2 c. de comprimento; impotencia funcional completa, sem reacção ganglionar. Depois de 3 applicações do sôro normal secco, a ferida entrou em via de cicatrisação; o doente não voltou ao nosso laboratorio.

12.º O accidente foi causado, provavelmente, por Lycosa raptoria.

R. S. menino de 5 annos residente em Pinheiros; mordido ás 9 horas e 30 minutos do dia 17 de Março de 1926, por uma aranha que se evadio. Dores muito fortes, gritos; applicação local de Dakin, a dor não cessa, procura-nos no Instituto de Butantan as 2 horas e ½ da tarde. O dorso da mão estava fortemente edemaciado e vermelho. Não havia reacção ganglionar. Temperatura 37º 2 e pulso 96 a 98. Injectamos 5 c. c. de sôro anti-lycosico (1250 u. a. n.) na manhãn seguinte a mão estava quasi completamente desinflamada, sem outros symptomas e a dor havia desapparecido.

13.º Senhora M. A., com 17 annos, picada quando se vestia a 19 de Março de 1926 ás 8 horas da manhãn por uma aranha escondida em seus sapatos e que ella matou. Dores muito fortes, caimbras no pé e na perna, edema estendendo-se a 1/3 da perna; as 10 horas e 20 minutos a temperatura estava a 36º 3, pulso 96. Recebeu 10 c. c. de sôro anti-cteno lycosico; applicação local de agua phenicada. No dia seguinte só existia um pequeno edema no pé.

14.º O. M., menino de 4 annos, residente em Pinheiros, picado a 3 de Abril de 1926, na face interna do pé esquerdo quando brincava no jardim, por uma aranha que se evadio. Uma hora após, quando veio ao Instituto, as dores eram muito fortes; grande papula local contornada por uma aureola branca.

Injectamos 5 c. c. de sôro anti-ctenolycosico. 3 horas depois da injecção as dores quasi haviam desapparecido; na manhan seguinte não se notava nenhuma reacção local.

15.º Senhora A. M., mordida a 3 de Abril de 1926, no pé, por um Ctenus nigriventer; dores muito intensas, intermittentes; ligeira transpiração, caimbras locaes. Injecção 6 horas depois do accidente de 5 c. c. de sôro anti-ctenus. Na manhãn seguinte os symptomas haviam desapparecido.

16.º Accidente muito grave por Ctenus nigriventer.

Senhora F. N., com 22 annos, gravida de 4 mezes, picada a 14 de Abril de 1926 as 9 horas da manhãn na mão esquerda por um Ctenus nigriventer escondido em seus sapatos. Dores intoleraveis, generalisadas, com paroxysmos.

As 10 horas veio ao Butantan, extremamente abattida, não se podendo suster, respondendo com difficuldade as questões, gemendo sem cessar; caimbras e tremores generalisados; abundantes suores frios; temperatura 36º, pulso filiforme, desigual, entre 140 e 150. Recebeu 5 c. c. de sôro anti-cteno. As 10 horas e 30 minutos a prostação accentuou-se, o pulso cada vez mais fraco e incontavel. Perto das 11 horas começa a melhorar; o abatimento começa de ceder, a paciente responde mais facilmente as perguntas que se lhe faz, temperatura 36º, 2 pulso 120. A dor não é tão forte, intermittente, os tremores e as caimbras são localisadas ao braço doente; as 14 horas e 30 minutos a paciente é levada para sua casa, a noite passa bem e na manhãn seguinte persiste sómente um ligeiro formigamento da mão.

17.º Senhora G. R., com 33 annos, picada a 14 de Abril de 1926 ás 7 horas da manhã na mão direita, por uma aranha que se evadio. As 8 e 30 minutos recebeu 5 c. c. de sôro anti-lycosico, a mão apresentava grande edema; ao ½ dia as dores haviam desapparecido e o edema não progredio. Nenhum symptoma outro se apresentou.

18.º C. R., homem de 58 annos, residente em Cerqueira Cezar; descarregando madeira, foi picado na mão esquerda ao meio dia do dia 15 de Abril de 1926, por uma aranha que elle deixou na assistencia policial; enviado para o Butantan, recebeu as 5 horas 5 c. c. de sôro anti-ctenolycosico; as dores que no começo eram muito violentas e continuas, agora são intermittentes e supportaveis; a mão estava muito inflamada; temperatura 36º, 8, pulso 82 cheio e regular; no dia seguinte não tinha mais dores e o edema local havia quasi desapparecido.

19.º Senhora W., picada a 12 de Abril de 1926, na orelha esquerda por uma pequena aranha pega-moscas, provavelmente uma Salticidae, Menemerus bivittatus. A 16, quando ella veio ao Instituto. edema do lobulo da orelha sem ulceração. Nenhum tratamento; em alguns dias o edema desappareceu.

20.º Accidente grave por Ctenus nigriventer.

D. V. menino de 16 annos, picado a 14 de Abril a 1 hora da tarde na mão esquerda por um Ctenus nigriventer, escondido em uns ferros velhos; sentio logo depois do accidente ligeira perturbação visual, dores violentas intoleraveis generalisadas; tremores e caimbras generalisados, suores profusos, temperatura 36º, 2, pulso fraco, irregular rapido a 122; a 1 hora e 30 minutos, recebeu 5 c. c. de sôro anti-cteno; a 1 hora e 56 minutos pulso a 122, temperatura 36º; as 2 horas e 30 minutos, as dores são menos intensas, mais espaçadas, temperatura 36º, 2, pulso 102; as 3 horas, pulso a 100, temperatura 36º, 2. Na manhãn seguinte nada mais havia a não ser formigamento no braço mordido.

21.º Provavelmente Lycosa.

Menino O. P., com 11 annos, brincando no bosque, a 14 de Abril, foi picado ás 9 horas da manhã por uma aranha que se evadio. Dor muito viva, se estendendo a todo o braço; edema ligeiro na mão; uma hora após o accidente recebeu 5 c. c. de sôro anti-ctenolycosico. A' tarde todos os symptomas, menos o edema, tinham desapparecido; na manhã seguinte o edema era quasi nullo.

22.º Accidente provavelmente occasionado por Lycosa.

V. C., menina de 4 annos, residente em Cerqueira Cezar; picada no pé a 30 de Abril de 1926, ás 10 horas da manhã no quintal por uma aranha que ella não sabe descrever. Trazida immediatamente ao Butantan, não apresentava signal visivel da picada. Todo o pé estava inflamado e vermelho, doloroso, o edema attingia, uma hora depois do accidente, o 1/3 inferior da perna, a região inguinal estava dolorida, a dor parecia forte, a creança muito agitada, gritava e chorava continuadamente. Fizemos-lhe 5 c. c. de sôro anti-ctenolycosico; 2 horas depois da injecção a creança estava mais calma; 3 horas depois ás dores tinham desapparecido; á tarde a pequena brincava tranquillamente e o edema começava a diminuir; na manhan seguinte havia quasi desapparecido.

23.º Picada de Lycosa raptoria.

J. M., homem de 38 annos, residente no Taboão; mordido a 4 de Maio de 1926, ás 8 horas da manhã, no index da mão direita, por uma aranha escondida em sua casa. Sahio da picada uma gotta de sangue. A dor muito forte no momento da picada foi se attenuando um pouco e se estendendo até a axila. O dedo e tambem a mão começava a inflamar, e as 9 horas o edema se estendia até a base do ante braço; o dedo picado estava insensivel; as dores eram intermittentes; as 9 horas e 30 minutos recebeu 5 c. c. de sôro anti-lycosico; na manhã seguinte as dores haviam cessado, e o edema quasi desapparecido.

24.º Accidente por Ctenus nigriventer. Doente enviado pelo Dr. José Luiz Guimarães.

Senhora J. C., residente na Penha; picada ao meio dia, no pollegar direito, a 8 de Maio de 1926, por um Ctenus escondido em um trapo; uma gotta de sangue sahio da picada; dores intoleraveis, tremores geraes, arrepios; applicação local de ammoniaco; quando ella veio ao Butantan as 4 horas da tarde, as dores tinham minorado um

pouco, sentia caimbras fortes no braço, pulso 125, temperatura 38°, 1; fizemos uma injecção de 5 c. c. de sôro anti-cteno; não tinha reacção local; na manhã seguinte nada mais restava do que um pouco de engorgitamento da mão.

25.° Accidente por Ctenus nigriventer.

Snr. J. F., com 65 annos, mordida no pollegar direito por um Ctenus escondido em papeis velhos, a 9 de Maio de 1926. Dores extremamente violentas, perturbação passageira de vista, caimbras e tremores generalisados; 2 horas e ½ depois do accidente fizemos injecção de 5 c. c. de sôro anti-ctenos. Na manhan seguinte todos os symptomas haviam desapparecido.

26.° Ligeiro accidente por Ctenus.

A. P., menina de 11 annos, mordida na mão direita, a 24 de Junho de 1926, ás 11 horas da manhã, por um Ctenus nigriventer escondido entre umas batatas inglezas. Dores moderadas, intermittentes localisadas ao braço, acompanhadas de algumas caimbras. Pulso fraco, irregular a 100 pulsações, nenhuma reacção local. Injectamos 5 c. c. de sôro anti-cteno, 1 hora depois do accidente. A tarde todos os symptomas haviam desapparecido.

27.° Accidente ligeiro por Ctenus.

A. M., moço com 26 annos, picada a 30 de Junho de 1926 no dedo grande do pé direito por uma aranha de ferrões vermelhos que elle esmagou. Dores immediatas muito fortes, vertigens, ás dores são intermittentes, acompanhadas de caimbras que se estendem até a verilha. Uma hora depois do accidente, não havia reacção local, pulso 83, temperatura 36°, 6; injectamos 5 c. c. de sôro anti-cteno; o doente não deu mais noticias.

28.° Accidente grave de Lycosa raptoria.

B. J. homem de 50 annos, psychismo difficiente, foi picado a 4 de Julho de 1926 ás 8 horas da manhã no dedo grande do pé direito por uma aranha que elle matou e que estava escondida nos seus sapatos. Dores muito vivas no momento da picada e que foram rapidamente seguidas por grande edema do pé. Quando o paciente veio ao Butantan as 2 horas da tarde, o edema era muito volumoso tomando o 1/3 inferior da perna. A pelle estava vermelha e destendida, com grandes echymoses na face dorsal do pé; as dores continuas exageradas pela pressão são toleraveis, a região inguinal é dolorida; injectamos 10 c. c. de sôro (com 3.000 u. a. n.) anti-lycosico 6 horas depois do accidente. Applicação local de compressas quentes. Dois dias depois, o edema desappareceu completamente, a dor localisada no pé, só era sentida quando fazia movimentos; a face dorsal do pé estava fortemente echimotica; os symptomas retrocediam lentamente, porem não havia signal de necrose a ultima vez que observamos o paciente e que foi 8 dias depois do accidente.

29.° A. S., homem de 26 annos, residente em Murumby, picado em dois lugares no pequeno dedo da mão esquerda, a 26 de Julho de 1926 as 10 horas e ½, por um Ctenus nigriventer que elle trouxe ao nosso laboratorio, e que estava escondido em baixo de velhas planchas. Uma gotta de sangue escorre da picada.

Dores fortes, continuas, sudação anormal. 2 horas depois do accidente, temperatura 37°, pulso 88, as dores são cada vez mais fortes, a mão edemaciada. Injectamos 5 c. c. de sôro anti-cteno. O doente não nos deu mais noticias suas.

30.° Ligeiro accidente por Ctenus nigriventer.

J. P., senhorita de 16 annos, picada a 3 de Agosto de 1926 ás 8 horas da manhã no index da mão direita por um Ctenus nigriventer escondido em seus sapatos. Dores muito violentas com paroxysmos, limitada ao braço; a uma hora da tarde quando ella veio ao Butantan, as dores continuavam muito fortes, não havia reacção local, temperatura 36°, 7; pulso fraco, irregular, a 112. Recebeu 5 c. c. de sôro anti-ctenus, as 6 horas da tarde, as dores haviam desapparecido, e não restava mais symptoma a não ser um pouco de engorgitamento da mão.

Em todos estes accidentes é preciso notar a rapidez extrema da acção do veneno do Ctenus nigriventer, determinando graves symptomas immediatos de intoxicação; portanto, em presença de dores muito fortes sem reacção local, acompanhadas de acceleração consideravel do pulso e arythemia, é necessario pensar-se sempre que a causadora do accidente foi esta especie.

Os accidentes necrosantes devidos a Lycosa raptoria todos cederam rapidamente a acção dos sôros anti-lycosico ou cteno-lycosico, sem maior importancia salvo na observação 28; nesse caso a dor desappareceu rapidamente e a necrose não se produzio, mas, os outros symptomas locaes, já muito adiantados no momento da injecção do sôro retrocederam mais lentamente. Na maior parte dos casos não tratados, ao contrario, observamos ulcerações muito consideraveis.

Uma das principaes causas da diminuição da gravidade nos accidentes aráneicos é a brevidade dos ferroes inoculadores que com a rapidez do ataque não deixam sempre a aranha o tempo de injectar uma quantidade sufficiente de veneno; assim muitos accidentes se produzem no pé e na mão, regiões do corpo protegidas, sobretudo nos trabalhadores, de uma epiderme muito espessa, difficultando a penetração dos ferrões no derma; esse facto é sobretudo notavel na observação 3, onde uma gotta de veneno foi deposta na superficie mesma da pelle; a protecção do vestuario é egualmente uma defesa muito efficaz.

Porém, se a picada se produz em logar favoravel, os accidentes podem ser de extrema gravidade, acompanhados de symptomas dramaticos como muitos dos casos que acabamos de descrever.

Estas observações clinicas confirmam inteiramente as experiencias de laboratorio, e o bom resultado obtido pelo emprego do sôro especifico, quando todos os outros medicamentos se tornam totalmente inefficazes, para combater os accidentes locaes, ou os symptomas geraes, justificam esta conclusão do nosso trabalho do anno passado, baseado quasi que unicamente sobre os factos experimentaes:

Em caso de accidente por aranha o tratamento sorôtherapico especifico se impõe.

CAPITULO II

LATRODECTUS MACTANS. FAB.

LATRODECTUS GEOMETRICUS. C. K.

As numerosas especies do genero Latrodectus tem lugar importante entre as aranhas capazes de determinar graves accidentes. Espalhadas por todas as partes do mundo, as diversas especies d'este genero foram assignaladas em differentes regioes, como particularmente perigosas. Quando traçamos o historico do araneismo clinico e experimental, referimos um grande numero de observações relativas as differente especies de *Latrodectus*: L. 13 guttatus, Koch ou malmignathe, do sul da Europa, L. erebus, Karakurt, lobo preto ou tchim da Russia meridional; L. scelio ou katipo da Oceania; L. menovadi, de Madagascar e principalmente a celebre *L. mactans*, Fab. americana.

Existindo em toda a America, desde o Chile até ao norte dos Estados Unidos e as Antilhas, esta ultima especie recebeu nomes populares differentes, segundo as regioes; araña del lino, na Argentina, araña brava no Chile, lucacha no Peru', *cul rouge* ou aranha 24 horas nas Antilhas, viuva negra, botão de sapato, relogio de areia, ponto em T, *po-ko-moo* nos Estados Unidos, etc.

A despeito d'esta larga distribuição geographica, a L. mactans deve ser pouco espalhada ou pelo menos de distribuição muito restricta no Brazil, porque ainda não recebemos um só exemplar dos differentes Estados em que temos correspondentes e não conhecemos referencia alguma de haver-se encontrado esta especie em nosso paiz. Outra especie, do mesmo genro, quasi cosmopolita das regioes quentes, a L. geometricus se encontra frequentemente no littoral e em diversas localidades do interior.

Dada a importancia da L. mactans e a sua provavel existencia em algum ponto do Brazil, referiremos algumas observações sobre a biologia d'este genero, feitas em exemplares de L. mactans recebidos do Chile e mui principalmente na especie commun entre nós a L. geometricus, muito menos aggressiva do que a primeira e possuindo veneno muito menos activo.

As *Latrodectus* pertencem a familia das Theridiidae. São pois aranomorphae, acribellatae, entelegynas, tri-unguladas, desprovidas de garras auxiliares, sedentarias e tecedeiras. As Latrodectus são especialmente caracterisadas por seu abdomen elevado, sub-globoso, por patas longas, muticas, pela presença de oito olhos, dos quaes os lateraes são separados, caracter excepcional n'esta familia; geralmente de cor sombria, quasi todas as especies d'este genero tem o abdomen ornado, seja na face dorsal, seja na face ventral, por manchas de um vermelho vivo. Os machos são sempre muito menores do que as femeas e possuem um palpo volumoso.

O *Latrodectus mactans*, Fab. (Comp. 10 a 12 m. m.), é negro, sedoso, brilhante, o abdomen com 4 a 5 manchas dorsaes vermelhas, muitas vezes orladas de amarello de forma e posição muito variaveis, podendo faltar completamente; os segmentos das patas são ornados de manchas vermelhas; na face ventral, entre o epigyno e as fiandeiras area vermelha.

O *Latrodectus geometricus*, C. K. Um pouco menor (femea 8 a 10 m. m.) é de cor muito variavel, do cinzento claro ao escuro quasi negro. O thorax e as patas são amarello alaranjado, estas ultimas cobertas de manchas vermelhas em cada segmento; o abdomen geralmente com trez manchas antero dorsaes triangulares, mais claras do que o fundo cercadas de uma fina linha negra e uma mediana posterior alongada; 3 ou 4 manchas semelhantes obliquas sobre os lados; na face ventral entre o epigyno e as fiandeiras existe uma grande area amarello claro ou vermelho vivo.

N'esta especie, como, aliás em todas as *Latrodectus*, as côres são em extremo variaveis.

O macho é muito menor do que a femea, medindo, em media, de 2 a 3 m. m.; cores e desenho identicos.

Os Latrodectus são aranhas sedentarias, vivendo na base das plantas, no meio das folhas seccas, nos ramos inferiores, no angulo dos tectos, sob as pedras, nos lugares sombrios. *E. Bogen*, em recente publicação, indica que o L. mactans, na California, se encontra muitas vezes sob o assento das latrinas das habitações ruraes, causando porisso, frequentes accidentes. Sua teia é pequena, irregular, composta de fios entrecrusados sem ordem. Sua alimentação consiste em pequenos insectos, principalmente em moscas.

Não possuimos observações detalhadas sobre a biologia da L. mactans; um de nós (J. Vellard), porém, seguio durante dezoito mezes a evolução do L. geometricus. Esta especie abunda nas casas velhas, onde se encontra, principalmente nos cantos das paredes. E' facil de ser mantida em captiveiro, sendo sufficiente conserval-a em tubos um pouco largos fechados por um tampão de algodão, pouco apertado e mantidos em posição horisontal, para não fatigar o animal, tendo o cuidado, além disso de manter no interior do tubo uma atmosphera humida, por meio de um capucho de algodão collocado no fundo do tubo. Eis as observacões a que, acima, nos referimos, levadas a effeito, no Rio de Janeiro, com a creação *abovo*, de duas posturas d'esta especie.

Em meiados do mez de Novembro, um *cocon*, pertencente a esta especie foi encontrado no *Corcovado*. A 12 de Dezembro sahiam do *cocon*, cerca de 50 pequenas aranhas brancas, brilhantes, marcadas por oito pontos negros sobre o abdomen. A maior parte fizeram a primeira muda, na manhã seguinte ao da sua sahida do *cocon*, e as outras no dia seguinte. Collocadas todas em um tubo teceram alguns fios irregulares sobre os quaes se collocaram. Muito fracas para capturar moscas ou outros insectos, as mais robustas devoram as mais fracas.

A 4 de Janeiro, algumas começam a 2.ª muda, outras mudam durante os trez dias seguintes. Já possuem n'esta phase os desenhos e a côr caracteristicas do L. geometricus adulto; das 50 pequenas aranhas não restam mais do que onze vivas, neste momento; as pe-

quenas aranhas que até aqui viveram sobre a teia commum, começam a se dispersar. A primeiro de Fevereiro, terceira muda; duas unicas femeas sobrevivem; a 12 do mesmo mez uma d'ellas é devorada pela companheira, esta mede já 4 m. m. de comprimento; constróe uma pequena teia irregular e captura as moscas vivas, que lhe são offerecidas de 2 em 2 dias.

Quarta muda a 3 de Março; quinta e ultima muda a 15 de Março, tendo attingido n'essa data seu completo desenvolvimento.

No momento de cada muda, o Latrodectus recusa os insectos que lhe são offerecidos, ou que se prendem a teia tendo-se completamente immovel, no canto mais escuro do seu abrigo. Para terceiro ou quarto dia a antiga pelle se fende ao longo dos bordos do thorax e a aranha sahe de seu velho envoltorio, do mesmo modo que todas as outras especies, desprendendo successivamente o thorax, o abdomen e os appendices. Libertada de sua pelle velha é ainda muito molle, as patas em parte enroladas e muito pouco coloridas; durante dois ou trez dias fica em seu retiro, até que os novos tegumentos tenham adquirido uma sufficiente dureza; só, então, ella sahe para caçar.

Para apanhar suas victimas, o Latrodectus as espreita de um dos cantos de sua teia, lançando-se sobre as mesmas ao menor abalo d'esta ultima; quando um insecto tem sido detido por seus fios, approxima-se, a pequena distancia, e procura immobilisal-o; passando, sem cessar, as duas patas posteriores, muito longas, pelas fiandeiras, apanha com as unhas porções do fio muito viscoso, com as quaes cobre a victima; logo, esta já embaraçada na teia fica com os movimentos completamente tolhidos, pelos numerosos fios extremamente viscosos.

Quando a aranha sente que a sua victima está inteiramente immobilisada, detem os movimentos das patas posteriores e se avisinha com precaução, verificando com as patas anteriores, a immobilidade do insecto; depois d'isto, morde-o repetidamente e começa a triturál-o e sugal-o, regeitando os restos para peripheria da teia. Sua alimentação natural é constituida por moscas e outros pequenos insectos.

Tendo capturado dois machos adultos d'esta especie procuramos observar a fecundação. Para isto, a 17 de Junho, ás 7 horas da tarde, introduzimos um dos machos no mesmo tubo em que mantinhamos a femea de que fallamos anteriormente, mas nem um, nem outro dão indicios de querer entrar em funcção, pelo que o macho é retirado. De novo introduzido na manhã seguinte, approxima-se da femea; adianta-se com precaução, fazendo frequentes pausas, batendo alternativamente com os palpos; em certo momento fricciona o abdomen contra o fio da teia, ahi depositando uma gotta de liquido seminal, na qual mergulha varias vezes cada um dos palpos; a femea se mostra inquiéta e agitada; emfim o macho toca-a muitas vezes sobre o abdomen com os palpos e com as patas anteriores; tendo reconhecido o macho, a femea se immobilisa, com os femures das patas anteriores em posição vertical e os tarsos dobrados sobre si mesmos; tranquillisado, o macho sobe sobre o abdomen da femea, continuando a tocal-a alternativamente com um e outro dos palpos; alguns instantes depois, passa para face ventral da femea, tendo suas fiandeiras appoiadas sobre as fiandeiras da femea, tocando continuadamente

com os palpos e as patas anteriores em torno do epigyno; introduz finalmente e de modo alternado, a extremidade de cada um dos palpos no apice genital da femea; de quando em vez escapa-se do seu abdomen uma gotta de liquido seminal, que elle colhe cautelosamente com a extremidade dos palpos; depois de 2 ou 3 minutos de repouso, a femea até então immovel, começa a se agitar, os movimentos dos palpos do macho tornam-se mais rapidos, para tranquilisal-a, mas depois de varias interrupções, a femea destende as patas e com as posteriores projecta o macho a distancia; depois de alguns minutos de repouso, o macho se approxima de novo e o acto da fecundação se renova, como da primeira vez, mas durante um periodo mais curto; voltando uma terceira vez para exercer suas funcções, foi o macho repellido quasi que logo depois e na quarta tentativa foi apanhado pela femea que o matou e devorou.

A primeira postura teve lugar sete semanas depois da fecundação, a 26 de Julho; as outras se succederam a intervallos de 4 a 6 semanas; a sexta, a 22 de Dezembro foi seguida de uma ultima a 27 do mesmo mez; a aranha muito enfraquecida desde alguns dias, não se alimentando mais, não sobreviveo, senão dois dias depois d'esta ultima postura.

A sahida dos filhotes do sacco de ovos não se deu senão 7 a 8 semanas depois da postura.

Os casulos são arrendondados, de cerca de 1 c. m. de diametro, de tecido branco amarellado, muito apertado, com muitas saliencias irregulares, em forma de pontas na superficie; são depositados na teia. Nunca assistimos a postura e a confecção dos casulos da Latrodectus, operações que se effectuam ao que parece á noite.

Os machos são extremamente pequenos e vivem na visinhança da teia da femea.

VENENO DA LATRODECTUS MACTANS.

Muito se tem escripto sobre os accidentes determinados por esta especie, principalmente no Chile, na Argentina e nos Estados Unidos, registando-se não pequeno numero de casos, alguns dos quaes terminados pela morte. Neste ultimo paiz, *Bogen*, pesquisando a litteratura, verificou que, nestes ultimos cem annos, foram observados mais de 150 accidentes determinados por esta especie, dos quaes 12 mortaes, de accôrdo com observações feitas por mais de 33 medicos.

Em nosso trabalho anterior indicamos os principaes symptomas determinados por esta especie: nenhuma reacção local, violentas dores irradiantes do ponto da ferida e generalisando-se rapidamente; fadiga e angustia extremos; tremores generalisados; contracções chronicas do membro offendido; delirio; suor profuso, retenção de urina; constipação rebelde, nauseas e por vezes vomitos; nos casos graves estes symptomas aggravam-se e a paralysia pode apparecer; ha dyspnéa (45 a 50 movimentos respiratorios por minuto) o pulso é lento, mas regular (60 pulsações); certos autores indicam hypothermia, outros, ao contrario, hyperthermia. *Escomel*, no Peru' indica, entretanto, para os accidentes determinados por esta especie, a presença constante de edema local consideravel. *Bogen*, estudando,

recentemente, 15 casos, dos quaes 2/3 localisados no penis, observados no hospital de los Angeles, notou, como symptoma principal, a dor extremamente violenta, durante 24 horas, generalisada quasi sempre; a tensão sanguinea attinge a 150 m. m. de mercurio systolica, e 87 m. m. diastolica; em quasi todos os casos ha forte leucocitose, no primeiro dia, em media 14,800; a formula mais elevada foi de 21.800; nos dias seguintes a formula media foi de 10.700; em 6 casos houve traços de albumina e hematuria em 1 caso; todos estes accidentes evoluiram favoravelmente.

Indicamos igualmente as primeiras pesquizas experimentaes sobre este veneno principalmente as de *Houssay, Escomel, Kellog* e *Baerg*. Estas pesquizas feitas por picada directa demonstraram, nos animaes, symptomas analogos aos observados no homem. Segundo *Houssay*, o cobaio é o animal mais sensivel, succumbindo de 30 minutos a 30 horas depois da picada, por bronchospasmo e edema pulmonar; o camondongo morre em 5 e 24 horas; o rato, o cão e principalmente o coelho são muito resistentes.

A maceração das glandulas é muito menos activa, do que o effeito do veneno, por picada directa (*Houssay*); *Kellog* conseguio matar um gato com a maceração de duas glandulas; mas *Bogen* com macerações da aranha (do corpo da aranha?) não obteve effeito algum hemolitico in-vitro, ou toxico in vivo, por injecção, se bem que por picada directa tenha conseguido matar pequenos ratos brancos.

Veneno da L. geometricus. Não encontramos na litteratura referencia alguma sobre o veneno d'esta especie.

PARTE EXPERIMENTAL.

Latrodectus mactans. Não dispondo senão de numero muito limitado de exemplares de Latrodectus mactans, que nos foram gentilmente enviados do Chile, pelo Snr. Octavio Muniz Guimarães, pela Associação de Productores de Salitre do Chile, não nos foi possivel realisar, senão as seguintes experiencias por picada directa. Esta especie é extremamente aggressiva, mordendo logo os animaes em experiencia; as cheliceras são muito fracas e não atravessam ordinariamente o derma, deixando no lugar da picada, marca apenas visivel.

Camondongo, peso 26 grs., picado no focinho ás 10 horas e 45 minutos, por exemplar femea de Latrodectus mactans, muito aggressivo; excitação immediata, polypnéa notavel, forte agitação durando 10 minutos, dor, que o animal manifesta, passando incessantemente as patas sobre a parte mordida, ou esfregando o focinho sobre os objectos que encontra; salivação intensa; pouco a pouco o animal se immobilisa; forte paresia as 11 horas; os movimentos respiratorios tornam-se mais lentos e mais profundos; a paresia se accentua, a respiração é mais lenta, o animal parece suffocar-se abrindo a bocca a procura de ar; completamente paralytico as 20 horas, todo molhado, morre durante a noite.

Cobaio 125, peso 265 grammas; picado no focinho ás 12 horas e 15 minutos por outra femea aggressiva; durante 10 minutos, não manifesta symptoma algum; ás 12 horas e 30 minutos a cabeça é flexionada do lado da picada; o animal se mostra, então, muito agitado, soltando gritos continuos, não podendo ficar no mesmo lugar, executando pequenos saltos, girando sobre si mesmo do lado da picada; tremores generalisados intermittentes, caimbras, polypnéa, respiração estertorosa, salivação abundante, hyperesthesia, tympanismo abdominal, retenção de urina e de fezes; paresia e depois paralysia se estabelecem; os movimentos respiratorios se enfraquessem e o animal morre ás 12 horas e 30 minutos, cerca de 5 horas depois de ter sido picado.

O cobaio, é, pois, muito mais sensivel do que o camondongo, confirmando, esta experiencia, os resultados obtidos por *Houssay*.

Pela necropsia dos dois animaes, verificamos que as unicas lesões se localisaram nos pulmões fortemente congestionados, com numerosos fócos hemorrhagicos disseminados.

Os symptomas registados, se approximam muito dos que foram observados, por outros autores, nos casos de accidentes determinados por esta especie: acção assaz lenta, polypnéa, dor extremamente violenta e irradiante, hypersecreção, paralysia tardia e bradycardia.

Tratamento dos accidentes causados pela L. Mactans.

Por falta de veneno, não foi possivel estudar a acção do sôro anti-ctenolycosico no envenenamento determinado por esta especie, mas o que já conhecemos da especificidade dos sôros anti-araneicos, nos fornece sufficientes elementos para pormos em duvida a actividade d'este sôro em relação ao veneno da L. mactans.

Escomel e *Baerg* notaram, como já o referimos, que cobaios e ratos, que escaparam, uma primeira vez, a picada do L. mactans, se mostram muito menos sensivel a novas picadas. Uma tentativa de *Houssay* para immunisar coelhos, fazendo-os picar de 3 em 3 dias, por um, dois, ou trez Latrodectus, não deu resultados claros.

Bogen, tendo injectado em um paciente picado por Latrodectus, 20 c. c. de sangue de outro individuo convalescente de um accidente grave da mesma natureza, obteve, n'este caso e em trez outros posteriormente tratados, do mesmo modo, resultados, que, sem apresentaram-se como definitivos, lhe pareceram satisfactorios.

Nenhuma d'estas tentativas possue o rigor necessario para servir de base a um tratamento efficaz de taes accidentes. Só o preparo de um sôro especifico, analogo ao que obtivemos contra o veneno de Ctenus e de Lycosa, permittirá dominar de modo rapido e seguro o envenenamento determinado por esta especie. Os outros remedios indicados, taes como os opiaceos, banhos quentes, estimulantes etc., não passam de palliativos, sem nenhum effeito directo sobre o envenenamento

Veneno da Latrodectus geometricus.

Esta especie comquanto de distribuição bastante estensa no Brasil, não é tão abundante, na zona onde colhemos material de estudo.

Por essa razão, as nossas experiencias, sobre este veneno, ainda são incompletas. E' uma especie, como o dissemos, incomparavelmente menos aggressiva do que a L. mactans, circunstancia esta que se harmonisa com o facto de não se conhecer na litteratura accidente algum attribuivel a essa especie. Com difficuldade consegue-se que ella pique os animaes em experiencia. O seu veneno parece menos activo do que o do L. mactans.

Picada directa. Camondongo, picado no focinho, por um L. geometricus. Logo após a picada, mostra-se um pouco agitado, passando as patas pelo focinho; ligeira paresia trez horas depois; na manhã seguinte paralytico, todo molhado, sem edema local; nem hemorrhagia, nem diarrhéa; morte em 36 horas.

Pela necropsia, forte congestão pulmonar, com grandes zonas hemorrhagicas; pontilhado hemorrhagico no figado; outros orgãos normaes.

Solutos de veneno. Um milligramma de veneno, correspondente a seis glandulas, dissolvido em 1 c. c. de sôro physiologico.

a) *Camondongo* branco, recebe por injecção subcutanea 0,2 c. c. do soluto de veneno. Paresia 2 1/2 horas depois, paralytico no dia seguinte. Conserva-se paralytico por mais de 48 horas, ao fim das quaes começa a melhorar, restabelecendo-se completamente no 4.º dia.

b) *Pombo.* Injecção endovenosa de 0,5 c. c. de soluto de veneno. Hypersecrecção nasal alguns minutos após a injecção. Não se pode suster sobre as patas; excitado, porém, consegue mover-se. Dyspnéa accentuada; movimentos respiratorios amplos e profundos. Restabelece-se completamente ao fim de 24 horas.

CAPITULO III

ESTUDO DE ALGUMAS ARANHAS MYGALOMORPHAE OU CARANGUEIGEIRAS.

A excepção da Trechona venosa, todas as aranhas, cujo veneno temos estudado até aqui, Ctenus, Lycosa, Nephila, Latrodectus, etc. pertencem ao grande grupo de aranhas verdadeiras ou "*Aranomorphae*".

As especies pertencentes a outra divisão das aranhas, as "*Mygalomorphae*", não são menos interessantes a estudar. Conhecidas vulgarmente, no Brazil, por "*Caranguejeiras*", são as "*Mygales*" dos antigos autores, as "*Vogelspinnen*" dos allemães, as "*Tarantules*" dos Norte-Americanos, nome este que não deve ser confundido com *tarantula* italiana, que serve para designar uma Lycosa. Quasi todas as aranhas deste grupo são de tamanho superior a media e algumas taes como as Grammostola e as Lasiodora, são verdadeiros gigantes entre os arachmideos.

Todas as Mygalomorphae são facilmente reconheciveis, pela disposição de suas cheliceras, situadas no prolongamento do eixo do corpo, pela disposição caracteristica do apparelho inoculador de veneno, movel de cima para baixo, pelo grupamento dos olhos sobre um unico mamelão, pela presença de quatro placas pulmonares, pelo numero e forma das fiandeiras e pela simplicidade do orgão copulador, tanto no macho, como na femea, estes ultimos caracteres não sendo tão absolutos como os primeiros.

A este grupo pertencem as mais antigas aranhas conhecidas, fosseis da epocha carbonifera; as aranomorphae derivaram-se d'ellas.

De habitos extremamente variaveis, a mór parte terrestre, possuem as vezes na face anterior das cheliceras um apparelho especial, o rastellum, formado de espinhas muito duras, que lhes permittem cavar a terra, e preparar, assim, ninhos ou abrigos de diversos typos; outras desprovidas deste apparelho vivem simplesmente debaixo das pedras, nos buracos naturaes do sólo ou do tronco das arvores; algumas tecem a entrada de seu retiro subterraneo, grande tela sedosa; outras constróem sobre o tronco de arvores abrigos muito resistentes.

Segundo a fórma do labium, a presença ou ausencia do rastellum, o numero das fiandeiras e das unhas tarsaes, nossas especies indigenas se subordinam a 4 familias: *Paratropidae, Ctenizidae, Dipluridae* e *Theraphosidae*.

Temos estudado o veneno de varias especies d'estas trez ultimas familias, registando grandes differenças segundo o genero das aranhas productoras; uns, como o da Trechona venosa, (familia Dipluridae) são extremamente activos; outros pouco energicos; alguns especialmente activos para os animaes de certo grupo zoologico e muito fraco para outras especies.

Limitar-nos-emos a estudar, na presente nota, a biologia e o veneno de algumas Theraphosidae, pertencentes aos generos *Grammostola*, *Lasiodora* e *Acanthoscuria*, reservando para ulterior publicação o estudo de outras especies da mesma familia e de algumas Ctenizidae e Dipluridae.

I

ARANHAS OPHIOPHAGAS — GENERO GRAMMOSTOLA. (1)

O genero "*Grammostola*" encerra algumas das maiores Theraphosidae conhecidas. Differencia-se dos outros generos da mesma familia, pelos seguintes caracteres; face posterior dos femures do 4.º par coberta de pelos deitados, sem escova de pelos; patas espinhosas; todas as escopulas inteiras; a presença sobre a face anterior da coxa do primeiro par de patas de uma serie de cerdas baciliformes, acima e abaixo da sutura, formação conhecida sob o nome de orgão estridulante; tibia da primeira pata do macho armada de dois espinhos apicaes, o externo mais longo do que o interno; bulbo genital terminado por uma ponta muito fina e arqueada.

Dezenove especies de Grammostola foram descriptas, das quaes quatorze pertencem a fauna sul-brazileira. Com uma revisão cuidadosa, estamos seguros de que muitas d'essas especies cahirão na synonimia, seja pela descripção de dois sexos como especies differentes, seja por que tenham sido consideradas como differenças especificas, simples variações accidentaes de colorido e tamanho.

O genero Grammostola se encontra exclusivamente ao sul do Brazil, Paraguay e n'uma parte da Argentina e do Chile, uma unica especie chega até o Rio de Janeiro, sendo que a mór parte de seus representantes vive no Paraná, Santa Catharina e Rio Grande do Sul.

Temos estudado principalmente duas especies: a *Grammostola acteon*, Pocock e *G. longimana*, Mello Leitão.

Grammostola acteon. Especie de grandes dimensões, não apresenta dimorphismo sexual muito accusado; nos dois sexos, a cor geral é sombria, quasi negra; o cephalothorax, coberto de pelos pretos deitados, misturados a alguns pelos dourados; as patas herissadas de numerosas cerdas de cor cinzento-avermelhados; com duas estrias claras sobre as patellas; esterno e coxa negros.

Nos exemplares que soffreram a muda recentemente, a cor é de um negro brilhante; emquanto que nas outras a cor é de um tom de cinza.

O cephalothorax do macho é quasi tão comprido, como largo, é pouco elevado; a fosseta thoracica, oval, larga, profunda e direita; os olhos estão collocados sobre um tuberculo elevado, os anteriores subeguaes, equidistantes, separados entre si, cerca de uma vez e meia seu diametro, em linha curva anteriormente; o bordo anterior dos medianos parallelos a 1/4 anterior dos lateraes; os medianos posteriores muito pequenos são quasi contiguos aos lateraes posteriores;

---

(1) Nota prévia lida, na sessão de 8 de Julho de 1925, da Sociedade de Biologia de S. Paulo—Brazil Medico, 1925.

estes são iguaes aos lateraes anteriores, dos quaes são separados por espaço menor do que o seu diametro. As patas são largas; o 1.º par é quasi igual ao 4.º par.

Eis as dimensões de 1 macho: Comp. total 60 m. m., Cephalothorax 24/24 Cheliceras 10.—Abdomen 36/20.—Esterno 11/11.—Patas I=71; II=63; III=61; IV=76; pat.+tibia I=23; pat.+tibia IV=26.

O cephalothorax da femea é mais elevado do que o do macho; a região cephalica mais alta, as patas mais curtas; a coloração é a mesma: Femea adulta: comp. 66 m. m.—cephalothorax 27/27—patas I=78; II=72; III=68; IV=80.—Pt.+tibia I=25; pt.+tibia IV=24.

Grammostola longimana, M. L.—O macho se distingue facilmente da especie precedente, pelo grande comprimento das patas anteriores; a cor geral é de um pardo escuro; todas as patas e o abdomen herissado de longas cerdas cinzento avermelhadas; a patella com duas estrias longitudinaes claros; o esterno e as coxas negras. Olhos: anteriores em linha bem procurva, os medianos um pouco menores do que os lateraes, separados, entre si, por perto de duas vezes seu diametro; o bordo anterior dos medianos parallelo ao 1/4 posterior dos lateraes; medianos posteriores muito pequenos contiguos aos lateraes; estes quasi tão grandes, como os lateraes anteriores, são separados d'estes ultimos por um espaço pouco maior do que seu diametro.

Macho adulto: comp. total 78.—Cephal 29/28, 9.—Abdomen 38/16,—patas I=106; II=88; III=75; IV=90; pt.+tibia I=40; pt.+tibia IV=30.

A femea que descrevemos em a nossa nota preliminar differe do macho pelas patas mais curtas, e pelo cephalo thorax elevado.—A côr geral é a mesma.

Femea adulta: 70.—cephal.—28/26.—abd. 31/26.—I=70; II=65; III=59; IV=70; pt.+tibia I=27; pt.+tibia IV=25.

Certas femeas podem attingir um desenvolvimento ainda maior.

BIOLOGIA—Na litteratura não se encontra referencia alguma sobre a biologia da *Grammostola acteon* ou das especies visinhas. Tendo recebido numerosos exemplares vivos d'esta especie e da *Grammostola longimana*, tratamos de accordo com o nosso programma, de estudar não só os respectivos venenos, como toda a biologia desses arachnideos. Durante mais de 18 mezes, proseguimos nossas observações tendo conseguido registar todas as particularidades de sua vida, inclusive a fecundação e a reproducção em captiveiro; uma parte d'estas observações, já foram publicadas em nota preliminar em Julho de 1925. Depois d'isto completamos o trabalho por novas observações, tendo feito registar cinematographicamente, as principaes phases da biologia d'estas aranhas. Foi principalmente a Grammostola acteon, que nos servio para este estudo; acompanhamos igualmente, varios pares de G. longimana, cuja biologia em pouca cousa se differencia da primeira, em ordem a nos permittir a applicar a uma das especies o que for consignado para outra, indicando apenas os pontos em que foram notadas differenças.

Os exemplares de *G. acteon* que nos serviram para as observações nos foram enviados de numerosas localidades do Paraná, Santa

Catharina, Rio Grande do Sul, mas principalmente de Cruz Machado e Marechal Mallet, no Paraná, e das circumvisinhanças de Porto Alegre. Os exemplares de *G. longimana* proviéram de varias localidades dos mesmos Estados, mas principalmente do Rio das Antas no Paraná.

Segundo as informações prestadas, por nossos fornecedores, estas aranhas são encontradas, principalmente nas proximidades das queimadas, sobre os paus podres no ôco dos troncos das arvores. São pouco agressivas, assaz lentas, principalmente a *G. longimana;* não picam senão difficilmente os animaes de laboratorio; quando são irritadas levantam o abdomen e esfregando-o rapidamente com as patas posteriores, destacam d'elle cerdas extremamente finas, que, em contacto com a pelle ou a mucosa, determinam irritação passageira, mas muito desagradavel. São desprovidas de apparelho para cavar o solo, circunstancia que está de accordo com o que temos observado nos exemplares mantidos em caixas tendo no fundo uma espessa camada de terra, ligeiramente comprimida; nenhuma d'ellas procurou cavar um abrigo; constróem ordinariamente uma pequena teia, que a isola da terra, onde se mantem immovel e de onde sahe para caçar á hora crepuscular ou á noite.

As escopulas de pelos curtos e finos da face inferior dos tarsos não são assaz desenvolvidas para lhes permittir trepar facilmente ao longo dos vidros ou das paredes muito lisas, como fazem muitas outras especies de Theraphosidae.

E' extremamente difficil julgar da duração da vida das aranhas, contando, para isso, com elementos informativos insufficientes. Baseando-nos sobre o facto de que, tanto no Instituto de Niteroi, como no de Butantan, recebiamos exemplares adultos de diversas especies de carangueigeiras, quasi que unicamente durante o verão, apparecendo primeiro os machos e em seguida as femeas, que desappareciam no começo do inverno, quando começavam a chegar os filhotes, emquanto que na proxima primavera, só encontravam exemplares não adultos, concluimos, de accôrdo com o consignado em a nossa nota preliminar, que esta especie não devia viver além de um anno. Isto é verdade para numerosas especies de aranhas; as grandes Theraphosidae, porém, taes como as Grammostolas, vivem certamente, muito mais tempo. As observações, que fizemos sobre o crescimento da *Grammostola acteon*, mostram que esta especie leva mais de um anno para attingir ao estado adulto, o crescimento é lento, principalmente na primeira phase.

Verificamos, além disso, um facto muito importante já assignalado por *L. Berland* a proposito da *Filistata capitata;* em certas especies de aranhas a ultima muda não se produz no momento da maturidade sexual; depois da fecundação e da postura, a aranha pode continuar a crescer e a passar por novas mudas, ao contrario do que se passa com os insectos e com outras muitas especies de aranhas.

Grammotolas acteon e longimana, feita a primeira postura em captiveiro, dois mezes depois passaram por nova muda e conservam-se perfeitamente activas; outros exemplares soffreram duas mudas, uma em Novembro e outra em Fevereiro. A longividade das aranhas não poderia, pois, ser limitada ao tempo estrictamente necessario ao seu desenvolvimento, como parecem suppôr alguns autores.

E' interessante notar que não nos foi dado observar, nenhum de nossos exemplares machos adultos passar por muda, comquanto, alguns d'elles mantidos ha 18 mezes em captiveiro, tendo funccionado na fecundação das femeas nos verões de 1925 e 1926.

Esta observação sobre a longividade de algumas especies de aranhas foi confirmada pela do Padre Pio Buack de Porto Alegre, que nos communica ter conseguido manter, durante cinco annos, em captiveiro, exemplares de *G. acteon*.

O crëscimento de certas especies de aranhas, além do periodo normal, é uma circunstancia digna de nota, porque vem explicar o engano de alguns autores creando especies novas baseando-se em differenças de tamanho.

Alimentação: — Observamos que as primeiras Grammostolas guardadas em captiveiro recusaram o alimento que habitualmente se offerece as aranhas, constituido por insectos de diversas especies; com certa difficuldade conseguimos fazel-as acceitar, para comer algumas aranhas mortas. Um dia em que não tinhamos cousa alguma a dar a duas *Grammostolas*, collocámos a titulo de experiencia, com uma d'ellas, uma pequena rã ("Paludicola signifera"). Logo a aranha se precipitou sobre a presa, cravando-lhe os ferrões, e dominando-a completamente começou a tritural-a e sugal-a. Repetindo muitas vezes esta experiencia com outros exemplares de Grammostola, e com outras especies de rãs, verificámos não só a preferencia de alimentação dos animaes de sangue frio, como a acção rapida do veneno d'este arachnideo sobre esses animaes.

Com a chegada de nova remessa de Grammostola, as rãs de que dispunhamos não foram sufficientes para alimentar o grande numero destas carangueigeiras, que então possuimos. Tivemos á vista disso a idéa de offerecer-lhes alguns filhotes de serpentes, jararácas e cascaveis que tinhamos em abundancia. As Grammostolas as acceitaram perfeitamente, assim como pequenas lagartixas e camaleões, parecendo mesmo preferil-os ás rãs.

O veneno d'este genero de carangueigeiras revelou-se muito activo para serpentes, em differentes experiencias, em que fizemol-as picar pequenos exemplares pertencentes ás mais variadas especies, entre as quaes se achavam os representantes das serpentes venenosas mais communs e mais perigosas. A lucta, porem que se trava entre a aranha e a serpente que se lhe offerece é facto extremamente interessante, dmonstrando que podemos assignalar mais um inimigo natural das serpentes venenosas, o qual contribue certamente para diminuir o numero d'esses perigosos ophidios. Este facto é tanto mais interessante quanto é na época justamente de maior actividade d'estas aranhas, que coincide o periodo em que se encontram, em grande quantidade, filhotes de serpentes.

Quando se colloca em uma pequena caixa, onde se encontra a Grammostola, uma pequena serpente procurando approximal-a de sua inimiga, esta, achando se disposta a comer, logo que presente a sua victima, tenta apanhal-a pela cabeça; si consegue, mantem-n'a, com firmeza, a despeito da agitação furiosa com que esta se defende, até que perdendo gradualmente a força fica completamente inerte, paralysada ao cabo de 1 ou 2 minutos; com as cheliceras começa, en-

tão a triturar a cabeça, depois o corpo da victima, reduzindo-o a uma massa informe que ella suga aos poucos; á medida que a refeição progride, puxa por meio dos ganchos o resto do corpo para a bocca; a refeição dura tempo variavel de 24 a 48 horas, segundo o seu appetite e o tamanho da presa; quando acaba, não resta mais desta ultima senão uma bola informe, onde são apenas reconheciveis a pelle e os ossos triturados; por vezes, entretanto, quando a refeição foi precedida de perto por outra deixa intacta uma parte mais ou menos volumosa da nova victima.

Algumas vezes a Grammostola não consegue ferir immediatamente a serpente na cabeça; quando os seus ferrões apanham um ponto bastante perto d'esta ultima, ella levanta-os alternadamente enterrando-os a cada golpe um pouco mais adeante, de modo a approximar para si a cabeça da serpente. Quando, porém, fére, no primeiro ataque, a meio do corpo, a serpente procura mordel-a, conseguindo-o muitas vezes, em ordem a determinar na articulação das patas o escoamento de sangue; fica, então agarrada á sua victima, durante alguns minutos, sem fazer movimentos, até que o effeito paralysante do veneno começa a se produzir e que o ophidio se torne inerte; n'esse momento deixa o arachnideo bruscamente a parte do corpo que mantinha, para tomar a cabeça que elle começa a triturar.

Os pequenos lacertidios são capturados do mesmo modo; uma femea de "*Grammostola acteon*" tendo apanhado um camaleão de 35 centimetros, enterrou-lhe seus ganchos no assoalho buccal, paralysando-o completamente em tres minutos.

Para observar, em condições quasi naturaes, nossas caranguei-geiras, deixamol-as livres, cada uma em grande caixa, com serpentes, em geral jararácas e cascaveis de 25 a 45 centimetros, com rãs ou com insectos; estes ultimos foram sempre desprezados.

As caranguei-geiras d'este genero se alimentam, pois, quasi que exclusivamente de serpentes, rãs, e pequenos lacertidios, que ellas caçam de preferencia á tarde ou durante a noite.

As *Grammostolas* não se nutrem com muita regularidade; ordinariamente não comem, senão de quinze em quinze dias, durante o verão e com menos frequencia no inverno; mas as refeições são algumas vezes successivas. Uma Grammostola tendo levado 48 horas a sugar uma rã, *Leptodactylus fragilis*, de 6 centimetros de comprimento, matou, dois dias depois, uma pequena cascavel; no terceiro dia uma pereréca (*Cyclorhamphus eleutherodactylus*) e no dia seguinte uma jararáca, ficando em seguida duas semanas sem se alimentar.

Condição essencial para manter Grammostola em captiveiro, é dar-lhes um pouco d'agua. Estas aranhas nos chegam muitas vezes em más condições, apresentando-se com as patas dobradas sobre o ventre, recusando-se a alimentar.

Collocando-se, então, junto d'ellas uma placa de vidro com algodão molhado, vemol-as deitarem-se sobre a superficie humida e beberem avidamente, fazendo a aspiração da agua pelo afastamento das maxillas e pela acção dos compridos pelos dos lobulos maxillares. Assim refeitas depois de longa viagem, tomam com facilidade o alimento habitual.

Fornecendo as Grammostolas as serpentes e outros animaes de

sangue frio de que se alimentam ordinariamente, e dando-lhes um pouco d'agua pela forma acima mencionada, temos conservado, em excellentes condições, por mais de 18 mezes, 50 exemplares d'esses arachnideos, sem contar um certo numero de exemplares sacrificados propositalmente para obtenção do veneno necessario a nossos experimentos.

FECUNDAÇÃO:—Tivemos occasião de observar varias vezes a fecundação nesta especie. Como todas as outras aranhas, é a *Grammostola acteon* muito bellicosa, não se podendo deixar no mesmo compartimento dois individuos, sem assistir uma lucta sem treguas, que termina ordinariamente pela morte das duas combatentes. Na época porém da fecundação, collocando-se um macho em presença da femea, observa-se que a sua attitude muda; approxima-se lentamente da femea, com as quatro patas anteriores levantadas agitadas por tremor ligeiro e incessante, de intervallo a intervallo, detem-se para tomar de novo a marcha, sem parar o movimento das patas até tocar as da femea; agita-se então mais intensamente, parece hesitar, tranquillizado, porém, pela immobilidade da companheira, toca com as patas anteriores o thorax d'esta, que surprehendida, a principio, distende seus ganchos ameaçadores; sob a influencia porem d'este contacto, levanta pouco a pouco as quatro patas anteriores, para cruzal-as em cima com as do macho; ao mesmo tempo levanta o cephalothorax até por a descoberto o orificio genital na parte antero-ventral do abdomen, sem comtudo modificar sua attitude ameaçadora; o macho insinua-se então sob o thorax da companheira que elle toca repetidas vezes com o palpo sobre o esterno e o abdomen e depois com a extremidade afilada dos dois bulbos genitaes penetra no orificio genital da femea; por vezes esta ultima faz um movimento brusco, o macho detem-se um instante abrindo as cheliceras, prompto, a defender-se, agitando sempre as suas patas cruzadas com as da femea, até que esta volta a immobilidade; emfim a femea torna-se insensivel ao contacto, seus ganchos abertos acima do macho baixam rapidamente para cravar-se no corpo deste ultimo.

Muitas vezes, entretanto, o macho avisado pela crescente inquiétação da femea, procurando agradal-a, se mantem na defensiva, com as cheliceras distendidas a meio; quando a femea faz um movimento muito brusco, ou procura feril-o, o macho, graças a espora tibial das patas anteriores, que elle appoia sobre as patas e algumas vezes mesmo sobre as cheliceras da companheira, consegue repelil-a ou contel-a. Entre os dois se estabelece, então, uma verdadeira luta, que termina ordinariamente pela morte de um dos combatentes. Na fecundação, que registamos, em film cinematographico, o macho tendo conseguido se desprender, matou e devorou a femea.

Nem sempre se verifica uma lucta d'esta natureza; em numerosas especies de aranhas verdadeiras ou caranguejeiras, onde o dimorphismo sexual é muito accusado o macho muito menor do que a femea, não ha necessidade de lucta, sendo o primeiro facilmente devorado pela companheira.

Quando nos dois sexos, o tamanho e a força são equivalentes, como no caso da *Grammostola acteon*, o mais forte ou mais agil devora o companheiro. Finalmente em muitas especies de aranhas; o macho possue patas muito mais compridas do que as da femea, pro-

vidas de espinhas ou apophyses, particularmente desenvolvidas nas tibias de numerosas especies de Theraphosidae; estas apophyses tibiaes servem para conter a femea, durante a fecundação, permittindo-lhe, além disso repellil-a ao terminar a funcção. E' o que acontece com a *G. longimana;* em numerosas fecundações d'esta especie, a que assistimos, presenciamos sempre o macho desprender-se facilmente e as duas aranhas retirar-se cada uma para o seu lado, emquanto que, com a *G. acteon*, em que o macho não é tão favorecido, a lucta final com a morte de uma das aranhas, é quasi que inevitavel.

Não pudemos observar o processo pelo qual o macho carrega o apparelho copulador, constituido pelo bulbo genital situado na extremidade do palpo, com o liquido seminal dos canaes deferentes, que se abrem na parte anterior do abdomen; provavelmente nos machos adultos o bulbo já está carregado antes da fecundação.

POSTURA:—A postura da *Grammostola acteon* dá-se cerca de 8 a 9 semanas depois da fecundação e não tem lugar, senão a noite ou pela madrugada, como acontece em muitas outras especies. Os ovos, assaz desenvolvidos, medindo cerca de 1 millimetro de diametro, em numero superior a 200, são encerrados em um casulo discoide de seda branca, muito solido, guardado pela femea. A face inferior d'este sacco é plana; a superior mais ou menos bombeada, muitas vezes tendo em sua trama alguns pellos. Para confecção do casulo, a femea constróe, a principio, sobre o solo uma primeira tela, resistente, circular, e que formara a parte inferior do casulo; sobre esta tela deposita os ovos e completa o sacco. Este processo que observamos uma unica vez é identico ao que é usado pelo *Ctenus ferus*, pela *Heteropodia venatoria*, ou pela *Lycosa raptoria*.

Este casulo é sempre guardado pela femea, que o mantem entre as patas, mas sem fixal-o como o faz a Lycosa. Não conseguimos determinar, n'esta especie, o tempo de eclosão dos ovos, porque as pequenas aranhas permanecem, por algum tempo depois do nascimento, no interior do casulo, onde soffrem a primeira muda. Acontece, muitas vezes, que abrindo um destes casulos, vê-se escapar, quantidade de pequenas aranhas, com tegumentos nus e incolores, de mistura com outros de cor esverdeada, já tendo soffrido a primeira muda; a sahida do casulo deve exigir depois da postura um prazo assaz variavel e dependente da temperatura, humidade, etc.; segundo nossas observações feitas com o animal em captiveiro esse prazo é de 10 a 12 semanas. A sua sahida do casulo, os filhotes de *Grammostola* são muito differentes dos adultos; quasi despidos os tegumentos apresentam-se de uma côr amarella ou amarello avermelhado; o abdomen apresenta uma grande mancha cinzenta mediana; seu comprimento é cerca de 1 c.; no 2.° dia os filhotes começam a primeira muda depois da sahida do casulo e segunda na realidade, depois da sahida do ovo, no terceiro dia quasi todos tem terminado a muda, n'este periodo, já se assemelham aos adultos, cobertos de pellos curtos e com longas cerdas sobre as patas; a côr, porém, é muito mais clara do que no adulto, e de um cinzento uniforme mais ou menos carregado. Nos primeiros tempos permanecem grupados na teia materna; duas ou trez semanas mais tarde tem uma tendencia a se dispersarem; alimentam-se, a principio, sugando os restos das refeições

maternas; em seguida o cannibalismo parece desempenhar papel importante na alimentação dos filhotes. Quando são assaz robustos e que se dispersam, devem viver de pequenos animaes que conseguem capturar. N'esta phase são muitas vezes victimas dos hymenopteros caçadores, que os conduzem para alimentar suas larvas. Em captiveiro, temos nutrido as pequenas Grammostolas, dando-lhes a sugar algodão hydrophilo embebido de sôro normal de cavallo. Entre a 10.ª e 12.ª semana, passam as pequenas Grammostolas pela 2.ª muda, depois da sahida do casulo e na realidade a 3.ª muda.

Nossas observações alcançam apenas esta phase, devendo ser continuadas posteriormente.

As femeas adultas, que temos em captiveiro, já fizeram, durante o verão, uma e algumas dellas duas mudas.

Algum tempo antes d'esta época, a aranha se mostra pouco activa, recusa alimento, permanecendo sempre no mesmo lugar. Os tegumentos do cephalo-thorax se destacam, a começar pelos bordos e por esta abertura a aranha sahe completamente de seu envoltorio velho, que representa todos os detalhes menos o abdomen que se destaca em muitos fragmentos. A Grammostola, cujos novos tegumentos são muito molles, fica, por varios dias, occulta, até que elles adquiram sufficiente resistencia. A phase de muda é, como para outras especies animaes, muito delicada, pondo em risco a vida da mesma. E' assim que durante ella temos perdido varias Grammostolas.

São estas as principaes observações que fizemos sobre a biologia da *G. acteon* e *G. longimana*, servindo-nos de varios exemplares mantidos quanto possivel em condições naturaes no Museo do Instituto.

ESTUDO DO VENENO DA GRAMMOSTOLA ACTEON.

Pelo aspecto repugnante e asqueroso, pelo avantajado de suas dimensões, são todas as caranguejeiras muito temidas pelo povo. Ha effectivamente, entre estas algumas especies perigosas para o homem, como a "*Trechona venosa*". A que nos occupa, porém, a attenção não deve ser temida. Em primeiro lugar, o tamanho e a lentidão, com que se move, concorrem para reduzir ao minimo a possibilidade dos accidentes. Em segundo lugar, o veneno d'esta especie, de accordo com innumeras experiencias, por nós realisadas, é muito pouco activo para os animaes de sangue quente, sendo, ao contrario, muito activo para os de temperatura variavel. Como nas outras Mygalomorphae, a glandula de veneno está situada na curva dorsal da chelicera, tendo estructura histologica analoga a que descrevemos para o Ctenus medius.

O comprimento das glandulas é cerca de 5 millimetros e cada uma fornece de 1,5 a 2 milligrammas de veneno secco.

Estudamos a acção d'este veneno, quer fazendo picar directamente os animaes, quer injectando solutos exactamente titulados. Os resultados obtidos pelos dois methodos foram assaz concordantes, permittindo estabelecer a grande sensibilidade dos animaes de temperatura variavel e a resistencia dos de sangue quente.

PICADA DIRECTA: —

Cobaio 256, peso 400 grs. Picado por G. acteon, na pata direita; depois da picada não observamos senão dyspnéa e ligeira salivação e algumas caimbras no membro offendido. No dia seguinte se achava accentuadamente paretico, com a parte offendida contrahida. Na manhã do terceiro dia foi encontrado morto o cobaio.

Pela necropsia, encontramos ligeiro edema hemorrhagico local, figado, baço e rins com pontilhado hemorrhagico.

Camondongo. Não conseguimos fazer picar directamente o camondongo pela Grammostola e as tentativas para fazer cravar os ferrões da aranha, mantida pela pinça, na coxa do animal não determinaram phenomenos de envenenamento apreciaveis.

Numerosas foram as nossas experiencias por picada directa sobre animaes de sangue frio, principalmente sobre serpentes de differentes especies, rãns, camaleões, etc. Em todos esses casos, os animaes apresentam rapidamente symptomas convulsivos, paralysia e morte dentro de alguns minutos.

Soluto de veneno em sôro physiologico:

Pombo 186.—Recebe por injecção endovenosa 2 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico. Cahe rapidamente sobre os tarsos incapaz de voar ou de se manter sobre as patas. Depois de apresentar paralysia e contractura das patas, restabelece-se completamente ao fim de 48 horas.

Pombo 44.—Recebe 5 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa. Cahe immediatamente paralytico e morre, em 5 minutos, em convulsões fracas.

Coelho 8.—Peso 1100 grs.—Recebe 2,5 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa. Fracamente paretico uma hora depois; ligeira salivação. Restabelece-se na manhã seguinte.

Coelho 25.—Peso 1165 grs.—Recebe 5 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa; paratytico 18 minutos depois da injecção, morte em 45 minutos.

Cobaio 17.—Peso 300 grs.—Recebe 5 miligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção intramuscular. Ligeira paresia e salivação; normal na manhã seguinte, sem reacção local.

Coelho 6.—Recebe 5 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico no derma da face superior da orelha. Edema e vermelhidão local pronunciada duas horas depois da injecção, que desappareceram progressivamente sem deixar lesão alguma.

Cobaio 277.—Recebe uma glandula de veneno em 1 c. c. de agua de cal, no derma da região escapular direita. Na manhã seguinte edema local medio, com delimitação de pequenissima escara, eliminada no 4.º dia.

Injecções do veneno em animaes de sangue frio.

E' preciso ter-se em consideração o ponto de inoculação do veneno. Nos primeiros ensaios, tendo injectado o veneno sob a pelle dorsal, verificamos que os resultados eram pouco concludentes, em virtude da difficuldade de absorpção o que nos levou a modificar a technica. Passamos, então, a injectar o veneno sob a mucusa buccal e

pharyngea, conservando sempre o volume de 0,5 c. c.

N'estas condições os resultados são perfeitamente comparaveis aos obtidos por picada directa.

Injecção sob a pelle da região dorsal:

Lachesis lanceolatus, de 0,45 c. m. Recebe 0,5 mg. de veneno sob a pelle do dorso. Não apresentou symptomas de envenamento.

Lachesis lanceolatus, de 0,40 c. m. Recebe 1 milligramma, injectado do mesmo modo. Paralysia e morte em duas horas.

Injecção sob a mucosa buccal e pharyngea:

Lachesis lanceolatus, de 40 c. m. Recebe 2 mg., por injecção sub-mucosa. Perde immediatamente a actividade; paralytica em dois minutos; violentas convulsões em 3 minutos; morte em 5 minutos.

Lachesis lanceolatus, de 35 c. m. Recebe 0,5 mg. de veneno pela mesma via. Paresia immediata; paralytica em 10 minutos; ligeiras convulsões da cabeça e do pescaço; morte em 25 minutos.

Crotalus terrificus, de 40 c. m. Recebe 0,2 mg. pela mesma via, paralytico em hora e meia, e morto em duas horas.

Lachesis lanceolatus, de 35 c. m. Recebe 0,2 mg. pela mesma via, Paretico ½ hóra depois; morto durante a noite.

Lachesis lanceolatus, de 40 c. m. Recebe 0,1 mg. pela mesma via. Paresia ligeira dentro de 1 hora. Normal na manhãn seguinte.

Certas especies de ophidios são menos sensiveis a este veneno:

Xenedon Guntheri, de 55 c. m. Recebe por via sub-muscosa 1 milligr. de veneno. Ligeira paresia desapparecendo rapidamente.

Os batrachios são dos animaes mais sensiveis a este veneno, apresentando os mesmos symptomas que os ophidios, com paralysia a principio posterior.

Paludicola signifera (rã). Recebe 0,05 mg. sob a pelle dorsal. Paralytica em 10 minutos. Morta em 15 minutos.

Hyla (sp?) perereca.—Recebe na coxa 0,1 mg. de veneno. Morte em 20 minutos.

Os sapos são um pouco mais resistentes:

Bufo crucifer, de 25 grs. Recebe 1 mg. de veneno sob a pelle dorsal. Paralysia em 45 minutos. Morte em 36 horas.

Dispondo, na media, uma Grammostola de 3 a 4 milligramas de veneno, verifica-se que facilmente póde matar qualquer reptil ou batrachio de que se nutre ordinariamente.

Minimas mortaes:

Para o pombo, por via venosa 5 milligrammas.
Para o coelho, por via venosa 5 milligrammas.
Para o cobaio, por via intramuscular 5 milligrammas.
Para L. lanceolatus de 35 a 40 c. m. por injecção sub-mucosa, 0,1 mg.
Para Paludicola signifera, 0,05 de mg.

Outras propriedades do veneno da G. acteon:

Verificamos que o veneno da G. acteon é desprovido de acção hemolytica sobre as hematias do coelho, de acção coagulante sobre o plasma ou de acção proteolytica sobre a gelatina.

Não fizemos pesquizas sobre propriedades antigenicas.

VENENO DA GRAMMOSTOLA LONGIMANA.

Todas as experiencias anteriores referem-se ao veneno da G. acteon. Foram repetidas com o da G. longimana, com os mesmos resultados, não havendo pois, necessidade de consignar-se aqui os novos protocollos.

Devemos registar o facto de não ser conhecido accidente algum no homem, determinado por qualquer d'estas especies.

Dadas as suas condições biologicas devem ser consideradas, sem perigo para o homem, e até certo ponto uteis, pois, contribuem naturalmente, para destruição das ninhadas de serpentes venenosas, que constituem seu alimento predilecto.

II

GENERO LASIODORA—VENENO DA LASIODORA CURTIOR, CHAMB.

O genero *Grammostola*, limitado aos Estados do Sul do Brasil, é substituido ao norte pelo genero *Lasiodora*; emquanto que uma unica especie de Grammostola attinge o Rio de Janeiro, as Lasiodora não passam ao Sul, do Estado de São Paulo, sendo encontrados ao norte por toda a America tropical.

São todas de grandes dimensões, sendo que algumas especies se registam entre as maiores aranhas conhecidas.

O genero Lasiodora, um dos melhores caracterisados entre as Theraphosidae se distinguem facilmente dos generos visinhos pelos seguintes caracteres: face posterior dos femures do 4.º par de patas, coberta por uma escova de pellos curtos e extremamente finos e rectos; patas espinhosas, todas as escopolas inteiras; presença, na face anterior da côxa do primeiro par de patas, de uma série de cordas baciliformes mais ou menos numerosas (orgão estridulento) sómente acima da sutura; dois espinhos apicaes na extremidade da tibia do primeiro par de patas; no macho, bulbo genital terminado em ponta fina e arqueada.

Dezoito especies brasileiras da Lasiodora foram descriptas, e assignaladas nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas, Espirito Santo, Bahia e Parahyba do Norte. Este genero, entretanto, deve ser encontrado em todos os Estados do Norte.

Como nas Grammostolas e na maior parte dos generos de *Theraphosidoe*, as differentes especies de Lasiodora se distinguem com difficuldade, pois, os caracteres descriminativos sobre os quaes se baseiam, colorido, tamanho, relação dos differentes segmentos dos membros, etc., estão sugeitos a grandes variações individuaes ou

sexuaes. Muitas especies descriptas devem cahir em synonimia ou passar a categoria de simples variedades locaes.

Deixando de lado o estudo da systematica de um grande numero de especies que um de nós (J. Vellard) teve occasião de fazer, trataremos, aqui tão sómente de duas especies que nos foi dado observar mais de um anno em captiveiro e cujo veneno pudemos estudar, a *Lasiodora curtior*, Chamb e a *Lasioodra Mariannae*, Mello Leitão.

Macho: Cephalothorax baixo, brusca e fortemente estreitado anteriormente, de região cephalica muito pouco elevada; fosseta posterior estreita, profunda e direita. Olhos: medianos um pouco menores do que os lateraes; os anteriores em linha prorurva, equidistantes; os lateraes posteriores, 1/3 menores do que os lateraes anteriores, dos quaes são separados por um pouco menos do que o seu diametro. As patas são compridas e eriçadas de numerosas cerdas. A coloração geral é menos escura: o cephalothorax coberto de pellos negros deitados, misturados de alguns pellos amarellos claros; margens limitadas por cerdas vermelhas; patas e abdomen com longas cerdas vermelhas erectas de base quasi negra, dão a esta aranha um aspecto muito caracteristico.

Macho: (Paulo Frontin—Estado do Rio). Comp. 45; cephalothorax 22/20; patas i=74; ii=68 iii=67; iv=82; pat.+tib. i=27; iv=27.

Femea: Cephalothorax relativamente mais elevado e mais longo do que o do macho, menos bruscamente estreitado anteriormente. Cerdas eriçadas das patas e do abdomen menos numerosas.

Femea adulta: (Paulo Frontin—Estado do Rio): Comp. 60—Cephalothorax 27/25; patas: i =82; ii=63; iii=60; iv=77; pat.+tib. i=28; iv=27.

Lasiodora Mariannae—Mello Leitão; é uma especie muito visinha da precedente, da qual se differencia principalmente pela coloração muito mais sombria, as patas e abdomen sendo eriçadas de longas cerdas pardo avermelhados. Recebemos desta especie apenas alguns exemplares de diversas localidades de Minas Geraes.

BIOLOGIA DAS LASIODORA.

A *Lasiodora curtior* e a *Lasiodora Mariannae* vivem, segundo informações de nossos correspondentes, nos mais diversos lugares; nas velhas arvores da floresta, no meio das culturas, especialmente nas de milho, occultando-se sob as folhas seccas das plantas, nos buracos dos barrancos; são igualmente frequentes nos ranchos de sapé, no porão ou no forro das casas velhas, nos lugares escuros das habitações, debaixo dos leitos etc.; durante o dia permanecem immoveis em seu escondrijo, isoladas do solo e da humidade por uma teia com que forra sua habitação; a noite sahem a caça. Muito ageis, correm rapidamente, podendo, com o auxilio das escopulas muito desenvolvidas de seus tarsos trepar ao longo das paredes as mais lisas e mesmo as de vidro; são muito irritaveis, principalmente os machos, tomando, quando são inquietadas, uma attitude de defesa semelhante a do Ctenus, com os dois pares de pata anteriores levantados; por

vezes tambem, como as Grammostolas, destacam do abdomen, com o auxilio das patas posteriores, pellos pequenos e muito finos, muito irritantes para a pelle e para as mucosas; quando irritadas, picam facilmente os animaes que lhe são apresentdos.

As Lasiodoras que estudamos, não se prestam, tambem, a observações, como as Grammostolas. Mesmo nos servindo de um grande numero de exemplares mantidos no laboratorio, durante muito tempo, só conseguimos estabelecer um numero limitado de factos da sua biologia.

Lasiodora curtior e *Lasiodora Mariannae*, apresentam os mesmos caracteres biologicos, pelo que assignalaremos apenas as observações feitas sobre a primeira destas especies, abundante e mais espalhada.

Alimentação: De todos os animaes que lhe foram offerecidos, insectos, (baratas e coleopteros), ophidios (Lachesis, Leptognatus, Liophis), batrachios (pequenos sapos, pererecas ou Hyla, rãns, Paludicola), lacertidios (Lygosoma ou lagartos, geckos, ou lagartixas), camondongos etc., a Lasiodora curtior se tem alimentado de pequenas rãns, serpentes, e principalmente de pequenos camaleões e lagartixas, dando notavel preferencia a estas duas ultimas especies. Em falta do alimento de predilecção se nutrem igualmente de serpentes que attacam como as Grammostolas; mas nunca conseguimos fazel-as acceitar insectos ou camondongos; quando são forçadas a mordel-os, matam-nos sem os devorar.

Do mesmo modo que as outras aranhas, tem necessidade de muita agua, que suga com avidez.

Reproducção: Não conseguimos obter em captiveiro, nem a fecundação, nem a reproducção, desta especie; em diversas épocas do anno ensaiamos a approximação dos dois sexos, sem o resultado esperado; quando se collocam as duas aranhas em presença, cada uma foge do seu lado, logo que se reconhecem, ou se empenham em lucta rapida, sendo sacrificada a menos agil, pelo adversario.

Não nós foi possivel igualmente registar, dado algum sobre o desenvolvimento desta especie. Do mesmo modo que a Grammostola, as Lasiodora passam pela muda uma ou duas vezes no anno, no começo ou no fim da estação quente.

ESTUDO DO VENENO DA LASIODORA CURTIOR.

O veneno da Lasiodora curtior é especialisado para os animaes de sangue frio e pouco activo para os mammiferos e para os passaros. Os batrachios e mais especialmente os lacertidios são extremamente sensiveis a acção deste veneno.

São os seguintes os phenomenos geraes de envenamento: periodo de agitação, seguido de allucinação e movimentos encoordenados semelhantes aos observados na embriaguez; os pombos sem apresentarem paralysia, não procuram entretanto, voar; correm de um para outro lado, cambaleando; deitam-se para se levantarem em seguida; os camondongos mostram-se apenas inquiétos e agitados; os batra-

chios executam saltos desordenados de todos os lados; rapidamente todos os movimentos tornam-se encoordenados, obrigando os animaes a deitarem-se, sobrevindo então a paresia e mais tarde a paralysia, no começo posterior; os animaes somnolentos, de olhos fechados, se despertam e reagem as excitações; pouco a pouco a paralysia se completa e a morte sobrevem, sem convulsões.

Por injecção endovenosa, a morte pode ser quasi que immediata, numa breve convulsão no pombo. Não ha hypersecreção, nem dyspnéa, nem reacção local notavel por injecção subcutanea ou intradermica. A quantidade de veneno produzido por uma só Lasiodora, varia de 3 a 4 milligrammas em media. Eis alguns de nossos protocollos:

Picada directa: Camondongo branco adulto de 22 grs. picado duas vezes ás 9 ½, por uma *Lasiodora curtior*, femea adulta, na coxa e no abdomen; depois de curto periodo de excitação, o animal experimenta difficuldade na marcha, torna-se paretico; depois apparece a paralysia, á principio anterior se generalisando rapidamente; cinco minutos depois de picado o camondongo deita-se com as patas apartadas, o focinho tocando o sólo, dyspnéa; a sensibilidade é conservada; começa a melhorar ás 4 da tarde; restabelecido completamente em 48 horas; ainda que o animal tenha ficado todo este tempo com a aranha e esta, em jejum ha duas semanas, recusa comel-o.

Com lagartixas e camaleões, observa-se a morte immediata, não largando a aranha a sua presa, senão depois de haver saciado a fome, devorando-lhe quasi completamente o corpo. O mesmo facto pode ser observado com rãns e pequenas serpentes.

Injecção de soluto de veneno em sôro physiologico:

Pombo 118.—Recebe ás 12 horas e 23 min., 3 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico, na veia. Agitação, incoordenação motora seguida de forte somnolencia; restabelecido ás 3 horas.

Pombo n.º 4—Recebe ás 12 h. e 39 min., por injecção endovenosa, 4 mgs. de veneno, em 1 c. c. de sôro physiologico. Curto periodo de excitação e de incoordenação motora, cerca de 1 minuto; o animal cahe agitado por movimentos incoordenados das patas, das azas, da cabeça e do pescoço; procura levantar-se sem o poder; apparecem a somnolencia e a paralysia; a cabeça e pescoço permanecem dobrados sobre o peito; as patas sobre o abdomen, sem contractura; as azas pendentes. Começa a melhorar ás 13 ½; normal no dia seguinte.

Pombo n.º 5—Recebe ás 13 h. e 23 min., 5 milligrs. de veneno por injecção endovenosa. Os mesmos symptomas que os observados no precedente, mas muito mais acentuados, acompanhados de vomitos. Começa a melhorar ás 15 horas.

Pombo n.º 9—Recebe ás 14 h. e 20 min., 6 milligrs. de veneno por injecção endovenosa; paralysia immediata; azas abertas, patas e pescoço distendidos. Morte em 1 minuto com fraca convulsão.

Coelho 69—Recebe ás 12 ½ horas, 5 milligrs. de veneno, em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa; nenhum symptoma a não ser passageira somnolencia.

Coelho n.º 27—Recebe por injecção intradermica, 5 milligrs. de veneno; ligeiro edema e vermelhidão, que desapparecem em 48 h., sem deixar ulceração.

Camondongo—Recebe ás 12 ½, 1 milligr. de veneno em 1 c. c. de sôro physiologico, na coxa direita; não foram observados signaes, de dôr após a

injecção; immobilidade e somnolencia; fica curvado sobre o sólo, com as patas distendidas. Restabelecido em 3 horas.

Lachesis lanceolatus, de 35 c. m., recebe 1 milligr. de veneno, por injecção submucosa; excitação seguida de incoordenação de movimentos e de ligeira paresia; restabelecida em 1 hora.

Lachesis lanceolatus, de 40 c. m., recebe 2 milligrs. de veneno por injecção submucosa; mesmos symptomas que na precedente, seguidos de paresia e paralysia; começa a melhorar duas horas depois. Restabelecido na manhã seguinte.

....

Paludicola signifera (rã), de 8 grs., recebe 1 mg. em 0,2 de sôro physiologico, por injecção subcutanea na região dorsal; viva agitação immeditta; saltos desordenados, tornando-se irregulares; paralysia, no começo posterior, dois minutos depois da injecção. 3 minutos depois da injecção, paralysia completa e morte.

Paludicola signifera (rã), de 5 grs.; recebe 0,3 de mgr. em 0,1 c. c. de sôro physiologico, por injecção subcutanea; agitação e paralysia em 1 minuto, morte em 4 minutos. ..

Bufo crucifer: (sapo) de 35 grs.; recebe 2 milligrs. de veneno em 1 c. c. por injecção na coxa esquerda; forte paresia posterior em 15 minutos; em 30 minutos, as patas posteriores estão completamente paralysadas; começa a melhorar 1 hora depois da injecção; normal no dia seguinte.

Lygosoma sp.? (lagarto pequeno), recebe 0,2 de mgr. em 0,1 c. c. de sôro physiologico, sob a pelle dorsal; paralysia em 1 minuto, morte em 14 minutos.

De nossas experiencias resulta um facto; é que o veneno da Lasiodora é menos activo do que o da Grammostola possuindo embora maior actividade para os animaes de sangue frio, do que para os de sangue quente, sendo ainda para notar-se a extrema sensibilidade dos lacertidos, que constituem justamente o seu alimento de predileção.

Acção hemolytica, proteolytica e coagulante:

Este veneno é destituido de acção hemolytica sobre os globulos de coelho, proteolytica sobre a gelatina e coagulante sobre o plasma citratado do coelho e do carneiro.

Veneno de Lasiodora mariannae:

A actividade do veneno desta especie é perfeitamente comparavel ao da especie precedente.

Não conhecemos accidente algum, no homem, determinado por qualquer destas especies.

III

GENERO ACANTHOSCURIA

VENENO DA ACANTHOSCURIA STERNALIS, POCOCK.

A *Acanthoscuria sternalis*, Pocock pertence a familia das *Theraphosidae*, mas não attinge jamáis a tão grandes dimensões como a das especies anteriormente estudadas.

O genero Acanthoscuria, largamente espalhado na America do Sul, tem representantes na Argentina, no Brazil, na Bolivia, na Guyana, na America Central e nas Antilhas. Algumas especies são de tamanho assaz reduzido; outras podem rivalisar em dimensões com a Lasiodora e Grammostola. E' muito visinho do genero Lasiodora, caracterisa-se por suas patas espinhosas, por suas escopulas anteriores inteiras, pela existencia de uma escova de pellos finos, collocada na face posterior dos femures do 4.° par, pela presença de cerdas baciliformes limitadas aos trochanteres dos palpos e do 1.° par de patas; a tibia do macho é provida de uma só espora apical interna, terminada por um rastellum formado de um numero variavel de dentes; a tibia do palpo apresenta na face externa para o terço apical uma apophyse lateral conica, comparada a uma espinha de roseira e a extremidade do bulbo é larga e achatada. Vinte e trez especies brasileiras foram descriptas. Algumas d'estas cahiram em synonimia por terem sido descriptas como especies differentes, representantes dos dois sexos da mesma especie, como aconteceu com a *A. sternalis;* muitas outras especies existem que não foram ainda descriptas, pois, este genero é dos mais abundantes e de distribuição geographica mais extensa.

Estudamos até o presente o veneno de duas especies de Acanthoscuria, a *Acanthoscuria sternalis*, Pocock, e a *Acanthoscuria atrox*, Vellard.

Estes dois venenos apresentam grandes differenças entre si, o segundo sendo muito mais activo e de acção mais rapida do que o primeiro; mas não tendo ainda terminado o seu estudo, occupar-nos-emos tão sómente com o veneno da Acanthoscuria sternalis, especie muito commum em S. Paulo e mesmo nos terrenos do proprio Instituto.

A. sternalis foi descripta por *Pocock* tendo em vista um exemplar femea oriundo d'Argentina (Tucuman), revista por *E. Strand* e por *Mello Leitão* que a assignalou no interior de S. Paulo. O macho foi descripto por este ultimo autor sob o nome de *A. gomesiana*. Esta especie não attinge nunca grandes dimensões em geral de 30 a 40 c. m.

Macho:—Cephalothorax baixo, de região cephalica pouco elevada, brusca e fortemente estreitada anteriormente; fosseta posterior profunda, ligeiramente procurva. Olhos: anteriores em linha procurva (bordo anterior dos medianos, parallelo ao 1/3 anterior dos lateraes), eguaes, os medianos separados entre si por seu diametro, metade menos dos lateraes; lateraes posteriores um pouco menores do que os lateraes anteriores dos quaes são separados por cerca do seu meio diametro. Coloração: Cephalothorax cinzento pardo, com ligeiro tom esverdeado, as patas mais escuras, com alguns pellos compridos mais claros e avermelhados e com as extremidades claras; abdomen aveludado, pardo negro com pellos longos da côr de ferrugem. Comp. 32; cephalothorax 17/15; abd. 15/10; patas; i=43; ii=39; iii=37; iv=46,5; pat.+tib. i=16; pat. +tib. iv=15,5.

Femea:—Cephalothorax elevado, de região cephalica convexa, pouco attenuada anteriormente, pouco mais ou menos do mesmo comprimento que a patella mais a tibia do primeiro ou do 4.º par. Coloração semelhante ao do macho. Comp. 42 m. cephalothorax 17/15; abdomen 20/15; patas: i=45; ii=38; iii=36; iv=49,5 patella mais tibia i=17; patella mais tibia iv=16,5.

BIOLOGIA

Esta especie é essencialmente nocturna; permanece occulta durante o dia, principalmente nos buracos dos barrancos, forrados por ligeira tela sedosa no fundo; algumas vezes debaixo das pedras ou no buraco das arvores e por vezes no interior dos cupins. Accidentalmente pode penetrar no interior das habitações. Assaz lenta e pouco aggressiva, não procura morder a excepção da femea, quando tem o sacco de ovos. Em captiveiro difficilmente picam os animaes em experiencia. A fecundação não poude ser observada no laboratorio, pois, collocadas uma em frente da outra, fogem cada qual para um lado ou travam lucta cruenta. A femea traz muitas vezes o sacco de ovos, com o auxilio das patas; sacco este de forma discoide, constituido de rêde branca podendo conter mais de 500 ovos.

Alimenta-se bem, em captiveiro, de pequenos animaes, principalmente de pequenos batrachios; em liberdade deve alimentar-se de toda a sorte de pequenos animaes, que caça durante a noite. Não parece ter preferencia para uma determinada especie animal. Conseguimos fazel-a acceitar outras aranhas vivas ou mortas ou insectos, baratas, bezouros, gafanhotos, etc.

Os habitos terricolas da A. sternalis, não collocam-n'a ao abrigo dos attaques de seus inimigos. Uma grande especie de Sphecidáe, ou marimbondo caçador transporta jovens exemplares de Acanthoscuria e algumas vezes mesmo exemplares quasi adultos para o interior de seus ninhos cavados no sólo, para alimentar as suas larvas. A lucta entre os dois adversarios passando-se no interior da morada da aranha não nos foi possivel observal-a. O hymnoptero paralysa sua victima por meio do veneno especialisado para esse fim; por vezes o effeito paralysante é incompleto ou de acção passageira e a aranha pode ainda locomover-se e escapar da casa do seu inimigo.

Estudo do veneno.—O veneno d'esta especie, comquanto pouco activo é interessante a estudar. De acção mais accentuada do que o da Grammostola ou o da Lasiodora, se exerce principalmente sobre o systema nervoso; mas emquanto que, com os venenos neuro toxicos precedentemente estudados, o de Ctenus e o de Trechona, a principal acção se exerce sobre os centros bulbo-medullares, o da A. sternalis actua sobre os centros nervosos superiores.

Em todos os animaes observa-se pouco tempo depois da injecção de veneno ou da picada, uma primeira phase de excitação com augmento da sensibilidade e dos reflexos; logo os movimentos tornam-se incoordenados; os animaes em estado de embriaguez; o pombo não procura mais voar; corre em todos os sentidos cambaleando; deita-se, levanta-se, arrula, agita-se como se preparasse o ninho; es-

tende frequentemente o pescoço, agita as patas as azas e distende a cauda etc.; o camondongo e o cobaio debatem-se na gaiola, perdem o equilibrio, cahem, levantam-se, tomados de extraordinaria agitação; nas intoxicações graves observa-se deste esse momento, tremores generalisados, polypnéa e vomitos; todas as secreções são augmentadas; ha polyuria e diarrh.a; segundo a dose de veneno injectado, este periodo de excitação e de hallucinação, pode ser mais ou menos accentuado e prolongado, podendo não haver tempo de produzir-se, ou ao contrario apresentar-se com exclusão de qualquer outro symptoma. E' seguido ordinariamente de grande depressão; os animaes ficam immoveis, cahidos; o pombo pousado sobre os tarsos, com o pescoço e a cabeça dobrados sobre o peito; o coelho, o cobaio e o camondongo com os olhos fechados, as patas distendidas, o focinho sobre o sólo; a dyspnéa é intensa, um filete de baba escapa-se da bocca, a somnolencia e a paresia são cada vez mais accentuadas; fortemente excitados, os animaes despertam, para cahirem de novo em torpor; entretanto, a sensibilidade é conservada; depois de um tempo variavel, de ordinario, assaz longo, a morte sobrevem, ou ao contrario os symptomas se attenuam e o animal se restabelece; não se observam convulsões, nem contracturas; algumas vezes os animeas escapam a morte, mas as perturbações nervosas muito profundas não retrocedem ou não desapparecem senão parcialmente: um dos nossos pombos (n.º 131), 6 semanas depois da injecção do veneno, apresentava sempre os mesmos symptomas de asthenia e estupor, continuamente deitado, com o pescoço inclinado com a cabeça em flexão sobre o peito, não sahindo momentaneamente do estado de torpor, senão depois de ter sido fortemente excitado; alimentando-se com difficuldade emmagrece de modo notavel e cahe em verdadeira cachexia. Morreu no 46.º dia da observação.

A acção local não é muito intensa, consistindo ordinariamente em edema mais ou menos extenso e de vermelhidão, desapparecendo geralmente em 48 horas.

A necrose porém, é excepcional, mesmo em consequencia da injecção intradermica.

Este veneno age sobre todas as especies de animaes, não revelando acção electiva para um determinado grupo.

Um exemplar de A. sternalis fornece em media de 2 a 2,5 milligrammas de veneno secco, dose esta provavelmente muito fraca, para occasionar accidente grave no homem ou nos grandes animaes.

Eis alguns de nossos protocollos de experiencias com este veneno:

PICADA DIRECTA:

Camondongo, branco de 16 grs.; picado ás 9 horas e 20 minutos na coxa direita por uma A. sternalis femea adulta, em repouso desde muitos dias; grande excitação durante 3 minutos; depois difficuldade na marcha, perda de equilibrio, paresia, immobilidade, somnolencia, salivação; começa a melhorar ás 11 horas; os symptomas porém, não desappareceram completamente, senão no dia seguinte.

Cobaio, 320 grs.; picado 5 ou 6 vezes consecutivas no focinho ás 13 horas e 15 minutos por uma femea adulta em repouso; dor momentanea, gritos, exci-

tação, espirros, salivação, perturbações na marcha, paresia, somnolencia, symptomas estes que se attenuam duas horas depois da picada; pequeno edema do focinho, que desapparece ao fim de 48 horas.

injecção de veneno:—Soluto em sôro physiologico:

Pombo n.º 71, recebe ás 14 horas e 40 minutos 2 milligrammas de veneno secco em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa. Ligeiros symptomas de excitação, perturbações motoras e somnolencia pouco accusadas; restabelecido ás 17 horas.

Pombo 158, recebe ás 3 horas e 35 minutos em 1 c. c. de sôro physiologico por injecção endovenosa, 3 milligrammas de veneno; agitação immediata e violenta; corre em todas as direcções sem procurar voar; ás 13 horas e 45 minutos deita-se com o pescoço e a cabeça dobrados sobre o peito, dyspnéa intensa, tremores generalisados, vomitos, somnolencia e estupor; um pouco melhor na manhã seguinte e restabelecido em 48 horas.

Pombo 131, recebe em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa, 4 milligrammas de veneno ás 12 horas e 51 minutos; symptomas semelhantes aos precedentes, mas mais accentuados; o periodo de allucinação mais accusado, estupor e a somnolencia muito profunda; quasi nenhuma melhora no dia seguinte; 6 semanas mais tarde o estado de estupor e a attitude não se modificaram; o emagrecimento é profundo; morte no 46.º dia depois da injecção.

Pombo n.º 9, recebe em 1 c. c. de sôro physiologico, por injecção endovenosa 5 milligrammas de veneno; durante 1 minuto corre allucinado em todas as direcções, depois cambaleia e deita-se, com a cabeça e o pescoço dobrados sobre o peito; morte em 5 minutos sem convulsões.

Coelho 335, peso 1100 grs., recebe em 1 c. c. de sôro physiologico por injecção endovenosa, ás 13 horas e 25 minutos, 4 milligrammas e 75 centesimos; tremor, sem outros symptomas.

Coelho 337, peso 1050 grs., recebe em 1 c. c. de sôro physiologico por injecção endovenosa, ás 13 horas e 25 minutos, 4 milligrammas e 75 centesimos de veneno; dyspnéa immediata muito forte, grandes tremores generalisados, paresia; deitado sobre o ventre com ás 4 patas affastadas, o focinho sobre o sólo; salivação abundante; restabelecido ás 17 horas e ½.

Cobaio 336, recebe ás 13 horas e 17 minutos por injecção intra-muscular, 2 milligrammos e 4 decimos de veneno em 1 c. c. de sôro physiologico; crises violentas durante uma hora; o animal esfrega e morde o lugar da injecção; ligeira excitação seguida de somnolencia; começa melhorar ás 17 horas para restabelecer-se na manhan seguinte sem reacção local.

Cobaio 340, recebe por injecção intradermica um mg. e dois decimos de veneno em 1 gotta de glycerina; no dia seguinte reacção local, forte edema e vermelhidão da pelle circumvisinha; formação posterior de uma pequena escara de 4 a 5 millimetros de diametro eliminada no 5.º dia.

Cão n.º 2, recebe em injecção intradermica no abdomen 1 milligramma e 2 decimos de veneno em 1 gotta de glycerina; no dia seguinte edema moderado e vermelhidão da pelle circumvisinha, desapparecendo 48 horas depois sem formar escara.

Lachesis lanceolatus, de 30 c., recebe ás 14 horas e 34 minutos por injecção sub-mucosa 2 decimos de milligramma de veneno em ½ c. c. de sôro physiologico; paretica ás 16 horas, restabelecida no dia seguinte.

Lachesis lanceolatus, de 25 c., recebe ás 14 horas e 17 minutos por injecção sub-mucosa 4 decimos de milligramma do veneno em ½ c. c. de sôro physiologico, viva agitação durante 5 minutos; paretica ás 14 ½ horas, paralytica ás 15 horas; morte em 20 horas.

Paludicola signifera, (Rã), recebe debaixo da pelle da região dorsal ás 14 horas e 25 minutos 4 decimos de milligrammas em ½ c. c. de sôro physiologico, saltos desordenados durante 1 minuto, paresia posterior em 2 minutos, paralysia em 5 minutos, morte em 7 minutos.

Paludicola signifera, (Rã), recebe 2 decimos de milligramma de veneno em ½ c. c. de sôro physiologico ás 14 horas e 38 minutos; paralysia em 5 minutos, morte em 15 minutos.

Hyla (Sp.?), pereréca, recebe 0,2 de mg. de veneno em ½ c. c. de sôro physiologico sob a pelle da região dorsal ás 15 horas e 58 minutos; saltos desordenados, seguidos de paresia posterior, ás 13 ½; morte durante a noite.

Hyla sp.? (pereréca), recebe ás 14 horas e 50 minutos 0,1 de milligrammas em ½ c. c. de sôro physiologico sob a pelle da região dorsal; ligeira paresia ás 16 ½, morte a noite.

Hyla sp.? (pereréca), recebe ás 14 horas e 42 minutos 0,05 de milligramma em ½ c. c. de sôro physiologico sob a pelle da região dorsal; nenhum symptoma ás 16 ½; normal no dia seguinte.

ACÇÃO HEMOLYTICA PROTEOLYTICA E COAGULANTE.

O veneno da Acanthoscuria sternalis é desprovido de acção coagulante sobre o plasma citratado de coelho e de acção proteolytica sobre a gelatina; possue entretanto ligeira acção hemolytica como já tivemos occasião de assignalar em nosso primeiro trabalho:

TUBO	Veneno	Sôro de cavallo inactivado 58°	Sôro physiologico
1	1 mg.	0,2	—
2	0,5 »	0,2	0,5
3	—	0,2	1 c. c.
4	1 mg.	—	0,2

A cada tubo junta-se 1 c. c. de suspensão a 5 °/° em sôro physiologico de globulos de coelho.

Nenhuma hemolyse depois de 5 horas de banho Maria a 37° commeçando a hemolyse depois de 24 horas nos tubos 1 e 2.

Não fizemos experiencia alguma sobre o poder anti-genico deste veneno nem sobre a acção do sôro anti-cteno lycosico sobre o mesmo, em razão da sua fraca toxicidade.

Os accidentes determinados por esta especie devem ser extremamente raros.

Só tivemos occasião de observar um caso occorrido nas proximidades da Capital, em um individuo que nos procurou no laboratirio trazendo a aranha morta que fôra identificada e narrando-nos o seguinte: descera ao porão de sua casa a procura de um objecto qualquer quando introduzindo a mão em um vaso, sentira a dôr de uma picada e retirando-a trouxe agarrada ao dedo uma grande carangueijeira, que elle matou. A despeito dos signaes deixados pelos dois ferrões nenhum symptoma de envenenamento apresentava o

paciente, pelo que o tratamento consistio apenas na applicação de um anti-septico local.

O estudo que acabamos de fazer do veneno de trez especies de caranguejeiras, pertencentes a generos differentes, comparado ao da Trechona venosa estudado precedentemente, mostra uma grande diversidade de acção dos venenos das Mygalomorphae ou aranhas caranguejeiras; emquanto que o ultimo é extremamente activo matando o pombo com a dóse de 0,02 de milligramma e algumas vezes mesmo de 0,01 o da Lasiodora curtior não mata este mesmo animal senão com uma dóse de 6 milligrammas e os da Grammostola acteon e o da Acanthoscuria sternalis com a dose de 5 milligrammas.

Não devemos entretanto generalisando estes factos concluir que todas ás *Dipluridae* sejam extremamente venenosas emquanto que as *Theraphosidae* possuem uma secreção pouco toxica ou especialisada para os animaes de sangue frio. O grupo das *Mygalomorphae* é enorme; seus representantes divididos em um grande numero de generos, de dimensões e habitos muito differentes, se tem adaptado pouco a pouco cada um a condições de vida muito especialisadas, impostas pelo meio e pelas necessidades particulares a cada especie; dahi naturalmente grandes modificações da secreção venenosa visando adaptação ao genero de nutrição ao alcance de cada especie.

Ao lado de carangueijeiras que possuem um veneno muito activo para os ophidios, pouco activo para os mamiferos e passaros, como a Grammostola acteon, assignalamos a Lasiodosa curtior cujo veneno age principalmente sobre os lacertidios e os pequenos batrachios e a Acanthoscuria sternalis cuja secreção não tem actividade especial para um grupo determinado.

Em o nosso proximo trabalho, estudaremos duas outras Theraphosidae, a Acanthoscuria atrox e a Phormictopus carcerides, cujo veneno extremamente activo mata o camondongo em poucos instantes.

Butantan, 1.º de Outubro de 1926.

CONTRIBUTION A' L'ETUDE DU VENIN DES ARAIGNéES

PAR LES DRS.

VITAL BRAZIL ET J. VELLARD.

(2 *éme memoire*)

SOMMAIRE

I

1—La *Lycosa raptoria* et la *Ctenus nigriventer*, araignées très communes dans la Capitale et l'état de S. Paulo, sont responsables de la presque totalité des accidents que l'on y observe.

En un an, plus de 30 accidents dus á ces 2 espéces, dont quelques uns extrêmement graves, ont été observés et traités a l'Institut de Butantan.

Le venin de la Lycosa raptoria, dépourvu d'action générale, détermine une réaction locale intense accompagnée de vaste sphacèle cutané; celui de la *Ctenus nigriventer*, détermine au contraire des accidents généraux très graves et immédiats, tachycardie et hypothermie, contractions musculaire, crampes, convulsions toniques, douleurs intenses irradiantes, sueurs profuses, anurie, etc., et parfois la mort en quelques heures.

2—Contre ces deux venins, deux serums spécifiques, l'anti-lycosico et l'anti-ctenus et um polyvalent, l'anti cteno'lycosico ont été preparés.

Ces deux serums ont été employées avec succès dans de nombreux accidents dus à ces 2 espèces d'araignées; leur action est strictement specifique, ne s'exerçant que vis à vis des venins ayant servi à leur préparation, mais est nulle en relation à d'autres venins d'araignées, soit d'action locale, soit d'action générale.

3—L'immunisation locale par voie intradermique des animaux producteurs de serums donne de meilleurs résultats lorqu'il s'agit de venins d'action nécrosante locale; il n'y a pas d'avantage à l'utiliser dans le cas de venins d'action générale.

4—La toxicité du sang des araignées n'a rien de commum avec celle du venin des espéces correspondantes; um serum très actif contre um venin déterminé reste sans action sur le sang de la même espèce.

II

5—Diverses espèces d'araignées, appartenant au genre *Latrodectus* sont très redoutées en de nombreux pays, occasionnant souvent des accidents graves et même mortels.

Deux espèces existent en Amérique du Sud, *Lactrodectus mactans* et *Latrodectus geometricus*.

6—*Latrodectus mactans*, ná pas été avec certitude signalé au Brésil, mais doit y exister en plusieurs régions, etant répandu du Chili jusquáux Etats Unis et chaque année détermine dans les pays voisins de nombreux accidents.

Son venin possède surtout une action neurotoxique, caracterisée chez les animaux de laboratoire de même que chez l'homme par des douleurs très fortes irradiantes, tremblements et crampes avec paroxysmes, dyspnée, hyperesthésie, hypersécrétion, puis parésie et paralysie tardive suivie de mort.

Le cobaye est très sensible à ce venin, la souris um peu moins.

7—Le *Latrodectus geometricus*, espèce tropicale et cosmopolite est commun au Brésil et les Auteurs en ont suivi toute l'évolution; son venin d'action qualitativement semblable à celle du *L. mactans* est beaucoup moins intense; on ne connait pas d'accidents dus à cette espèce.

8—Les traitements symptomatiques conseillés dans les accidents occasionnés par le *L. mactans* étant inefficaces, *la préparation d'un serum spécifique s'impose dans les pays ou' ette espèce est abondante.*

III

9—La *Grammostola acteon*, une des plus grandes Theraphosidae connues, est abondante dans les Etats du Sud du Brésil.

Toute sa biologie a pu être etudiée par les Auteurs et enregistrée cinématographiquement: fécondation, alimentation, naissance et développement des jeunes, etc.

Son venin, presque sans effet sur les animaux à sang chaud, est extrêmement actif pour les animaux à sang froid, spécialement les ophidiens dont se nourit habituellement cette espèce, concourant ainsi à la destruction des nichees de jeunes serpents venimeux.

10—La *G. longimana*, autre espèce du même genre a des moeurs semblables à celles de la G. acteon et son venin présente les mêmes particularités.

IV

11—La *Lasiodora curtior*, autre espèce de Theraphosidae de très grande taille possède également un venin peu actif pour les animaux à sang chaud, moins actif que celui de la G. acteon pour les ophidiens; il agit spécialement sur les petits batraciens et surtout les lézards.

Aucun accident chez l'homme n'a été attribué à cette espèce.

V

12—L'*Acanthoscuria sternalis*, de taille plus petite que les espéces précédentes appartient encore à la même famille des Theraphosidae. Son venin déterminant chez les animaux de laboratoire, des phénoménes d'excitation et d'hallucination, suivis de paralysie, nést pas très énergique et ne possède aucune affinité spéciale vis à vis de groupes determinés d'animaux. Le seul accident observe chez l'homme n'a été accompagné d'aucun symptome grave.

VI

13—A' côté de ces Theraphosidae, ne possédant qu'un venin peu actif pour les animaux à sang chaud, en existent d'autres, telles que l'*Acanthoscuria atrox* et le *Phormictopus carcerides*, qui seront etudieés spécialement dans um prochain mémoire, capables de tuer em peu d'instants de petits mammiféres.

14—L'action du venin de chaque espèce d'araignée étant spécifique, il faut s'appliquer à connaitre dans chaque région les espèces causant le plus fréquemment des accidents, afim de préparer des serums spécifiques correspondants, soit monovalents, soit de préférence polyvalents.

15—*En cas d'accidents provoqués par les araignées, tout traitement symptomatique étant inefficace, le traitement sérothérapique spécifique simpose.*

Butantan 1.er Octobre 1926.

BIBLIOGRAPHIA

(Continuação)

60 — *Montgommery, Thomas H.*—Studies of the habits of spiders, particularly those of the mating period. Proc. of the A. of Nat. Sc. of Philadelphia. Vol. IV—1 pag. 149-1903.
Observation sur la fécondation, ponte fabrication du cocon, naissance et développement de diverses espèces de Lycosidae, Agalenidae, Dictynidae, Theridiidae, Pholcidae, Epeiridae, Thomisidae, Philodromidae et Drassidae.

61 — *Peckham, G. W.* and *E. G.*—Observations on sexual selection in spiders of the Family Attidae. Occas. Papers. Nat. Hist., Soc. Wisconsin. 1-1889. — Additional observations on sexual selection in spiders of the family Attidae Occs. Papers. Nat. Hist. Soc. Wisconsin.2-1890.

62 — *Brazil, Vital* e *Vellard J.* — Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. Sôro contra o veneno da *Lycosa raptoria*. Methodo de dosagem. Communicação feita á Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo em 8 de Maio de 1925. Brazil Medico 1925— Contribuição ao estudo do veneno das aranhas. Aranhas inimigas das serpentes. Genero Grammostola, Communicação feita á Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo em 8 de Julho de 1925.—Brazil Medico, 1925.—Contribuição ao estudo do veneno das aranhas.—Immunização por via intradermica e por via subcutanea.—Sôro anticteno.—Methodo de dosagem e primeira applicação no homem.—Communicação feita á Sociedade de Biologia e Hygiene de S. Paulo em 17 de Outubro de 1925.— Brazil Medico—1925.

63 — *Baerg* — W. J. The effect of the venom of some supposedly poisonous Arthropods of the canal Zone. Annals of the Entomological Society of America. Vol. XVIII.—4—pag. 471—Déc. 1925.—(Etude du venin de 2 espèces de theraphosidae, Psalmopoeus pulcher et Sericopelma communis par piqure directe sur des rats, lapins et cobaies et sur l'omme).

64 — *Culpepper, M. B.* — Southerm Medic. Ott. 1925—"Décrit quelques cas d'aranéisme observés au Nouveau Mexique; la morsure de quelques grosses espèces d'araignées, dáction locale faible, détermine après quelque heures de graves troubles nerveux, violentes douleurs généralisées, angoisse extrême, suffocation, sensation de mort imminente et après la disparition des phénoménes aiguspersiste une faiblesse très grande pou-

vant se prolonger pendant plusieurs semaines" (Annalyse des Annali d'Ygiene.—Roma n.° 6-7, p. 621 an. XXXV 1925, n'ayant pas encore pu nous procurer le travail original).

65 — *Bogen, Emil.* — Arachnidism. — J. Americ. Med. Ass. 1926, v. 86 n.° 25; p. 1894, (e 1926 vol. 16 n.° 1, pag. 19 da edição espanhola).

66 — *Denski P. St.* — Le venin des araignées et leur action sur l'organisme animal.—Travaux de la Société bulgare de Sciences naturelles, n.° 7. Sofia, 1925, pag. 1-7, (écrit em bulgare avec résumé en français). Se basant sur la littérature et ses propres recherches, l'A. arrive à la conclusion que le venin des chélicértes est complément inoffensif, mais que "le sang et le suc du corps" des araignées possèdent des proprietés toxiques très elevées; si les morsures d'araignées sont parfois suivies de conséquences facheuses, ceci serait du non au venin, mais "a l'action du sang de l'araignée tuée sur le petite plaie produite par la morsure".

67 — *Octavio Torres.* — Algumas observações sobre a biologia das aranhas do genero Theraphosa. Revista da Soc. brasileira de Sciencias. Novembro 1921. b) Contribuição ao estudo de algumas lesões determinadas pelos Arthropodos (Arachnideos, myriapodos e insectos). Annaes da 2.ª Conferencia Sul America de Dermatalogia o Syphiligraphia reunida em Montevideo, (12-10-1921).



Injecção intradermica de veneno de Lycosa raptoria no coelho. Perfuração da orelha.
Injection intradermique de venin de Lycosa raptoria. Perforation de l'oreille.



Mordedura de Lycosa raptoria. Evolução sem tratamento. 1 mez depois do accidente.
Morsure de Lycosa raptoria. Evolution sans traitement. 1 mois après l'accident.



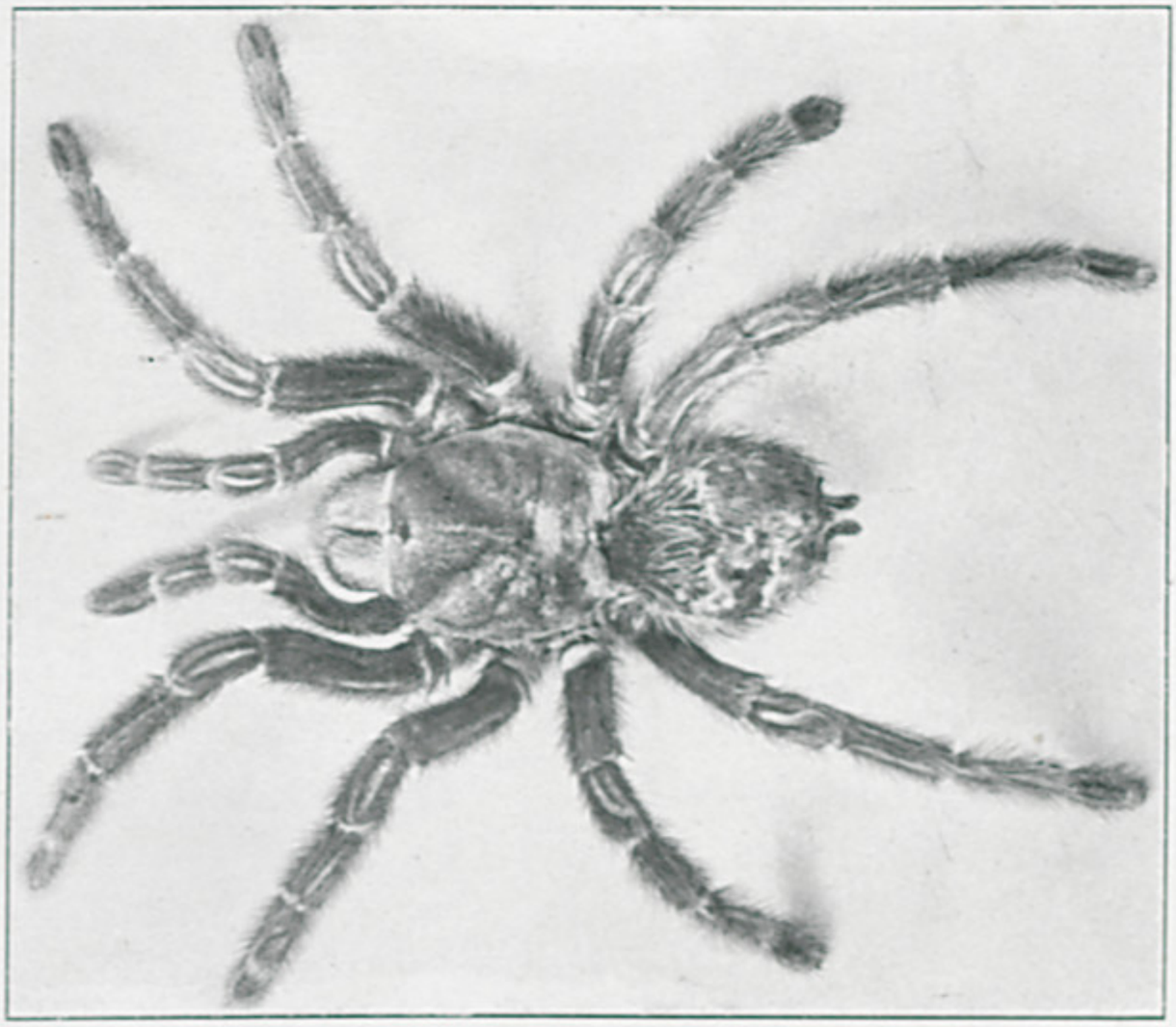
Mordedura de Lycosa raptoria. Evolução sem tratamento. Aspecto no 18º dia depois do accidente.
Morsure de Lycosa raptoria. Evolution sans traitement. Aspect le 18e jour après l'accident.



Grammostola acteon Poc. ♂
Tamanho natural



Grammostola longimana M. L. ♂ Tamanho natural



Grammostola longimana M. L. ♀
4/5 do tamanho natural



Grammostola acteon Poc. ♀
4/5 do tamanho natural

Biologia da Grammostola

Refeição de uma Grammostola

Repas d'une Grammostola



Grammostola longimana devorando uma pequena cascavel *(Crotalus terrificus)*
Grammostola longimana dévorant un petit serpent à sonnettes *(Crotalus terrificus)*

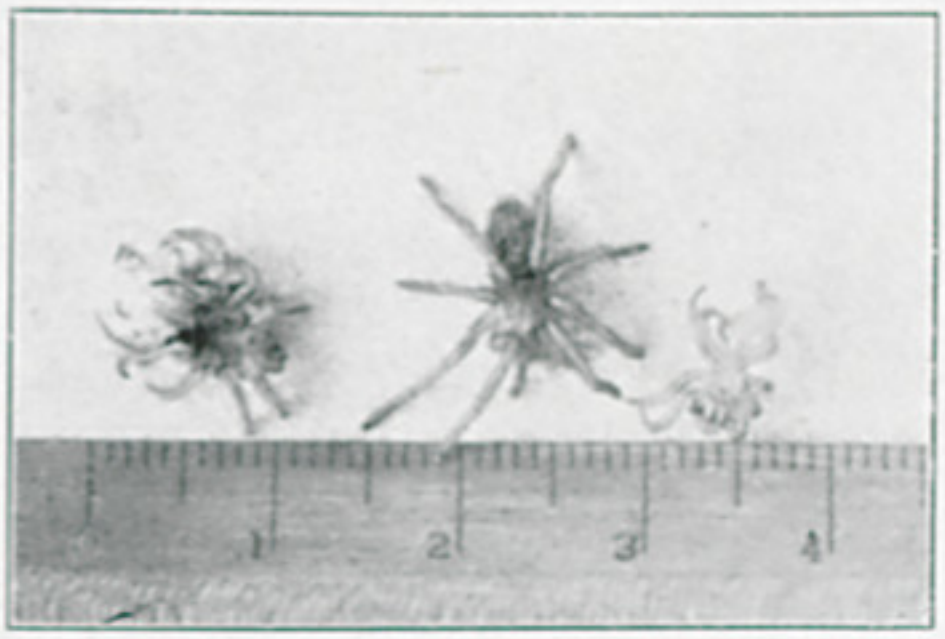


a. Parte da serpente rejeitada durante a refeição.
Partie d'un serpent rejetée durant le repas.

b. Residuos abandonados depois da refeição.
Residu abandonné après le repas.

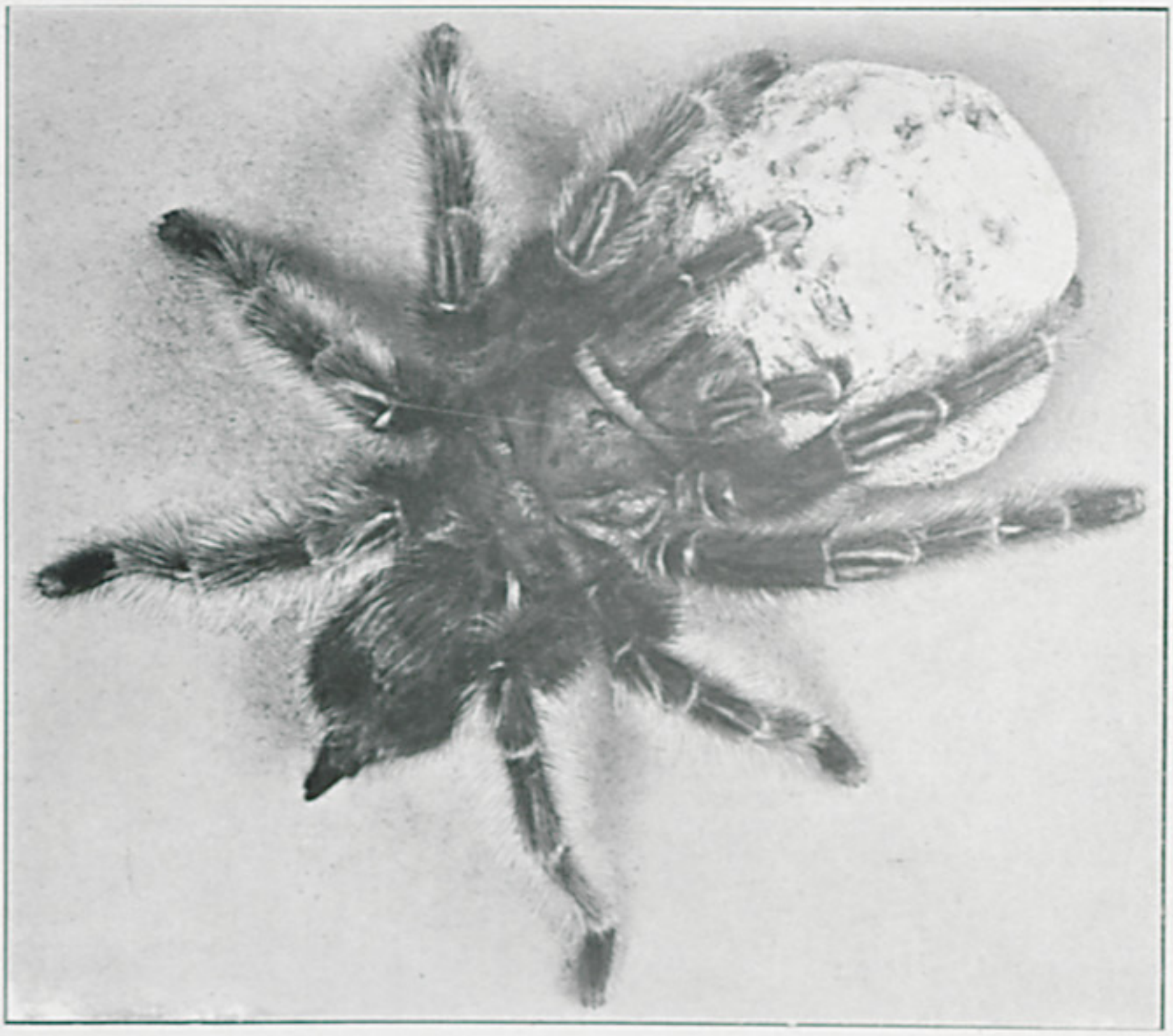


Pequenas Grammostolas ao sahir do sacco de ovos.
Petites Grammostola au sortir du cocon.



Pequenas Grammostolas depois da primeira muda no 3° dia.
Petites Gram. après la 1ère mue le 3ème jour après la naissance.

Biologia da Grammostola



Grammostola acteon Poc. ♀ com o sacco de ovos. ♀ avec son cocon rempli d'œufs.



Grammostola longimana M. L. 1.ª phase da fecundação. 1ère phase de la fécondation.

Biologia da Grammostola

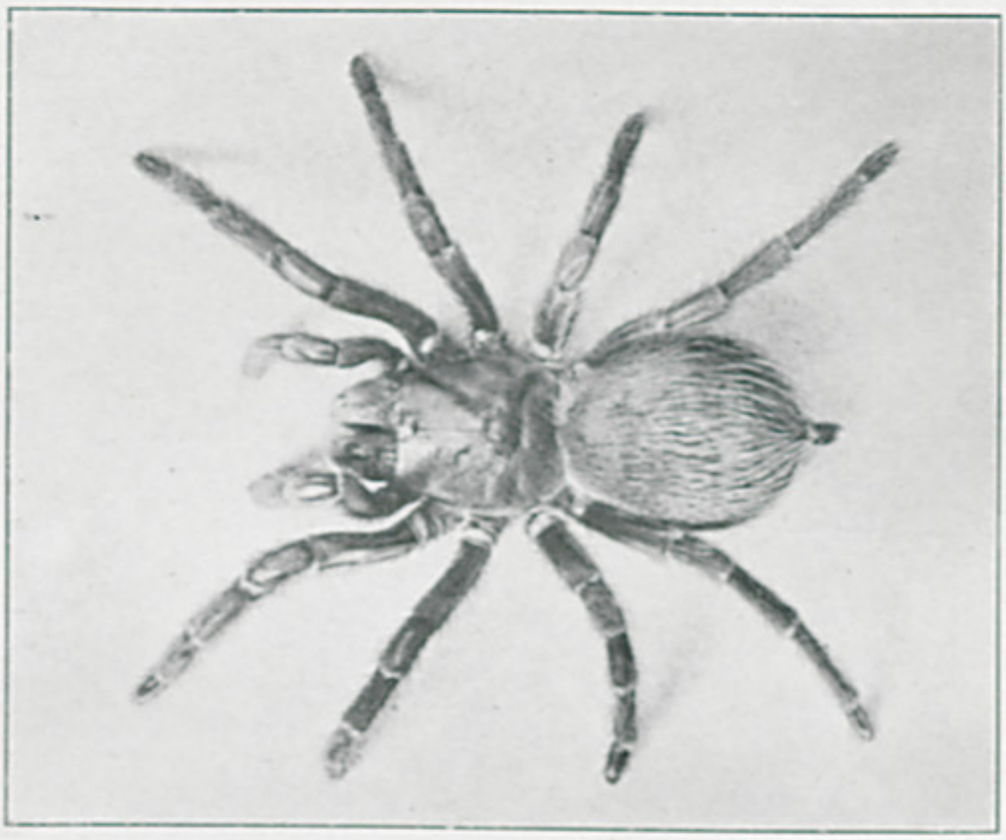


Grammostola longimana M. L.

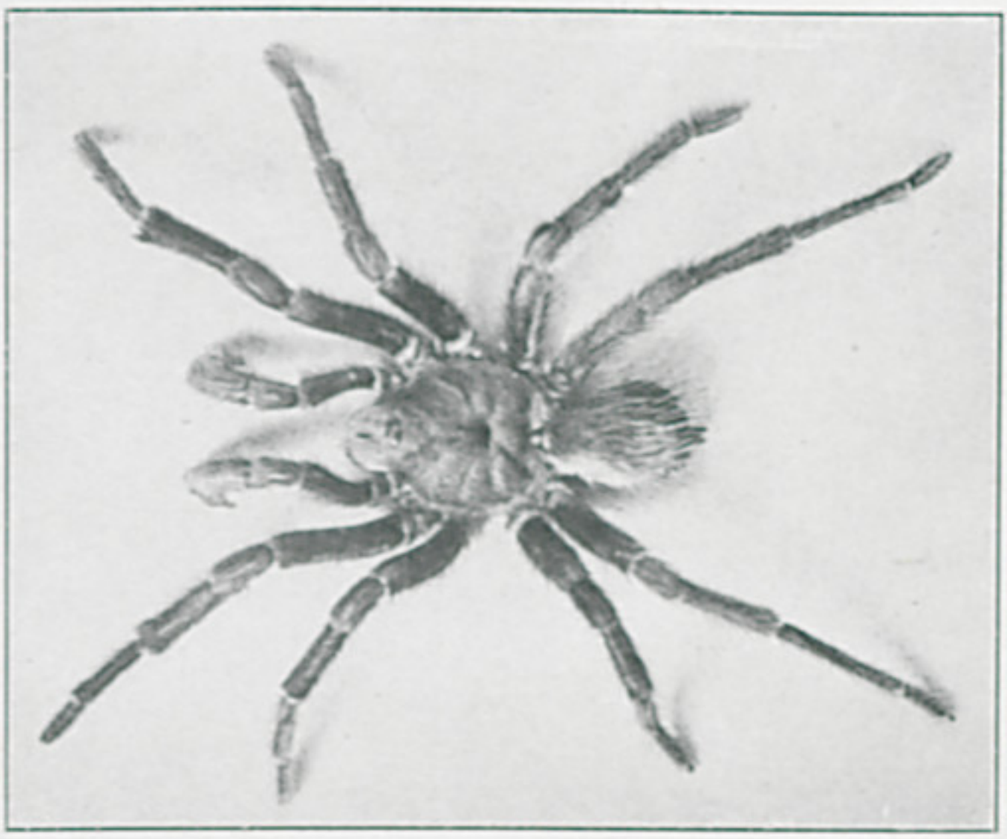
2.ª phase da fecundação
2ème phase de la fécondation



Lasiodora curtior Chamb. ♂
Tamanho natural



♀



♂

Acanthoscuria sternalis Poc.
Tamanho natural



Saccos de ovos Sacs des œufs
Tamanho natural



Palpo do ♂
Palpe du ♂
augm. 25 ×

Latrodectus geometricus C. Koch



augm. 2 ×



augm. 2 ×



augm. 25 ×

Latrodectus geometricus C. Koch ♀



augm. 25 ×

Latrodectus mactans Fab. ♀

RUD. FISCHER, del.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS GLANDULAS DAS SERPENTES AGLYPHAS

PELOS

DRS. VITAL BRAZIL E J. VELLARD.

A concepção da função venenosa dos ophidios modificou-se sensivelmente nestes ultimos tempos. Para os antigos naturalistas, só o grupo das Proteroglyphas e o das Solenoglyphas, possuindo uma glandula volumosa, dotada de cavidade central, ligada por canal a um par de dentes inoculadores, mais ou menos desenvolvidos, eram considerados venenosos.

Pouco a pouco, no espirito do homem de sciencia, esta idéa primitiva se ampliou em torno dos dois grupos, em que o apparelho de veneno attingia ao maior gráo de desenvolvimento e perfeição; reconheceu-se em outro grupo de ophidios, o das Opistoglyphas, a existencia de uma secreção toxica, espessa e glutinosa, elaborada, por glandulas de localisação anatomica e estructura histologica identica, as das serpentes venenosas, ligadas directamente a dois dentes posteriormente collocados, quasi sempre mais desenvolvidos do que os outros e algumas vezes do mesmo tamanho, sulcados na face anterior. A situação anatomica destes dentes relativamente curtos, collocados na parte posterior e a viscosidade do veneno, não permittem, em geral, as opistoglyphas, determinarem accidentes de certa importancia, funccionando ordinariamente o apparelho de veneno no momento da deglutição, como meio contensivo das victimas de que se nutrem as serpentes.

Além destes trez grupos, possuindo um apparelho inoculador, mais ou menos desenvolvido ou perfeito, outros ophidios, desprovidos de dentes differenciados, canniculados ou sulcados, guardando relação com glandulas, existem e foram considerados como privados igualmente de secreção toxica, sendo comprehendidos sob a denominação geral de *aglyphas*. Trabalhos recentes, entretanto, vieram ainda alargar a noção da funcção venenosa dos ophidios, revelando nas aglyphas, apezar da ausencia de dentes com os caracteristicos anatomicos do apparelho inoculador, a existencia de glandulas de secreção toxica e de funcção biologica, parcialmente, ao menos, analoga a das serpentes propriamente venenosas.

HISTORICO:

Pouco se tem publicado sobre as glandulas cephalicas das aglyphas. Os primeiros autores que as assignalaram, se limitaram á descrever algumas dentre ellas, quasi sempre a supra-labial, não lhes attribuindo senão um simples papel de glandulas salivares. *Leydig*, entretanto, em 1873, em uma importante memoria sobre a histologia comparada das glandulas dos ophidios, baseando-se unicamente sobre dados histologicos, conclue que não existe differença alguma fundamental entre a estructura intima das glandulas das serpentes venenosas e não venenosas. Outros autores confirmaram posteriormente estas conclusões, reconhecendo nas glandulas supra-labiaes das aglyphas, a possibilidade de elaborar uma secreção toxica. Assim, *Faust* e *Noguchi* reconhecem nas aglyphas a existencia de verdadeiras glandulas de veneno e para elles só a ausencia de dentes inoculadores distinguem, estas, das especies propriamnte venenosas.

Calmette, em razão da falta de dentes inoculadores, pensa, sem comtudo adduzir factos experimentaes, que esta secreção pode ser toxica, não possuindo, entretanto, senão um papel mais ou menos importante na digestão.

Diversos trabalhos experimentaes vieram confirmar a toxicidade da secreção das glandulas supra-labiaes de certas aglyphas. *Phisalix* e *Bertrand*, em 1894, obtiveram com o extracto aquoso das duas glandulas supra-labiaes da *Tropidonotus natrix*, a morte do cobaio, em 18 horas. *Alcock* e *Rogers*, em 1902 verificaram a existencia de secreção toxica, de acção physiologica differente, em duas aglyphas asiaticas, uma convulsivante (Zamenis mucosus) a outra paralysante (Tropidonotus piscator); *Mme. Phisalix* só, ou em collaboração com *J. F. Caius*, estudou a acção dos extractos glandulares de diversas especies de aglyphas europeas e asiaticas; Lycodon aulicus, Zamenis mucosus, Z. gemonensis e Z. hippocrepis, Coronella austriaca, Helicops schistosus, Polyodontophis collaris, Simotes arnensis, Dendrophis pictus, Oligodon subgriseus e principalmente de diversas especies de Tropidonotus, T. natrix, T. viperinus, T. piscator, T. stolatus, T. himalyanus, T. subminiatus, e T. platyceps; a acção dos venenos destas diversas especies é assaz variavel e principalmente notavel com as Lycodon, Tropidonotus e Coronella.

Finalmente algumas especies brasileiras de aglyphas foram estudadas por *Kraus;* a Drymobius bifossatus, a Herpetodryas fuscus, a Xenedon merremii, a X. guentheri, a Rhadinea merremi e a Liophis poecilogyrus.

Este ultimo autor, preparou o veneno, triturando as glandulas supra-labiaes em sôro physiologico e centrifugando o liquido, assim obtido, para separar as particulas solidas. O extracto grandular da Drymobius bifossatus, unica especie estudada em detalhe, revelou-se muito toxico, matando rapidamente o pombo e o coelho por injecção endovenosa ou intramuscular; este veneno mostrou-se resistente ao aquecimento a 80° centigrado; a glandula rostral, ao contrario da supra-labial, não manifestou toxicidade alguma. Os diversos sôros anti-ophidicos de Butantan não tiveram acção sobre este veneno. O sangue dos animaes mortos em consequencia do envenenamento pelo

extracto de glandulas supra labiaes desta especie, coagulava-se normalmente, emquanto que o dos que sucumbiam a acção do veneno de Rhadinea ou de Liophis, tornava-se incoagulavel. As propriedades antigenicas não foram estudadas por *Kraus*.

Boidae-Ilysiidae e *Uropeltidae*. — Alem das colubridae, Mme. *Physalix* pesquisou a funcção venenosa em algumas especies de Boidae, Ilysiidae e Uropeltidae. Nestas trez familias existe uma glandula, a temporal anterior, mais profunda do que a supra labial e cuja secreção mostrou-se mortal, em altas doses,—(de 2 a 4 glandulas) para pequenos passaros. Este estudo foi apenas esboçado.

Accidentes attribuidos as aglyphas:

Apesar da imperfeição do apparelho do veneno das agïyphas, tornando impossivel a inoculação rapida da secreção glandular toxica, alguns accidentes têm sido attribuidos a especies deste grupo.

Diversos autores, *Fayer*, *Ewart*, o major *Wall*, desvrevem accidentes observados nas Indias, acompanhados de phenomenos locaes ou geraes, algumas vezes graves (edema, dôr, vomitos, desfallecimentos, coma, pulso fraco e irregular), os quaes foram attribuidos a mordedura de uma pequena especie de aglypha, o Lycodon aulicus

Um caso de morte foi registado por *Willey*. *Quelche* assignala forte reacção local, como consequencia de uma mordedura de Xenodon severus e *Wall* observou depois da mordedura de Tropidonotus piscator uma syncope prolongada e alarmante.

Estas diversas observações não podem ser acceitas senão sob as maiores reservas. O major *Wall* pensa que os phenomenos nervosos observados por elle, devem ser attribuidos ao terror de individuos pusillamines e não propriamente a intoxicação. A isto devemos acrescentar que infecções secundarias podem acompanhar e aggravar taes accidentes, determinando reacção local mais ou menos intensa. Seria igualmente possivel que diversos accidentes attribuidos ao Lycodon, fossem na realidade devidos ao *Bungarus*, que muito se parece pelo seu aspecto geral com aquella especie.

As verificações experimentaes de Mme. *Physalix*, não são de molde a apoiar a possibilidade de taes accidentes, apezar da opinião desta autora, porquanto nos seus experimentos são necessarios duas glandulas de Lycodon para determinar, em cerca de 4 ou 5 horas, a morte de passarinhos de 15 grammas. Não se trata, pois, de uma toxicidade capaz de explicar os accidentes attribuidos a esta especie.

Assim, dada a ausencia do apparelho inoculador differenciado e as diversas condições necessarias para inoculação da secreção toxica, os accidentes, no homem, attribuidos ás aglyphas, são extremamente duvidosos.

PARTE EXPERIMENTAL:

Situação e estructura das glandulas cephalicas das aglyphas.

Desde os trabalhos de *Leydig*, a morphologia e a histologia das glandulas cephalicas das aglyphas, tem sido objecto de varios estudos. Nestas "Memorias", o *Dr. Dorival de Camargo Penteado*, descreveu (1) minuciosamente as de algumas de nosssas especies de aglyphas, de opistoglyphas e de Boidae.

As aglyphas possuem um certo numero de glandulas cephalicas de relação e funcções differentes. Salvo a rostral, mediana e impar, são todas as outras pares situadas symetricamente de cada lado da cabeça.

As supras labiaes, que são as mais importantes, acham-se collocadas ao longo do bordo externo do maxilar superior; muito superficiaes, basta para descobril-as, destacar cuidadosamente a pelle desta região, a qual são pouco adherentes. A olho nú, póde-se dividil-as em trez partes segundo seu aspecto: a parte posterior, de côr roxa clara, comparavel a dos musculos visinhos, se estende sob a forma de um longo cordão da articulação do maxillar a commissura labial; a parte mediana larga, esbranquiçada, de aspecto granuloso, se estende da commissura labial até o globo occular; um sulco obliquo a separa do segmento anterior, comprido, de cor rosea e de aspecto identico ao da parte posterior, estendendo-se a ponta do focinho, onde se junta a uma pequena glandula triangular, a rostral, que serve de traço de união entre as duas supra labiaes. A estructura histologica destas differentes partes corresponde, como verificou o Dr. *Dorival*, a esta divisão exterior. Os segmentos anterior e posterior são de natureza mixta, seromucosos, emquanto que a parte media é uma glandula granulosa ou zimogena. A parte anterior e posterior possuem um certo numero de tubos secrectores, emquanto que a parte média não apresenta senão um canal dirigido para os ultimos dentes maxillares. Certos autores, entre os quaes Mme. *Physalix*, consideram a parte mediana, como uma glandula differente, parotida, accolada a supra labial.

Quanto a rostral, é uma simples glandula serosa, do mesmo modo que as glandulas nasaes ou lacrimaes. As outras glandulas cephalicas são as infralabiaes, e as sublinguaes anteriores e posteriores; são todas glandulas salivares mixtas, seromucosas, sendo que as primeiras são as unicas bem desenvolvidas.

Não insistiremos na descripção de todas estas glandulas, que apresentam, segundo as especies, grandes variacões de forma e de volume, limitando-nos a indicar o trabalho do Dr. *Dorival*, onde o leitor encontrará minuciosos e interessantes detalhes sobre este assumpto.

Preparo dos extractos glandulares:

Dada a estructura da glandula, não é possivel obter-se directamente, em estado de pureza, a respectiva secreção. Para estudar-se as

propriedades desta, é, pois, preciso preparar-se extractos do seguinte modo: as glandulas retiradas com precaução, pesadas, são trituradas em um pequeno gral com areia fina esterilisada e tratadas por sôro physiologico. A solução assim preparada, de aspecto mais ou menos espesso e mucilaginoso, segundo as especies, é filtrada trez vezes em seguida em papel de filtro, sendo titulada de accordo com o peso da glandula fresca.

Os resultados obtidos com taes solutos, são assaz constantes para a mesma especie, para permittir um estudo comparado das secreções salivares dos differentes grupos de aglyphas.

Especies estudadas:

Estudamos diversas especies de Colubridae aglyphas, representando typos bem differentes deste grupo: *Drymobius bifossatus*, *Spilotes pullatus*, *Herpetodryas carinatus*, *Xenodon merremii*, e *Helicops modestus*. Completamos este estudo com o da *Dipsas bucephala*, *Amblycephalidae*, e o da *Constrictor constrictor*, *Boidae*, que como as Colubridae aglyphas são desprovidas de apparelho inoculador.

DRYMOBIUS BIFOSSATUS:

Nesta especie os dentes maxillares são numerosos, de 27 a 30, vão augmentando ligeiramente em altura no sentido antero-posterior.

As glandulas supra labiaes são bem desenvolvidas; seu peso médio calculado em trez exemplares adultos, foi cerca de 93 milligrammas por glandula. As soluções na proporção de 5 °|°, em sôro physiologico, são espessas, muito muciloginosas, de reacção neutra ao tournesol.

Toxicidade:

Os solutos de veneno de Drymobius bifossatus, preparados segundo a technica indicada, se mostraram extremamente toxicos para todos os animaes de laboratorio e para as diversas especies de batrachios. Em todos os symptomas de envenenamento são semelhantes: é um veneno essencialmente paralysante, desprovido de toda acção phlogogena local; a paralysia motora é precoce, seguida posteriormente da perda de respiração: o animal tomado de somnolencia procura a principio se manter sobre as patas, depois deita-se paretico, a dyspnéa apparece, os movimentos respiratorios se espaçam pouco a pouco, o animal em estado de asphyxia abre muitas vezes e seguidamente a bocca e morre sem convulsões; a pupila, a principio, em myosis pronunciada, dilata-se progressivamente. Não ha contracturas, nem hemorrhagias, nem tão pouco perturbações das secreções. Por injecção endovenosa, a morte pode sobrevir em alguns minutos ou em algumas horas, segundo a dose inoculada; por via subcutanea ou intramuscular, sobrevem sempre mais lentamente, sendo a dose minima mortal muito mais elevada. No pombo, a relação entre a minima mortal por via endovenosa e a minima por via intramuscular é de 1 para 5. Doses inferiores a minima mortal podem deter-

minar symptomas mais ou menos graves, com restabelecimento do animal. O pombo e o coelho são muito sensiveis a este veneno; o cobaio o é muito menos; os batrachios são de uma sensibilidade media.

Eis algumas de nossas experiencias:

Pombo n.º 97—Recebe por via venosa ás 15 horas e 17 min. 5 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico. A's 15 horas e 20 min. deita-se com as azas pendentes; ás 15 e 22 min. agita-se brandamente, sem conseguir levantar-se: abre muitas vezes o bico em estado de asphyxia; depois fica sem movimentos, com os olhos fechados; os movimentos respiratorios de mais a mais espaçados se suspendem definitivamente ás 15 h. e 27 minutos. Morte em 10 minutos.

Pombo n.º 12—Recebe, por via venosa, 2,5 milligrammas de glandula em em 2 c. c. de sôro physiologico, ás 15 h. e 18 minutos; deitado, ás 15 e 31; paralytico ás 15 e 35', morre ás 15 e 40' em 22 minutos.

Pombo n.º 86—Recebe, por via venosa ás 15 e 55', 1 milligramma de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; deitado ás 16 horas; paralytico ás 16 h. e 16'; morto ás 16 horas e 44'; morto em 49 minutos.

Pombo n.º 85—Recebe, por via venosa ás 15 h. e 35' 0,5 mg. de glandulas em 2 c. c. de sôro physiologico; deitado ás 15 h. e 45'; paralytico ás 16 horas e 20'; morto ás 16 h. e 47', morte em 72 minutos.

Pombo n.º 46—Recebe por via venosa ás 12 horas e 17', 0,25 de milligramma de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; ligeira paresia ás 15 horas; normal no dia seguinte.

Pombo n.º 6—Recebe ás 13 h. e 14 min., por via intra-muscular, 2.5 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; morto na manhã seguinte, sem reação alguma local.

Coelho n.º 40—Peso: 1.200 grs.; recebe ás 12 horas e 35' por via venosa, 5 milligrammas de glandula, em 2 c. c. de sôro physiologico; ás 12 horas e 45', forte dyspnéa; ás 13 horas completamente paralytico; pouco a pouco a pupila se dilata ao extremo e o animal depois de sobresaltos, morre ás 13 horas e 25' em 50 minutos.

Coelho n.º 55—Peso: 1.100 grs.; recebe por via venosa ás 12 horas e 26 min. 2,5 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico. Não apresentou symptomas de envenenamento.

Cobaio n.º 62—Peso: 360 grs.. recebe ás 15 horas e 30 min.. por via intramuscular, 5 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; nenhum symptoma, nem geral, nem local.

Cobaio n.º 66—Peso: 350 grs.: recebe ás 15 horas e 39 min.. por via intramuscular 10 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; nenhum symptoma.

Hyla sp. ?—(Pereréca)—Peso: 15 grs., recebe ás 15 horas e 35' na coxa 1 milligramma de glandula em 0,2 c. c. de sôro physiologico; paresia posterior ás 15 horas e 37 min.; paralytica ás 15 horas e 43'; completamente restabelecida ás 15 e 30 min.

Hyla sp. ?—(Pereréca)—Peso: 16 grs.; recebe ás 15 horas e 43', 2,5 milligramma de glandula em 0,2 c. c. de sôro physiologico: paresia posterior ás 15 horas e 46 min.; paralytica ás 15 e 48'; morte ás 15 horas e 55' em 12 minutos.

Pela necropsia dos animaes que sucumbiram á accão deste veneno, não se encontra lesão alguma visceral microscopica. O sangue coagula com certa demora.

Destas pesquisas resultam as seguintes minimas mortaes, bastante visinhas das indicadas por Kraus:

Pombo, via venosa 0,5 mg.—via intramuscular 2,5 mg.
Coelho de 1 kilo, via venosa 5 mgrs.
Cobaio de 350 grs., via intramuscular, acima de 10 mgs.
Hyla sp. (pereréca) de 15 grs.—2 mgs.

Dada a impossibilidade de isolar-se este veneno ou de obtel-o em estado de pureza, deve-se consideral-o como dotado de actividade comparavel á das peçonhas das proteroglyphas e solenoglyphas.

Acção hemolytica:

A secreção das supras labiaes de *Drymobius bifossatus*, se mostrou completamente desprovida de acção hemolytica sobre as hematias do coelho, mesmo em presença de sôro normal de cavallo e depois de uma permanencia de 24 horas na estufa a 37°.

Acção proteolytica:

O extracto glandular da *Drymobius bifossatus* é igualmente destituido de qualquer acção proteolytica sobre a gelatina, mesmo depois da permanencia na estufa a 37° por 24 horas.

Acção sobre a coagulação sanguinea:

Tambem não tem acção apreciavel sobre a coagulação sanguinea, o extracto que estudamos. Pesquisamol-a no plasma citratado do coelho, não obtendo o minimo resultado positivo, mesmo depois de 24 horas, com doses de 1 a 5 milligrammas de glandula. Não possue igualmente propriedades anticoagulantes, nem impedientes, nem accelera de modo sensivel a coagulação normal.

Resistencia do veneno ao calor e á oxydação:

O veneno da Drymobius é muito resistente ao calor, como aliás são os de quasi todas as Colubridae.

Aquecido durante 15 minutos a 80°, coagula em flocos, conservando, entretanto, suas propriedades toxicas. A temperatura de 90° attenua-o um pouco, morrendo os animaes, injectados, com certa sobrevivencia sobre as testemunhas. E' completamente destruido pela ebulição durante um quarto de hora.

Testemunha:—Pombo 46, recebe ás 13 horas e 10 min. por injecção intramuscular 5 milligrammas de substancia glandular em 2 c. c. de sôro physiologico; paralytico ás 15 horas e 15'; morto ás 17 horas.

Pombo 15—Recebe ás 13 horas e 27 min., por injecção intramuscular, 5 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico (mesma solução)—aquecidas a banho maria a 80°, durante 15 minutos; paralytico ás 15 horas e 15 minutos; morre ás 16 horas e 40 em 3 horas e 13 min.

Pombo 12—Recebe ás 14 horas e 7', nas mesmas condições 5 milligrammas de glandula, aquecida em banho maria a 90°, durante 15 minutos; paralytico ás 17 horas, morto durante a noite.

Pombo n.° 64—Recebe ás 14 h. e 34', 5 milligrammas de glandula, levada a ebulição durante 15 minutos; não apresentou symptomas de envenenamento.

O permanganato de potassio altera rapidamente a toxicidade deste veneno, como acontece com os outros venenos. Um c. c. da solução a 1 °|° de permaganato de potassio é completamente reduzido em 5 minutos por 5 milligrammas de glandula de Drymobius; 1 milligramma deste mesmo veneno não descora, senão parcialmente 1 c. c. da mesma solução de permanganato, em 12 minutos; mas esta mistura é completamente atoxica para o pombo.

Pombo n.º 81—Recebe ás 15 horas e 30 min. por via venosa, 1 milligramma de glandula de Drymobius em 1 c. c. de sôro physiologico + 1 c. c. de soluto de permanganato de potassio a 1 °|°, mantidos 12 minutos de contacto in vitro; nenhum symptoma.

Propriedades antigenicas:—A secreção das supra labiaes da Drymobius possue evidentes propriedades antigenicas, immunisando rapidamente os animaes por ella tratados. No espaço de um mez, conseguimos immunisar, contra este veneno, dois coelhos, que, não só supportaram a prova de immunidade, recebendo, sem apresentarem symptomas, por injecção endovenosa, varias minimas mortaes, como forneceram sôro neutralisando por 1 c. c. uma dose seguramente mortal deste veneno.

Nossa experiencia durou um mez, de 24 de Julho a 25 de Agosto de 1925; a prova de immunidade foi feita uma semana depois da ultima injecção de veneno. Como animaes de experiencia tomamos dois coelhos, um, o n.º 37, pesando 1.930 grs., o outro, o n.º 55, pesando sómente 830 grs. As injecções eram intramusculares, quotidianas e iguaes para os dois animaes.

Eis o protocollo desta immunisação:

24—7—	0,5	milligrammas.	7—8—	9,	milligrammas.
25—7—	1,	"	8—8—	10,	"
27—7—	1,5	"	10—8—	12,	"
28—7—	2,	"	12—8—	16,	"
30—7—	3,	"	14—8—	20,	"
31—7—	3,5	"	26—8—	15,	"
1—8—	4,	"	27—8—	20,	"
3—8—	5,	"	28—8—	25,	"
4—8—	6,	"			

De 14 a 26 de Agosto, as injecções foram suspensas por falta de veneno. Todas as injecções foram perfeitamente toleradas, sem modificação apreciavel do peso ou da temperatura.

Prova de immunidade:

A prova de immunidade foi levada a effeito de modo differente nos dois animaes. No coelho n.º 55, verificando a resistencia a uma dose de veneno maior do que a dupla da minima mortal, para um animal do mesmo peso. No coelho 37, pela determinação do poder neutralisante do sôro.

Coelho n.º 55—Peso 840 grs., (5-9-25). Recebe ás 15 horas e 8', por injecção endovenosa, 10 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; dyspnéa accentuada, durante 1/4 de hora, symptoma este que desappareceu completamente ao cabo desse tempo.

Testemunha:—Coelho n.º 42, peso 1.100 grs.; recebe 5 mgrs. de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico, por via venosa, ás 14 horas e 40'; paralytico ás 15 horas e 5', morto ás 16 h. e 15', em 1 h. e 35'.

Coelho n.º 37—(Poder anti-toxico do sôro): O sangue foi obtido por puncção do coração a 5-9-25. O sôro separado por centrifugação.

1.ª *Testemunha*:—Pombo n.º 20—Recebe ½ milligramma de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico por via venosa ás 12 h. e 35'; paralytico ás 15 horas; morto durante a noite.

2.ª *Testemunha*—(Pombo n.º 17)—Recebe 1 milligramma de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico, por via venosa ás 13 h. e 15', morte em 40 minutos.

Pombo n.º 19—Recebe, por via venosa, ás 16 h. e 10 min., 0,5 milligrammas de glandula + 1 c. c. do sôro do coelho n.º 37, depois de 1 hora de contacto, in vitro. Não apresentou symptoma algum de envenenamento.

Pombo n.º 44—Recebe ás 15 horas e 6', por via venosa, 1 c. c. de sôro do coelho 37 + 1 milligramma de glandula, depois de 1 hora de contacto in vitro; paralytico ás 16 horas e 30'. Morto durante a noite.

O primeiro animal immunisado (n.º 55) supportou, pois, sem accidente, dose dupla da mortal em hora e meia, para um coelho sensivelmente mais pesado. O sôro do segundo (n.º 37) neutralisava em 1 c. c. completamente, uma minima mortal para o pombo, retardando sensivelmente a morte deste, com uma dose dupla, capaz de matar a testemunha em 40 minutos.

Acção dos sôros anti-crotalico e anti-bothropico sobre o veneno da Drymobius bifossatus:

A acção dos sôros anti-bothropico e anti-crotalico sobre o veneno da Drymobius é apenas assignalavel.

Kraus não conseguio neutralisar diversos venenos de aglyphas brasileiras com os sôros anti-peçonhentos preparados em Butantan.

Experimentando estes mesmos sôros em relação ao veneno da Drymobius, observamos que depois de contacto in vitro, de uma hora, os sôros anti-bothropico e anti-crotalico, retardam a morte, quando são empregados com uma minima mortal de veneno; com doses superiores, são, ao contrario, negativos, pois os animaes que recebem a mistura de sôro veneno, morrem mais rapidamente do que os animaes testemunhas.

Protocollos:

Com uma minima mortal:

Testemunha:—*Pombo* n.º 58—Recebe 0,5 milligrammas de glandula de Drymobius, na veia. Morte em 1 h. e 12 minutos.

Pombo n.º 38—Recebe na veia 0,5 mgr. de glandula de Drymobius + 1 c. c. de sôro anti-bothropico, depois de 1 h. de contacto; paralytico 3 horas; morto em 4 ½ horas.

Pombo n.º 85—Recebe na veia, 0,5 mgr. de glandula de Drymobius + 1 c. c. de sôro anti-crotalico, depois de 1 hora de contacto; forte paresia 4 horas depois da injecção; paralytico 12 horas depois e quasi restabelecido ao fim de 48 horas.

Com duas minimas mortaes:

Testemunha:—*Pombo* n.º 86—Recebe por injecção endovenosa 1 mgr. de glandula de Drymobius. Morte em 49 minutos.

Pombo n.º 51—Recebe 1 mgr. de glandula de Drymobius + 1 c. c. de sôro anti-bothropico, depois de contacto de 1 hora. Morte em 31 minutos.

Pombo n.º 73—Recebe na veia 1 mgr. de glandula de Drymobius + 1 c. c. de sôro anti-crotalico. Morte em 21 minutos.

Immunidade natural da Drymobius bifossatus a acção do seu proprio veneno:

Para completar o estudo das propriedades antigenicas da secreção supra labial desta especie, pesquisamos no sôro da Drymobius, a existencia de anti-corpos naturaes em relação ao seu proprio veneno. Determinamos preliminarmente a tolerancia do pombo a injecção endovenosa do sôro desta especie, verificando que na dose de ½ c. c., é bem tolerado e que na de 1 c. c. determina perturbações passageiras.

Pombo n.º 92—Recebe 1 c. c. de sôro de Drymobius + 1 c. c. de sôro physiologico na veia. Paralysia e dyspnéa rapida, durante alguns minutos.

Pombo n.º 18—Recebe ½ c. c. de sôro de Drymobius + 1,5 c. c. de sôro physiologico, na veia. Não apresentou symptoma algum de envenenamento.

Esta toxicidade natural do sôro das serpentes e de outros vertebrados inferiores, bem como o de diversos invertebrados, aranhas, escorpiões, etc., tem sido assignalado por diversos autores, alguns dos quaes tem procurado explical-a pela presença de veneno no sangue (*Physalix*) ou pela existencia, neste meio, dos elementos que servem para sua elaboração (*Calmette*).

Estes dois modos de interpretar, porém, não se ajustam com o facto bem verificado do poder anti-toxico do sôro em relação ao veneno do proprio animal. Num, como n'outro caso, as condições de envenenamento seriam agravadas e não attenuadas, como acontece.

Ha mais logica e mais accordo com os factos experimentaes e de observação, admittir-se que todo o sôro de especie differente é mais ou menos toxico, sendo a toxicidade tanto maior quanto mais afastadas na escala zoologica, as especies consideradas. Uma vez determinada a tolerancia do pombo ao sôro da Drymobius, tratamos de pesquizar o poder anti-toxico deste em relação ao proprio veneno.

Pombo n.º 58—Recebe na veia 1,5 mgr. de glandula de Drymobius + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius, em contacto, durante uma hora. Morto em 37'.

Pombo n.º 83—Recebe nas mesmas condições, 1 mgr. de Glandula de Drymobius + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius; morto em uma hora.

Pombo n.º 61—Recebe nas mesmas condições 0,5 milligramma de glandula de Drymobius + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius; ligeira dispnéa transitoria. Normal no dia seguinte.

Meio centimetro cubico de sôro de Drymobius, neutralisa, pois, uma minima mortal do proprio veneno. Com doses mais elevadas, observa-se apenas retardamento dos symptomas e da morte.

Resistencia da Drymobius bifossatus aos venenos da Crotalus terrificus e da Lachesis lanceolatus:

Depois de havermos estabelecido a resistencia natural da Drymobius ao seu proprio veneno, pesquisamos seu gráo de immunidade em relação aos dois typos principaes de veneno de nossas serpentes.

Como é sabido, de um modo geral, as serpentes quasi refractarias a acção do seu proprio veneno, são muito resistentes ao veneno de outras especies. A essa regra, ha uma excepção para o veneno das serpentes ophiophagas (Elaps), que matam pela acção da propria peçonha, á qual são naturalmente muito sensiveis todas as outras serpentes. Era, entretanto, interessante examinar, sob este aspecto, o sôro da Drymobius, verificando em que proporção este neutralisava os dois typos de peçonha, como meio indicador da resistencia da especie a esses venenos.

Veneno da Crotalus terrificus:

Pombo n.º 56—Recebe por via venosa, 0,001 de mgr. de veneno de C. terrificus + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius depois de 1 hora de contacto. Paralytico 3 horas depois da injecção e morto no dia seguinte ás 9 horas.

Testemunha:

Pombo n.º 49—Recebe 0,001 mgr. de veneno de Crotalus terrificus (mesma solução) na veia; paralytico em 2 horas, morto em 2 horas e 1/4.

Meio centimetro cubico de sôro de Drymobius, não neutralisa, pois, uma minima mortal de veneno de Crotalus terrificus, determinando apenas grande sobrevivencia.

Veneno da Lachesis lanceolatus:

Com o veneno bothropico (Lachesis lanceolatus) observamos um facto, em apparencia paradoxal, que nos levou, posteriormente, para explical-o, a uma serie de pesquizas sobre a acção coagulante e anti-coagulante dos venenos e dos sôros. Verificamos, com effeito que 0,5 c. c. de sôro de Drymobius bifossatus, neutralisando apenas uma minima mortal do seu proprio veneno e incompletamente uma minima de veneno de Crotalus terrificus, era capaz de neutralisar 0,2 de milligramma do veneno de Lachesis lanceolatus, isto é, pelo menos 10 minimas mortaes.

Pombo n.º 85—Recebe, por via venosa 0,02 mgr. de veneno de Lachesis lanceolatus + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius, depois de 1 hora de contacto. Nenhum symptoma de envenamento.

Pombo n.º 83—Recebe nas mesmas condições 0,1 mgr. de veneno de L. lanceolatus + 0,5 c. c. do sôro de Drymobius. Nenhum symptoma de envenenamento.

Pombo n.º 38—Recebe nas mesmas condições 0,2 de milligramma de veneno de Lachesis lanceolatus + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius. Nenhum symptoma de envenenamento.

Pombo n.º 88—Recebe nas mesmas condições 0,5 de mgr. de veneno de Lachesis lanceolatus + 0,5 c. c. de sôro de Drymobius. Morte em 11 minutos.

Testemunha:

Pombo n.º 21—Recebe 0,03 de veneno de Lachesis lanceolatus, na veia. Morte em 17 minutos.

A injecção separada de veneno e sôro, o primeiro por via intramuscular e o segundo por via venosa, nos fornece resultados comparaveis:

Testemunha:—*Pombo* n.º 76—Recebe nos musculos reitoraes 1 milligramma de veneno de Lachesis lanceolatus, dose correspondente a duas minimas mortaes, por via intramuscular; dyspnéa e paresia 1 hora depois da injecção: morte durante a noite.

Pombo n.º 74—Recebe por via intramuscular, 1 milligramma de veneno de Lachesis lanceolatus e contemporaneamente, por via venosa, 0,5 c. c. de sôro de Drymobius; dyspnéa e paresia duas horas depois; edema local na manhã seguinte. Restabelecimento em 48 horas.

Pombo n.º 45—Recebe 0,5 c. c. de sôro de Drymobius na veia e contemporaneamente, por via intramuscular 1,25 mgr. de veneno de Lachesis lanceolatus; forte dyspnéa, depois da injecção; na manhã seguinte enorme edema local, desapparecendo em 4 dias.

Para explicar a singularidade destes resultados, estudamos, em detalhe, as diversas propriedades do sôro da Drymobius, procurando, além disto, acompanhar *in vitro*, o mechanismo desta neutralisação elevada do veneno de Lachesis lanceolatus, por sôro de especie zoologicamente tão affastada.

Acção hemolytica do sôro da Drymobius bifossatus:

O sôro desta especie hemolysa rapidamente os globulos vermelhos de coelho, em presença ou na ausencia de sôro inactivado de cavallo:

Sorô de Drymobius	Sôro inactivado de cavallo	Sôro physiologico			
c. c.	c. c.	c. c.	30'	60'	90'
0,05	0 2	0,75	—	—	—
c. c.	c. c.	c. c.			
0,10	0,2	0,70	—	—	+
c. c.	c. c.	c. c.			
0,20	0,2	0,60	+++	++++	++++
c. c.	c. c.	c. c.			
0,50	0,2	0,30	++	++	++++
c. c.	——	c. c.			
0,20	——	0 80	++	+++	++++

Um centimetro cubico de suspensão de globulos a 5 º/º — Estufa a 37º.

Acção anti-coagulante do sôro da Drymobius bifossatus:

A propriedade mais interessante, porém, do sôro desta especie, é a acção anti-coagulante evidenciada não só no phenomeno da coagulação normal de sôro sobre plasma, como no da coagulação do plasma pelos venenos. Foi justamente esta propriedade se exercendo nesta ultima condição que nos veio fornecer a explicação para o facto

em apparencia paradoxal, do sôro da Drymobius neutralisar uma dose de veneno de Lachesis lanceolatus, dez vezes superior a que neutralisava do veneno homologo.

De facto, o veneno da Lachesis lanceolatus é extremamente coagulante, matando rapidamente por thrombose generalisada, quando injectado na veia; de sorte que o sôro da Drymobius neutralisa dose tão elevada daquelle veneno, não por uma acção anti-toxica especifica e sim graças á sua propriedade anti-coagulante, por uma sorte de effeito antagonico ao do veneno em questão.

Em outro trabalho sobre a coagulação e a proteolyse, daremos os detalhes destas experiencias, cujos principaes resultados já foram publicados sob a forma de notas prévias. Das numerosas pesquizas realisadas, podemos estabelecer os seguintes factos: 1.º, a addição in vitro de sôro de Drymobius a uma mistura de plasma citratado ou fluoretado e veneno de Lachesis lanceolatus, retarda a coagulação deste plasma ou a impede mesmo completamente, conforme a dose empregada. 2.º, esta acção não é especifica, como a que se verifica, pela addição dos sôros especificos anti-bothropico ou anti-ophidico; porquanto a coagulação normal do plasma por sôros normaes coagulantes é retardada ou impedida, nas mesmas proporções pelo sôro da Drymobius.

Documentando estes factos, daremos um dos protocollos de nossas primeiras experiencias sobre este assumpto.

Veneno de L. lanceolatus	Sôro de Drymobius	Sôro physiologico	Sôro de cavallo	Plasma fluoretado de coelho a 3 %	Tempo de coagulação
0,1 milligr.	0	1 c. c.	—	1 c. c.	2'
0,0005 »	0	1 c. c.	—	1 c. c	31'
1 »	1 c. c.	—	—	1 c. c.	4' 30"
0,2 »	1 c. c.	—	—	1 c. c.	5' 30"
0,02 »	1 c c.	—	—	1 c. c.	8'
0,01 »	1 c. c.	—	—	1 c. c.	Não coagula em 2 horas
——	1 c. c.	1 c. c.	—	1 c. c.	Não coagula em 2 horas
——	1 c. c.	—	1 c. c.	1 c. c.	Não coágulá em 2 horás
——	——	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	Coagula 30'

Glandula rostral da Drymobius bifossatus:

Entre as outras glandulas cephalicas da Drymobius, estudamos apenas a rostral, que, como vimos, tem a forma triangular e está situada na extremidade anterior do focinho, muito adherente a pelle, servindo de traço de união entre as supra-labiaes de cada lado. Seu peso médio é de 15 milligrammas. Segundo o Dr. *Dorival*, é uma glandula serosa, sem nenhum elemento mucoso.

O extracto glandular preparado, segundo a technica indicada para a supralabial, revelou-se completamente destituido de acção toxica, não determinando phenomeno algum de envenenamento, mesmo por injecção endovenosa no pombo.

SPILOTES PULLATUS:

Na *Spilotes pullatus*, todos os dentes maxillares, em numero de 20, são sub iguaes. As glandulas supralabiaes são muito pequenas e adherentes a pelle. O peso medio de cada supra labial nos exemplares adultos é cerca de 12 milligrammas. O extracto glandular, preparado segundo a technica descripta, revelou-se completamente atoxico; o aspecto destas soluções era perfeitamente limpido e sua reacção neutra ao tournesol.

Eis alguns de nossos protocollos:

Pombo n.º 38—Recebe por via venosa, 3 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico. Não apresentou symptoma algum de envenenamento.

Pombo n.º 27—Recebe, por via venosa, 8 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico. Não apresentou symptomas.

Leptodactylus pentadactylus (rã), de 60 grs., recebe por injecção intramuscular, 3 milligrammas de glandula. Não apresentou symptomas.

HERPETODRYAS CARINATUS:

Nesta especie dendricola, os dentes em numero de 30, augmentam regularmente de altura no sentido antero posterior. As glandulas supralabiaes bem desenvolvidas, em relação ás dimensões da cabeça do animal, muito adherentes a pelle, pesam em media 12,5 mgr., nos exemplares adultos.

Sem possuir acção tão intensa como a da Drymobius, a secreção das supra labiaes desta especie é bastante activa. Os batrachios são muito sensiveis; os mammiferos e os passaros succumbem igualmente a doses pouco elevadas de extracto glandular.

Os symptomas de envenenamento são uniformes nestas differentes especies: paresia, seguida de paralysia, no começo, posterior, acompanhada de forte dyspnéa; a morte sobrevem sem convulsões; o pombo experimenta a principio difficuldade de manter sobre as patas; depois, deita-se, com as patas alongadas, paralyticas, conservando, entretanto, a faculdade de voar; pouco a pouco a dyspnéa se accentua, as azas pendem semi-abertas, a cabeça pende, com o bico aberto e os olhos fechados; o animal completamente paralytico, morre depois de permanecer por tempo variavel neste estado. O coelho e o cobaio apresentam, a principio, grande asthenia, depois ficam immoveis em um canto da gaiola, não reagindo mais ás excitações; a paralysia, a principio, posterior, se generalisa, a cabeça pende entre as patas anteriores afastadas, a dyspnéa apparece e o animal morre. Os batrachios a principio fortemente excitados, dão saltos desordenados e logo irregulares, depois apresentam paralysia das patas posteriores, seguida de paralysia geral e morte.

A injecção sub-cutanea ou intramuscular determina edema local, algumas vezes consideravel, não terminando, geralmente, por necrose. Não se observam perturbaçoes secretorias; mas frequentemente regista-se vomitos no pombo.

Eis alguns protocollos de experiencias:

Pombo n.º 17—Recebe por injecção endovenosa, 4 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; dois minutos depois, paralysia das pa-

tas; cinco minutos após, dyspnéa; 17 minutos depois completamente paralytico, morrendo sem convulsões em 42 minutos.

Pombo n.º 54—Recebe, na veia, 2 milligrammas de substancia glandular em 2 c. c. de sôro physiologico; paretico em 8 minutos; normal no dia seguinte.

Coelho n.º 89—Recebe por injecção endovenosa, 10 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; paretico em 8 minutos; paralytico em 13; morto em 23 minutos.

Coelho n.º 80—Recebe por via venosa 7,5 mgrs. de glandula, em 2 c. c. de sôro physiologico; paresia posterior, paralytico e morto em 31 minutos.

Coelho n.º 79—Recebe por injecção endovenosa, 5 milligrammas de substancia glandular em 2 c. c. de sôro physiologico. Nenhum symptoma.

Cobaio n.º 38—Recebe, por injecção subcutanea, 10 mgrs. de substancia glandular em 2. c. c. de sôro physiologico; paretico em 1 hora; dyspnéa intensa, edema local; morte durante a noite, com um grande edema local ulcerado.

Cobaio n.º 1—Recebe, por injecção subcutanea, 6 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico; pequeno edema local ½ hora depois da injecção. Restabelecido na manhã seguinte, sem haver apresentado outro qualquer symptoma.

Hyla sp. ? (pereréca), de 15 grs., recebe 1 milligramma de substancia glandular em 0,4 c. c. de sôro physiologico, por injecção subcutanea; paralytico em 2 minutos; morte em 6 minutos.

Bufo crucifer (sapo): de 25 grs., recebe 3 milligrammas de substancia glandular em 0,7 c. c. de sôro physiologico, por injecção subcutanea; paralysia posterior em 30 minutos; completamente paralytico em 1 hora. Morto em 4 horas.

Alguns ophidios são igualmente sensiveis a acção deste veneno:

Lachesis lanceolatus: de 30 c. m.; recebe por injecção submucosa, 2 milligrammas de glandula em 0,5 c. c. de sôro physiologico; ligeira paresia dentro de 1 hora. Morto durante a noite.

XENODON MERREMII:

Na Xenedon merremii, a disposição dos dentes se affasta das que temos estudado até aqui, se approximando mais da que é observada nas Opistoglyphas; mas nenhum destes dentes apresenta sulco isolado ou em communicação com as glandulas. Os dentes maxilares são reduzidos a 6 ou 7 anteriores, pequenos, augmentando regularmente em altura no sentido antero-posterior, separados por um intervallo de dois outros muito mais longos, collocados posteriormente. As glandulas supralabiaes, muito desenvolvidas são pouco adherentes á pelle; o peso médio de cada uma dellas, nos exemplares adultos, é de 106 milligrammas.

A glandula rostral é, ao contrario, muito reduzida.

A solução obtida por filtração do extracto glandular das supralabiaes desta especie, é limpida, pouco mucillaginosa e de reacção neutra ao tournesol.

Toxicidade:

A secreção supra-labial desta especie revelou-se quasi totalmente desprovida de actividade para os pequenos animaes de laboratorio. Apenas os batrachios mostraram-se um pouco sensiveis.

Eis alguns de nossos protocollos:

Pombo n.º 61—Recebe, por via venosa, 50 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico. Não apresentou symptoma de envenenamento, a não ser ligeira dyspnéa logo após a injecção.

Pombo n.º 33—Recebe 100 milligrammas de glandula, por via venosa, em 2 c. c. de sôro physiologico; paresia ligeira e transitoria, sem outro symptoma.

Coelho n.º 29—Recebe, por via venosa, 50 mgrs. de glandula, em 2 c. c. de sôro physiologico. Ligeira dyspnéa e paresia passageira.

Hyla sp. ? (pereréca), peso 16 grs.; recebe 5 milligrammas de glandula em 0,25 c. c. de sôro physiologico, por injecção subcutanea; paresia posterior em 4 minutos; completamente paralytica em 8 minutos; morta em 34'.

Hyla sp. ? (pereréca), peso 14 grs.; recebe 10 milligrammas de glandula em 0,25 c. c. de sôro physiologico, por injecção subcutanea; morte em 7 minutos.

Hyla sp. ? (pereréca); peso 18 grs., recebe 1 mgr. de glandula em 0,25 de sôro physiologico, por injecção subcutanea; paralysia posterior em ½ hora; morta durante a noite.

Hemolyse: O extracto das glandulas supralabiaes da Xenodon merremii, é completamente desprovido de acção hemolytica sobre globulos de coelho.

Acção coagulante e proteolytica: — Não possue este extracto acção coagulante sobre o plasma citratado, nem acção proteolytica sobre a gelatina.

Sôro da Xenodon merremii:

As propriedades do sôro desta especie são semelhantes as do sôro da *Drymobius bifossatus*. E' fortemente hemolytico e anti-coagulante; é toxico em proporção elevada, sendo bem tolerado pelo pombo, na veia, na dose de 0,5 c. c.

Depois de contacto, in vitro, durante uma hora, 0,5 c. c. deste sôro, neutralisa uma minima mortal de veneno crotalico (Crotalus terrificus) para o pombo e cerca de 6 a 7 minimas mortaes de veneno de Lachesis lanceolatus. Esta neutralisação elevada do veneno de *Lachesis lanceolatus*, pelo sôro desta especie, tem a mesma explicação da qual foi dada a proposito do sôro da Drymobius, pela acção anti-coagulante energica deste sôro.

Eis alguns de nossos protocollos:

Acção do sôro da Xenodon merremii, sobre o veneno Crotalico (C. terrificus):

Pombo n.º 66—Recebe, por via venosa, 0,001 mg. V. C. + 0,5 c. c. de sôro, depois de contacto in vitro, durante uma hora. Não apresentou symptomas.

Pombo n.º 96—Recebe, por via venosa, nas mesmas condições, 0,002 mg. de V. C. + 0,5 c. c. de sôro; paralyico 4 horas depois, morto durante a noite.

1.ª *Testemunha*: (*Pombo* n.º 182)—Recebe, na veia, 0,001 mg. de V. C.; paretico em 5 horas, morto durante a noite.

2.ª *Testemunha*: (*Pombo* n.º 88)—Recebe, 0,002 mgrs. de V. C., na veia; morto em 1 hora e 30 minutos.

Acção do sôro da Xenodon merremii, sobre o veneno da Lachesis lanceolatus (veneno bothropico) v. b.

Pombo n.º 58—Recebe na veia 0,5 c. c. de sôro + 0,1 mg. de v. b. depois de uma hora de contacto in vitro. Nenhum symptoma.

Pombo n.º 77—Recebe, nas mesmas condições, 0,5 c. c. de sôro de Xenodon merremii + 0,15 mg. de v. b.; paralytico em 20 minutos. Restabelecido na manhã seguinte.

Pombo n.º 74—Recebe, nas mesmas condições, 0,5 c. c. de sorô de Xenodon merremii + 0,2 mg. de v. b. Morto em 30 minutos.

Testemunha: (*Pombo* n.º 21)—Recebe, 0,03 mg. de v. b. na veia; morto em 17 minutos.

ACÇÃO HEMOLYTICA DO SORO DA XENODON MERREMII:

Tubos	Suspensão de globulos a 5%	Sôro de cavallo (inactivado)	Sôro de Xenodon	Sôro physiologico	Leitura de hemolyse	
—	—	—	—	—	30'	60'
1	1 c. c.	—	0,2 cc	0,8 cc	++	++++
2	1 c. c.	0,2 cc	0,1 cc	0,7 cc	+	++
3	1 c. c.	0,2 cc	0,2 cc	0,6 cc	++	++++

ACÇÃO COAGULANTE DO SORO DE XENODON MERREMII SOBRE O PLASMA DE COELHO :

Tubos	Plasma de coelho citratado a 1%	Sôro de Xenodon	Sôro physiologico	LEITURA
1	1 c. c.	0,2 cc	0,8 cc	Não coagula em 24 horas.
2	1 c. c.	0,1 cc	0,9 cc	Não coagula em 24 horas.

ACÇÃO IMPEDIENTE DO SORO DA XENODON MERREMII SOBRE A COAGULAÇÃO NORMAL :

Tubos	Plasma de cavallo fluoretado a 3%	Sôro de Xenodon	Sôro de cavallo	Sôro physiologico	Leitura em 1 h.
1	1 c. c.	——	1 c. c.	1 c. c.	Coagulação completa.
2	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	——	Coagulação incompleta.
3	1 c. c.	0,75 cc	1 c. c.	0,25 cc	Coagulação completa.
4	1 c. c.	0,50 cc	1 c. c.	0,50 cc	Coagulação completa.

ACÇÃO IMPEDIENTE DO SORO DA XENODON MERREMII SOBRE A COAGULAÇÃO ESPECIFICA DO VENENO DA LACHESIS LANCEOLATUS.

Tubos	Plasma de coelho citratado a 1%.	Sôro de Xenodon merremii	Veneno de Lachesis lanceolatus	Sôro physiologico	LEITURA
1	1 c. c.	——	0,001 mg.	1 c. c.	Coagula em 20 minutos.
2	1 c. c.	0,10 cc	0,001 »	0,9 cc	Não coagula em 4 horas.
3	1 c. c.	0,05 cc	0,001 »	0,95 cc	Não coagula em 4 horas.
4	1 c. c.	0,02 cc	0,001 »	0,98 cc	Coagula em 46 minutos.
5	1 c. c.	0,01 cc	0,001 »	0,99	Coagula em 28 minutos.

HELICOPS MODESTUS:

Esta especie é ordinariamente encontrada nos rios; possue dentes em numero de 20, dos quaes os posteriores são mais compridos. As glandulas supra-labiaes são muito reduzidas. Dados os habitos aquaticos da Helicops, ensaiamos a acção da secreção das supra-labiaes sobre diversos batrachios, não podendo estender nossas pesquizas a maior numero de animaes, em virtude da insufficiencia de exemplares desta especie.

O extracto das glandulas supra-labiaes revelou-se toxico para differentes especies de rans e de pererécas, que succumbem rapidamente; os Bufos são ao contrario pouco sensiveis.

Eis algumas de nossas experiencias:

Paludicola signifera: (Rã)—Peso 8 grs., recebe extracto de ½ grandula em 0,5 c. c. de sôro physiologico. Alguns saltos desordenados; paralytica em 2 minutos; morta em 4 minutos.

Hyla sp. (pereréca): peso 15 grs., recebe extracto de ½ glandula em 0,5 c. c. de sôro physiologico; forte agitação durante 3 minutos; paresia, seguida de paralysia posterior em 6 minutos; a excitação do animal determina na metade posterior do corpo violentos accessos tetaniformes; a paralysia se completa e a morte sobrevem em 17 minutos.

Bufo crucifer: (sapo), peso 27 grs., recebe o extracto de ½ glandula em 0,5 c. c. de sôro physiologico; ligeiro symptoma de paresia posterior desapparecendo em algumas horas.

As especies de que nos temos occupado até aqui pertencem todas á familia Colubridae. Passamos agora ao estudo das glandulas de duas especies igualmente desprovidas de apparelho inoculador de veneno, as quaes, em uma accepção mais ampla, poderiam ser encaradas como aglyphas. São ellas: a *Dipsas bucephala*, da familia Amblycephaliade e a *Constrictor constrictor* da familia Boidae.

FAMILIA AMBLYCEPHALIDAE:

DIPSAS BUCEPHALA:

A *Dipsas bucephala* possue de 13 a 14 dentes maxillares, quasi iguaes entre si; as glandulas supra labiaes são grandes, principalmente em relação a cabeça do animal. Exteriormente tem um aspecto differente dos da Colubridae, parecem multilobuladas. Cada supra-labial em exemplares adultos pesa de 40 a 50 milligrammas.

O extracto glandular das supra-labiaes é pouco toxico, matando lentamente o pombo com doses elevadas; possue ao contrario, acção necrosante local intensa, podendo determinar o esphacelo de um membro inteiro.

Pombo n.º 6—Recebe, 5 mgrs. de extracto glandular em 2 c. c. de sôro physiologico, por via venosa. Nenhum symptoma.

Pombo n.º 9—Recebe, por via venosa, 25 mgrs. de extracto glandular em 2 c. c. de sôro physiologico; nenhum symptoma durante uma hora. Morte á noite.

Pombo n.º 102—Recebe, por injecção intramuscular, 10 mgrs. de extracto glandular, sobre a região peitoral; nenhum symptoma geral; na manhã seguinte, forte edema local; 48 horas depois da injecção, todos os musculos peitoraes estão esphacelados; do lado da injecção a aza está quasi destacada; o animal foi sacrificado no 3.º dia.

Sobre os animaes de sangue frio, a acção geral é muito pouco accentuada, a acção necrosante, porém, é igualmente muito energica.

Hyla sp. ? (pereréca); recebe por injecção hypodermica 5 milligrammas de extracto glandular; nenhum symptoma geral; na manhã seguinte esphacelo da pata em que fizemos a injecção.

FAMILIA BOIDAE:

CONSTRICTOR CONSTRICTOR:

A Constrictor constrictor possue fortes e numerosos dentes, particularmente desenvolvidos. As glandulas supra labiaes, são muito menos differenciadas do que nas outras familias de ophidios de organisação mais elevada. Apresentam-se sob a forma de um cordão alongado, de aspecto granuloso, envolvida de uma bainha fibrosa espessa e resistente, se estendendo, como nas Colubridae aglyphas, da commissura labial a ponta do focinho, onde entra em contacto com a rostral; mas, contrariamente, a estas ultimas especies, sua largura e aspecto são uniformes em toda a extensão, não indicando, mesmo exteriormente, divisões ou separações de tecidos differentes. O estudo histologico, feito pelo Dr. *Dorival*, não permittiu distinguir as 3 divisões da supralabiaes indicadas para as Colubridae aglyphas; em toda a estensão tem a estructura de uma glandula mixta ou seromucosa.

Estas glandulas são relativamente pouco desenvolvidas, tendo em vista o volume da cabeça dos individuos desta especie. O peso médio de uma supra-labial é de 50 milligrammas. O extracto glandular é pouco toxico.

Eis alguns protocollos que documentam este facto:

Pombo n.º 46—Recebe, por via venosa, 35 milligrammas de glandula em 2 c. c. de sôro physiologico. Nenhum symptoma, immediato ou tardio.

Pombo n.º 119—Recebe, nas mesmas condições, 45 milligrammas de glandula. Nenhum symptoma.

Cobaio n.º 636—Peso 230 grs., recebe, por injecção intramuscular, na coxa, 15 milligrammas de glandula; nenhum symptoma, nem local nem geral.

Camondongo branco—Peso 26 grs., recebe por injecção intramuscular, na coxa, 15 mgr. de extracto glandular em 1 c. c. de sôro physiologico; dôr immediata; gritos, contracturas, caimbras locaes, desapparecendo em 10 minutos, sem nenhum outro symptoma, quer local quer geral.

Leptodactylus pentadactylus; (rã), peso 30 grs., recebe 30 milligrammas de glandula, por injecção hypodermica, em 1 c. c. de sôro physiologico. Nenhum symptoma, nem local nem geral.

CONSIDERAÇÕES FINAES:

O estudo que fizemos da secreção das glandulas supra-labiaes nos principaes grupos de ophidios desprovidos de apparelho inoculador de veneno, mostra uma adaptação progressiva das simples glandulas salivares, a uma funcção especialisada, a funcção venenosa. Esta adaptação se caracterisa anatomicamente, por profundas modificações macroscopicas e microscopicas da glandula salivar primitiva supra-labial.

Nas Boidae, as supras labiaes são simples glandulas salivares, de estructura e funcção semelhante as outras glandulas salivares.

Nas colubridae, é facil acompanhar a apparição e o desenvolvimento progressivo da funcção venenosa, que attinge seu mais alto gráo nas Viperidae. As *Colubridae aglyphas*, si bem que desprovidas de apparelho inoculador, possuem, com effeito, uma glandula supra-labial, podendo elaborar uma secreção mais ou menos toxica, por vezes muito activa, representando então o papel semelhante ao das glandulas homologas das especies propriamente venenosas.

E' natural supor-se, com effeito, que as Colubridae aglyphas, no momento da deglutição, inoculem, por meio dos ferimentos multiplos, occasionados por seus dentes lisos e cortantes, o producto de suas glandulas salivares e consequentemente o das supra-labiaes, que, como vimos, é toxico para as especies animaes de que se alimentam ordinariamente.

De sorte que uma das funcções desta secreção é a de matar a victima de que faz repasto a serpente, tal qual como o que se observa com outras especies de apparelho mais aperfeiçoado.

As Opistoglyphas representam um degráo superior, porque dispõem de apparelho bem mais aperfeiçoado: de dois ou mais dentes sulcados, mais desenvolvidos, collocados na parte posterior, guardando estreitas relações anatomicas com as glandulas supra-labiaes.

As funcções biologicas deste apparelho são, sem duvida alguma, as de matarem as victimas no momento de deglutil-as.

As Proteroglyphas dispondo de dois dentes sulcados, collocados na parte anterior, tendo igualmente intima connexão com a glandula de veneno, dispõem já de um apparelho bastante aperfeiçoado para matar a victima, mesmo antes de emprehenderem a deglutição.

As Solenoglyphas, finalmente, dispõem de um apparelho aperfeiçoadissimo, destinado á captura das suas victimas, constituido pelas glandulas supra-labiaes muito desenvolvidas, com canal excretor, que vem ter de cada lado á base do dente inoculador; este é muito longo, curvo e dotado de movimento; em repouso, se acha em posição horizontal em relação ao soalho da bocca; em actividade, colloca-se em posição vertical, para ferir; os dentes inoculadores têm na base uma chanfradura, onde vem se oscular o canal excretor, em ordem a estabelecer a communicação entre a glandula de veneno e o apparelho inoculador; são dotados de um canal perfeito que se abre por uma fenda collocada um pouco acima da ponta.

As serpentes deste grupo, a que pertencem as mais perigosas es-

pecies, matam constantemente, por meio do veneno, as suas victimas antes de deglutil-as.

Assim, pois, no sentido amplo do termo, mesmo as Colubridae aglyphas, completamente inoffensivas para o homem, devem ser consideradas venenosas, porque dispõem de uma glandula de veneno e que, em condições especiaes, funcciona como tal.

No sentido, porém, restricto do termo, só devem ser consideradas serpentes venenosas as que podem determinar accidentes graves ou mortaes no homem. Neste caso, se acham, apenas, as Proteroglyphas, as Solenoglyphas e, em casos excepcionaes, as Opistoglyphas.

Butantan, 1.º de Outubro de 1926.

CONTRIBUTION Á L'ETUDE DU VENIN DES GLANDES DES SERPENTS AGLYPHES

PAR LES DRS.

VITAL BRAZIL ET J. VELLARD

SOMMAIRE:

1—Les *Colubridae Aglyphes*, de même que les Boidae et les *Amblycephalidae*, possédent un certain nombre de glandes céphaliques de structure et de fonction différentes, dont les plus développées sont les supra labiales.

2—Chez *les Boidae*, les supra labiales sont de simples glandes séro muqueuses ayant la forme d'un long cordon granuleux, de structure uniforme: Chez les *Colubridae aglyphes* et les *Amblycecephalidae*. elles présentent trois régions distinctes; l'antérieure et la postérieure sont de nature seromuqueuse, la partie médiane est une glande de ferment ou de zymogene.

3—La sécrétion des supra labiales obtenue en triturant les glandes et en les traitant par le serum physiologique á 8 °|∞, s'est montrée, aprés filtration hautement toxique chez diverses espéces de *Colubridae aglyphes*, peu ou pas active chez d'autres, complétement sans action chez le *Constrictor constrictor* (*Boidae*).

Chez le *Drymobius bifossatus* c'est un venin paralysant, dépourvu d'action locale, trés actif pour le pigeon, le lapin, le cobaie et les batraciens, par voie endoveineuse ou par injection sous cutanée ou intra musculaire.

La sécrétion de *l'Herpetodryas carinatus*, d'action physiologique assez semblable á celle du *Drymobius bifossatus* est moins active. Le *Spilotes pullatus* est á peu prés dépourvu de sécrétion toxique; celle de *l'Helicops modestus* et du *Xenodon merremii* n'est active que pour les batraciens.

La seule espéce *d'Amblycephalidae* étudiée, *Dipsas bucephala* possède une sécrétion d'action neuro toxique faible, mais déterminant d'énormes sphacèles locaux.

4—Les sécrétions de *Drymobius bifossatus* et de *Xenodon merremii*, seules etudiéees á ce point de vue, sont dépourvues d'action hé-

molytique, protéolytique, coagulante ou anti coagulante; leur toxicité n'est détruite qu'aux environs de 100°.

5—Il est possible d'obtenir un serum actif contre la sécrétion toxique des supralabiales du *Drymobius*, et l'action de ce serum est strictement spécifique.

6—Les serums anti-crotaliques et anti-bothropiques sont presque sans action sur la sécrétion toxique du *Drymobius*.

Le serum sanguin du *Drymobius* neutralise 1 minima mortelle du propre venin par 0,5 c. c.; cette même quantité neutralise incomplèment 1 minima mortelle de venin de Crotalus terrificus pour le pigeon, mais neutralise jusqu'á 10 minimas mortelles de venin de Lachesis lanceolatus.

Ce dernier résultat en apparence paradoxal est du à la forte action anti-coagulante du serum du Drymobius; il s'agit donc en relation au venin de Lachesis lanceolatus d'une action mécanique antagoniste et non d'une véritable action anti-toxique.

7—Les *Colubridae aglyphes* de même que les Amblycephalidae quoique dépourvues d'appareil inoculateur de venin peuvent donc possèder une sécrétion salivaire toxique, paralysante, inoculée á leurs victimes ao moment de la déglutition par les nombreuses blessures produites par leurs dents lisses et coupantes.

BIBLIOGRAPHIA:

1—*Tiedemann*.—Uber die Speicheldrüsen der Schlangen. Denkschrift d. Akk. Wiss. München.—1813.

2—*Meckel*.—Archiv f. An. und Phis. 1826.

3—*Boie*.—Isis—1826.

4—*Dugés*—Rech. an. et phys. sur la déglutition dans les reptiles. Ann. de sc. nat.—1827.

5—*Schlegel*—Untersuchung. d. Speicheldrusen bei der Schlangen. Bull. de sc. nat. XVIIII—1828.

6—*Duvernoy*—Mém. sur les caractéres tirés de l'anatomie pour distinguer les serpents venineux des serpents non venineux. Ann. de sc. nat. XXVI, 1832 e XXX, 1833.

7—*Leydig* — Ueber die Kopfdrüsen einheimichen ophidien. Arch. für mikr. Anat. — 1873.

8—*Fayrer* J.—Citado por Mme. Phisalix.

9—*Wall* (Major F.)—Bombay Nat. Hist. Journal XX.

10—*Phisalix et Bertrand*—Sur la présence de glandes venimeuses chez les couleuvres et la toxicité du sang de ces animaux. C. R. Ac. Sc., 1894, CXVIII.

11—*Vital Brazil*—Contribuição ao estudo do veneno ophidico. Revista Médica de São Paulo.—1901—Pag. 255.

12—*Alcock and Rogers.*—Tocicité de la salive de Colubridae opistoglyphes et aglyphes.—Proc. of the R. Soc.—LXX—1902.

13—*Marie Phisalix et F. Caius*:—Propriétés venineuses de la salive parotidienne chez des Colubridae aglyphes des genres Tropidonotus, Zamenis,... Bull. du Mus. d'Hist. nat.—Paris—25 de Maio 1916 e Maio 1917.

15—*Dorival de C. Penteado*:—Estudos histologicos das glandulas da cabeça dos ophidios brasileiros. Memorias do Instituto de Butantan. Tomo I—fasc. 1—1918.

16—*Kraus* (R)—Biologischen Studien úber gift der Kopfdrüsen ungiftigen Schlangen—Münchener mediz. Wochenschrif 1922 n.° 35, pag. 1277—Uber biologische Schlangenforschung. Medizin. Klinik, n.° 23—1924.

17—*Vital Brazil e J. Vellard*:—Contribuição ao estudo do veneno das glandulas das serpentes aglyphas (nota prévia). Brasil Medico, 1925.

CONTRIBUTION Á L'ETUDE DES ARAIGNéES

NOUVELLES ESPÉCES D'ARGIOPIDAE

PAR LE

Dr. J. VELLARD.

Glyptocranium fragoides, sp. nov.

Femelle adulte: Long: 14 m. m.—Céphth. 6,5|6, larg. ant. 3,5—St. 2,5|2,5.—Abd. 11|12,5—i=22—ii=16, iii=9—iv=13.

Céphalotorax á peine plus long que large, arrondi sur les côtés, élevé, le 1/3 postérieur lisse vertical recouvert par l'abdomen; fortement déclive antérieurement avec la région céphalique peu distincte; au point le plus élevé, 2 gros tubercules légèrement divergents, terminés par deux grandes dents, l'interne la plus longue, accompagnées d'autres ramifications plus petites et irréguliéres; toute la région céphalique parsemée de petits tubercules, moins nombreux et moins développés sur les côtés.

Yeux:—Médians sur un tubercule assez élevé, éloigné de la marge ant., de son diamétre, disposés en quadrilatère trés légèrement plus étroit ant. les M A séparés entre eux et des M P par un diamètre et demi et les M P á peine plus entre eux; latéraux de moitié environ plus petits, égaux entre eux, placés sur un tubercule plus bas que le tubercule des médians dont ils sont éloignés 2 fois environ la largeur de ce dernier, les L A en ligne á peine procurve avec les M A. — Abdomen un peu plus large antérieurement que long, triangulaire, épais, arrondi en avant légérement plus saillant au 1/3 antérieur, puis longuement déclive en arriére.—Epigyne peu développée, en forme de fossette divisée en 2 parties par un scape rudimentaire.

Coloration:—Céphalothorax entiérement noir avec de longues soies blanches dressées le long des marges; chélicéres brun jaune, plus claires á la pointe; Sternum et coxae rouges, ces derniéres avec une strie brune; pattes sans épines, jaune rouge, annelées de brun, avec de longues soies dressées blanches. Abdomen recouvert d'une peau épaisse et ridée rouge vermillon, violacé antérieurement et parsemé de taches de cette couleur lui donnant l'apparence d'une fraise; sur les bords 4 á 5 lignes concentriques á peu prés réguliéres de dépressions ponctiformes noir bleu reliées entre elles par de fines

stries de même couleur souvent incomplétes; 3 a 4 lignes longitudinales semblables á la partie médiane postêrieure; au 1/3 ant., 2 profondes impressions musculaires et 4 á 6 semblables post.; de longues soies blanches dressées et clairsemées sur tout l'abdomen; ventralement, parties latérales brunes, ridées et striés de rouge entourant une zone médiane trapèziforem, rouge, avec quelques points noirs; filiéres jaune rouge avec un anneau médian brun.

Coloration des exemplaires conservés:

Les exemplaires conservés dans l'alcool passent rapidement du rouge au jaune, avec la région antérieure pigmentée de brun; les dépressions ponctiformes et les stries paraissent beaucoup plus visibles, (Comparez la photographie d'un exemplaire vivant et le dessin fait sur un exemplaire conservé).

Habitat:

Espèce répandue dans les Etats de Rio de Janeiro et de São Paulo mais jamais abondante; elle vit de préférence sur les orangers óu elle tisse une petite toile irrégulière entre les feuilles; les cocons, genéralement de 3 á 5, en forme de petites sphéres de 1 c. de diamétre avec 4 petits taches blanches médianes sont suspendus dans cette toille par un pédicule allongé.

Venin:—L'étude du venin de cette espéce n'est pas encore terminé; il semble assez peu actif, au contraire de celui du G. gastheracanthoides (selon Escomel), ne déterminant pas de symptômes chez la souris blanche par piqure directe.

Type:—1 femelle adulte, capturée á Butantan; nombreux cotypes de l'Etat de Rio de Janeiro et de São Paulo.

Diphya bicolor, sp. nov.

Mâle adulte: Long. 3 m. m.

Céphalothorax un peu plus long que large un tiers environ plus étroit antérieurement; région céphalique fortement relevée antérieurement, limitée par um sillon en U; fossette postérieure transverse, étroite, profonde; yeux disposés sur 2 lignes transverses occupant toute la largeur de la région céphalique, l'antérieure droite par les sommets, récurve par les centres; M A environ 2/3 plus petits que les L A, séparés entre eux et de ces derniers par un peu moins de leur diamètre; ligne postérieure un peu plus récurve (bord ant. des L P vers le 1/4 ant. des M P.); M P et L P égaux aux L A, separés entre eux et des antérieurs par 1/4 environ de leur diamétre; les médians forment ainsi un trapéze á grande base postérieure, un peu plus haut que large.

Labium bas, presque moitié plus large que haut; maxilles presque carrées; marge inférieure des chélicéres avec 5 dents; sternum sans impressions, en pointe obtuse entre les coxae iv séparées d'environ leur 1/2 diamétre.

Pattes:—4-1-2-3, assez longues, fines, peu épineuses; le 1/3 supérieur des tibias et le protarse á i et ii (peu marqué á iii et iv), portent á la face interne une rangée de soies diminuant de longueur de la base vers le sommet du segment, sans alternance d'autres épines; á la face externe des mêmes segments, quelques soies semblables disséminées et peu reguliéres.

Palpe:—Patelle courte, moniliforme. Tibia avec 1 longue soie dorsale; *tarse*:—Cymbium en forme de palette, étroit et allongé an



sommet, portant vers le 1/4 basal une forte dent dorsale, conique, semblable á celle des *Dolichognatha;* paracymbium réduit á 1 simple dent á la base du cymbium; bulbe terminé par une forte apophyse coudée.

Abdomen: — Court, tronqué antérieurement; pli stigmatique droit.

Coloration:—Céphalothorax jaune orange, de région occulaire noire; chélicéres plus foncées á l'apex; labium et maxilles jaune rouge, le premier avec une bande tranverse brune; coxae, sternum et pattes jaune rouge, tous les femurs avec un anneau médian brun. Abdomen jaune rougeâtre, brun noir postérieurement; ventre jaune sale.

Type:—1 mâle adulte de Petropolis (Estado do Rio de Janeiro —Avril, 1924. D. bicolor est la première espéce de ce genre, jusque ici localisé au Chile, décrite du Brésil.

Dyschiriognatha lobata sp. nov.

Male adulte—Long. 4 m. m.

Céphalothorax ovale, large, arrondi postérieurement, fortement retréci en avant; fossette postérieure large, transverse; région céphalique convexe, limitée par un sillon en U complet.

Yeux:—Groupe des médians á peu prés aussi long que large un peu plus étroit en avant; latéraux connés, L A récurves avec les M A,

L P procurves avec les M P; clypeus plus large que les M A, plus étroit que le groupe des médians.

Chélicères trés développées, convexes, divergentes; marge supérieure avec 2 dents, marge inférieure avec 3 dents; crochet long et sinueux.

Labium un peu plus large que long, atténué et tronqué au sommet, dépassant le milieu des lames maxillaires.

Sternum triangulaire, prolongé latéralement entre les coxae ii et iii, et iii etiv, tronqué postérieurement entre les coxae iv qui sont largement disjointes.

Pattes courtes, mutiques, peu inégales.

Palpe: Tibia á peine plus long que large, triangulaire, élargi au sommet; tarse profondément divisé en deux branches; le cymbium,



en forme á la base de palette courte, étroite et peu concave, se prolonge en un longue lame étroite brusquement élargie á l'apex; le paracymbium, un peu plus court, ne dépassant pas le bulbe est étroit, sinueux et faiblement dilaté au sommet; bulbe globuleux, déprimé á la face supérieure, surmonté d'une longue apophyse verticale autour de laquelle s'enroule le style. "

Abdomen:—Court, épais, découpé en 4 lobes, 2 latéraux et 2 postérieurs; stigmate trachée fortement rebordé situé au milieun de la face ventrale.

Coloration:—Céphalothorax brun rouge, les marges et la région céphalique noires; pattes jaunes avec l'extrémité des femurs, les patelles, l'extrémité des tibias et des métatarses brunes; abdomen gris jaune avec les 4 lobes brun noir marqués au sommet de petites taches nacrées (jaune clair dans l'alcool). Face ventrale brun noir avec la région épigastrique et 2 taches latérales nacrées (jaune clair dans l'alcool).

Type:—Um mâle adulte capturé á la base des plantes dans la Lagôa de Bom Successo á Rio de Janeiro.

Cette espéce, le premiére du genre décrite du Brésil (les espéces d'E. Simon sont restées inédites) se distingue á premiére vue des autres espéces du genre par la forme lobée de son abdomen.

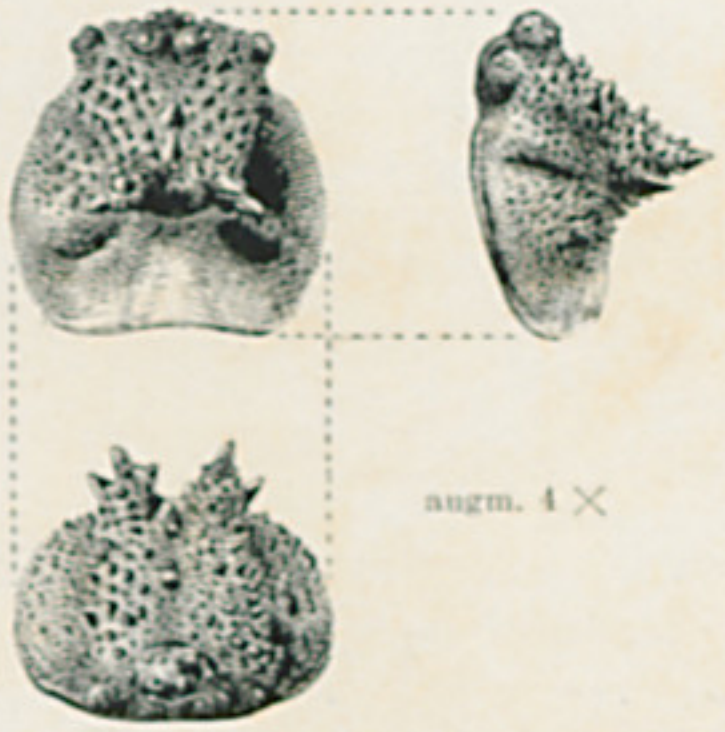
Butantan, 3 Novembre 1926.



Glyptocranium fragoides sobre a teia com os seus saccos de ovos
Toile et sacs d'œufs.



Tamanho natural



augm. 4 ×

Glyptocranium fragoides sp. nov. ♀

RUD FISCHER, del.