MEMORIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

1933 - 1934

TOMO VIII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal. 65

MEMORIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

1933 - 1934

TOMO VIII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal. 65

INDICE

	Pag.
Noticiario	VII
ALCIDES PRADO — Contribuições ao conhecimento dos culicideos de S. Paulo — — V. Synopse das especies de **Mansonia**	1
J. LEMOS MONTEIRO — Vaccina contra o "typho exanthematico" de S. Paulo. Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas	9
J. LEMOS MONTEIRO — Comportamento experimental do virus do "typho exanthematico" de S. Paulo após passagem pelo carrapato (**Amblyomma cajennense**)	21
J. LEMOS MONTEIRO — Comportamento experimental do coelho aos virus do "typho exanthematico" de S. Paulo e da febre maculosa das Montanhas Rochosas	39
J. LEMOS MONTEIRO e FLAVIO DA FONSECA — Localização da **Rickettsia brasiliensis** nas cellulas dos diverticulos intestinaes do **Amblyomma cajennense**	47
J. TRAVASSOS e J. LEMOS MONTEIRO — Contribuição ao estudo da reacção de Weil-Felix na infecção experimental pelos virus do "typho exanthematico" de S. Paulo e febre maculosa das Montanhas Rochosas	57
R. GODINHO — Resistencia de differentes germes pathogenicos experimentalmente associados ao virus vaccinico	81
R. GODINHO e D. VON KLOBUSITZKY — Influencia do pH sobre a actividade do virus vaccinico	95
D. VON KLOBUSITZKY — Um micro-methodo para pesquisa de varios saes de estrychnina	105
D. VON KLOBUSITZKY — Estudos physico-chimicos sobre proteinas em presença de alcool. — I. Sobre a coagulação pelo calor das soro-proteinas em presença do alcool	111
R. GODINHO — Immunização com o virus vaccinico cultivado na allantoide do embryão de gallinha	131
ALCIDES PRADO — Uma nova especie de escorpião do genero **Bothriurus** Peters	145
AFRANIO DO AMARAL — Notas sobre chromatismo de ophidios. — III. Um caso de xanthismo e um novo de albinismo, observados no Brasil	149
AFRANIO DO AMARAL — Estudos sobre ophidios neotropicos. — XXX. Novo genero e especie de Colubrideo na fauna da Colombia	157
— XXXI. Sobre a especie **Bothrops alternata** D. & B., 1854 (Crotalidae). Variações. Redescripção	161
AFRANIO DO AMARAL — Collecta herpetologica no nordeste do Brasil	183

J. LEMOS MONTEIRO — Contribuição ao estudo das relações immunologicas entre o "typho exanthematico" de São Paulo e demais febres exanthematicas que occorrem na America do Sul 195

J. LEMOS MONTEIRO — O "typho exanthematico" de S. Paulo e suas relações com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, á luz das provas de immunidade cruzada 207

J. LEMOS MONTEIRO e J. TRAVASSOS — A reacção de fixação do complemento na determinação de focos e no diagnostico retrospectivo da febre amarella 221

J. TRAVASSOS — Estudo experimental sobre toxina estaphylococcica 233

THALES MARTINS — Estudos sobre gonadas e hypophyse.

— I. Desenvolvimento precoce dos caracteres sexuaes em gallinaceos tratados com substancias gonado-estimulantes do soro gravidico equino 347

— II. Sobre os resultados da parabiose de ratos femeas com ratos castrados e hypophysectomizados 353

WALDEMAR PECKOLT — Contribuições á materia medica vegetal do Brasil.

— I. Estudo pharmacognostico da **Cucurbita maxima** Duch e **Cucurbita pepo L. (Cucurbitaceae)** 357

— II. Estudo pharmacognostico de **Struthanthus marginatus** (Desr.) Blume (**Loranthaceae**). Um novo principio da planta 371

— III. Estudo pharmacognostico do **Chondrodendron platyphyllum** (St. Hil.) Miers (**Menispermaceae**) 379

Artigos de collaboração:

CLODOMIRO PICADO — Serpentes venenosas occorrentes em Costa Rica.

— I. Sobre a especie **Bothrops lansbergii** e formas affins. Seu veneno e microornamentos epidermicos 389

— II. Sobre a especie **Bothrops godmanni.** Seu veneno e microornamentos epidermicos 395

C. DE MELLO LEITÃO — Tres aranhas novas nas collecções do Instituto Butantan 399

C. DE MELLO LEITÃO — Novas **Gonyleptidae** nas collecções do Instituto Butantan 409

NOTICIARIO

Em virtude da grande crise financeira nitidamente accentuada no primeiro semestre de 1933 como consequencia da agitação politica de 1932, que interrompeu o rhythmo das actividades de S. Paulo, não nos foi possivel dar á publicidade, no devido tempo, o presente numero das Memorias. Diversos originaes sobre trabalhos, realizados em nossos laboratorios e recebidos para publicação ainda no segundo semestre de 1933, ficaram á espera do restabelecimento da marcha dos serviços de pesquisa e de producção do Instituto, de sorte que, só agora, vêm á luz, conjunctamente com outros cujo preparo se ultimou no decurso do corrente anno.

Com a melhora das nossas condições, que começou a fazer-se sentir no principio do exercicio, poude o governo do Estado dar ao Instituto Butantan elementos para a creação e installação de mais duas das secções technicas previstas no plano de reorganização apresentado em 1928. Essas duas secções são a de Botanica Medica, destinada especialmente ao estudo da materia medica vegetal brasileira e ao preparo de drogas de consumo constante em nossas pharmacias, e a de Physio-pathologia Experimental, dedicada a investigações principalmente sobre Endocrinologia e ao preparo de principios opotherapicos estalonados. Com a vinda de technicos experimentados para a chefia dessas duas secções, foi-nos possivel dar immediato inicio a pesquisas especiaes e delles obter contribuições originaes para o presente numero das Memorias, no qual tambem figuram artigos de collaboração de elementos estranhos ao Instituto, a demonstrarem nosso proposito de approximação scientifica. Desses artigos, dois, escriptos pelo prof. C. de Mello Leitão, do nosso Museu Nacional, versam sobre novas formas de aranhas e opiliões encontradas nas collecções do Instituto, as quaes lhe foram remettidas para estudo; dois outros, preparados pelo dr. Clodomiro Picado, dizem respeito a serpentes da Costa Rica, país com cujos technicos temos mantido estreita collaboração nestes ultimos annos, desde que lá esteve, em visita de caracter scientifico, o actual director do Instituto Butantan.

Ao ser distribuido este volume é provavel que já se tenha celebrado o contracto de outros especialistas para as novas secções de Chimica Experimental, de Pharmacologia Experimental e de Genetica e Cytologia, previstas na reorganização do Instituto e para cuja installação o actual governo de S. Paulo prometteu dar os necessarios elementos, zelando, assim, pelo nosso constante progresso scientifico.

Actualmente, o pessoal superior encarregado de serviços technicos do Instituto Butantan é o seguinte:

Director-superintendente — AFRANIO DO AMARAL, B. Sc. & L., D. M., D. Hyg. (Med. Trop., Harvard), Editor das "Memorias do Instituto Butantan".

Assistentes chefes: (Chefes de departamentos)
JOSÉ B. ARANTES, dipl. Phcia., D. M.
J. LEMOS MONTEIRO, B. Sc. & L., D. M.
S. CAMARGO CALAZANS, D. M.
DIONYSIO VON KLOBUSITZKY, D. M.
THALES MARTINS, D. M.
WALDEMAR PECKOLT, B. Sc. & L., dipl. Phcia. & Chim., D. M.

Assistentes: (Encarregados de laboratorios)
RAUL B. GODINHO, D. M.
JOAQUIM TRAVASSOS, B. Sc. & L., D. M.
CICERO NEIVA, B. Sc. & L., Med. Vet.
ALCIDES PRADO, B. Sc. & L., D. M.
FLAVIO DA FONSECA, D. M.

Adjuncta extra: JANDYRA PLANET, D. M.

Toda correspondencia scientifica, relativa ás "Memorias", deve ser dirigida ao

EDITOR, MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN

CAIXA POSTAL, 65

SÃO PAULO — BRASIL

CONTRIBUIÇÕES
AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE S. PAULO

POR

ALCIDES PRADO

(*com 6 gravuras no texto*)

595.771:981

CONTRIBUIÇÕES
AO CONHECIMENTO DOS CULICIDEOS DE S. PAULO

V. Synopse das especies de *Mansonia*

POR

ALCIDES PRADO

Nestas notas, occupo-me quasi só em estabelecer chaves para a determinação das especies mais communs do genero *Mansonia*, subgeneros *Rhynchotaenia* e *Mansonia*.

São mosquitos muito abundantes nos arredores de S. Paulo, facilmente capturaveis nos meses de abril e maio, na parte da cidade banhada pelo rio Pinheiros.

Pretendo, em trabalho futuro, estudar os principaes focos larvarios e conhecer as plantas aquaticas que favorecem a grande procriação destes culicideos, uma vez que as larvas respectivas respiram através das raizes de certos vegetaes. Entre estes innumeros auctores collocam a *Pistia stratiotes* L., vulgarmente conhecida por herva de Santa Luzia, planta, aliás, rara nas vizinhanças de S. Paulo.

Apezar da grande disseminação em toda a região neotropica, estes mosquitos não são considerados transmissores de molestias humanas.

Os principaes caracteres genericos destes culicideos são os seguintes: presença de cerdas post-espiraculares, ausencia de cerdas espiraculares, escamas das azas ovaes, caracteristicas ou em estandarte e ausencia de cerdas no lado superior da base de R_1.

Chaves das especies de Mansonia:

ADULTOS

(*Coloração e estructura*)

1 — Femur com um anel branco subapicilar — 2 (subgen. *Rhynchotaenia*)
Femur sem tal anel — 5 (subgen. *Mansonia*)

2 — Mesonoto pardo-escuro, sem ornamentação	*arribalzagae* THEOBALD
Mesonoto pardo-escuro, com ornamentação	3
3 — Tibias, especialmente pares anterior e medio, manchadas de branco	4
Tibias quasi inteiramente pardo-escuras	*albifera* PRADO
4 — Mesonoto com escamas esparsas, pardas e pallido-doiradas, formando uma larga faixa mediana, longitudinal, ladeada por duas outras mais estreitas e da mesma côr; escamas das azas ovaes estreitas, caracteristicas, negras e branco-amarelladas, misturadas	*juxtamansonia* CHAGAS
Mesonoto mais ou menos identico ao anterior, porém com as faixas longitudinaes mais tenues; escamação menor em tamanho, interrompida na base das forquilhas das cellulas e ao nivel das nervuras transversaes; escamas negras e outras pallidas, estas ultimas um tanto inconspicuas	*fasciolata* LYNCH-ARRIBALZAGA
Mesonoto com uma larga faixa mediana longitudinal formada de escamas pardas e pallido-doiradas, ladeada por outras duas mais estreitas; escamas das azas ovaes estreitas, negras em geral, com uma fileira de escamas branco-amarelladas em todo o quarto basilar de R_1	*albicosta* CHAGAS
5 — Mesonoto com escamas douradas na parte anterior	*amazonensis* THEOBALD
Mesonoto com escamas douradas antes da raiz das azas	*humeralis* DYAR & KNAB
Mesonoto sem escamas douradas	6
6 — Especie grande; côr geral pardacenta; azas com escamas ovaes largas, caracteristicas	*pseudotitillans* THEOBALD
Especie pequena; côr geral pardo-avermelhada; azas com escamas ovaes largas, caracteristicas, com outras ovaes estreitas, entremeadas	*titillans* WALKER

Hypopygio

(estructura)

1 —	Lobo da peça lateral moderado, mais curto ou tão curto quanto a espinha accessoria	2 (subgen. *Rhynchotaenia*)
	Lobo da peça lateral longo, com a espinha accessoria mais curta do que elle	6 (subgen. *Mansonia*)
2 —	Lobo e espinha, ambos longos, excedendo a ponta da peça lateral	*arribalzagae* THEOBALD
	Lobo curto; a extremidade da espinha não excedendo o comprimento da peça lateral	3
3 —	Par interno do mesosoma erecto, com uma expansão na ponta, notando-se em sua parte interna saliencias eriçadas	4
	Par interno do mesosoma erecto, com uma expansão na ponta, não se notando, porém, saliencias eriçadas em sua parte interna	5
4 —	Par externo do mesosoma chitinizado, em angulo recto, com a ponta espatulada, notando-se nella fortes denticulos	*juxtamansonia* CHAGAS
	Par externo do mesosoma pouco chitinizado, com a ponta em forma de espinha	*fasciolata* LYNCH-ARRIBALZAGA
5 —	Par interno do mesosoma sagitado e expandido apenas na ponta	*albifera* PRADO
	Par interno do mesosoma espatulado e com uma serie de denticulos, internamente, na ponta	*albicosta* CHAGAS
6 —	Peça lateral com lobo apicilar, onde se inserem cerdas e filamentos	*amazonensis* THEOBALD
	Peça lateral sem lobo apicilar	
7 —	Clasper forte, retorcido, com uma pequena aba ao meio; lobo basilar com base triangular que sustenta uma estreita haste de ponta entumecida	*titillans* WALKER
	Clasper delgado, curvo, com um pequeno ramo lateral; lobo basilar, em cuja haste ha um entumecimento antes da ponta	*humeralis* DYAR & KNAB

Mansonia (Rhynchotaenia) arribalzagae (THEOBALD)

Especie muito rara, apenas se conta entre os exemplares da antiga collecção entomologica do Instituto Butantan. Peryassú observou exemplares provenientes de Bicudos, no Estado de Minas.

Theobald, Mon. Culic. III:261.1903.
Peryassú, Os Culic. do Brasil:228.1908
Bone & Bonne — Wepster, Mosq. of Surinam (13):327.1925.
Dyar, The Mosq. of the Americas:259.1928.

Mansonia (Rhynchotaenia) juxtamansonia CHAGAS

Esta especie é muito abundante em S. Paulo, nos meses proprios do anno.

Peryassú, Os Culic. do Brasil:223.1908.
Dyar, The Mosq. of the Americas:255.1928.

Mansonia (Rhynchotaenia) fasciolata (LYNCH ARRIBALZAGA)

Entre as varias especies de *Mansonia,* é a mais commum em S. Paulo.

Lynch Arribalzaga, Rev. Mus. de la Plata II:150.1891.
Shannon & Del Ponte, Rev. Inst. Bact., B. Aires V(1):65.1927.
Dyar, The Mosq. of the Americas:256.1928.

Mansonia (Rhynchotaenia) albifera PRADO

Affim de *M. albicosta,* porém bastante frequente em Pinheiros e Butantan, S. Paulo.

Prado, Mem. Inst. But. VI:193.1931.

Mansonia (Rhynchotaenia) albicosta (CHAGAS)

Um unico exemplar macho se encontra entre os exemplares da antiga collecção entomologica do Instituto Butantan, com o dado de captura em S. Paulo, anno de 1918.

Peryassú, Os Culic. do Brasil:220.1908.
Dyar, The Mosq. of the Americas:258.1928.
Prado, Mem. Inst. But. VI:195.1931.

Mansonia (Mansonia) amazonensis (THEOBALD)

Das especies do sub-genero *Mansonia,* sempre menos abundantes em S. Paulo do que as do sub-genero *Rhynchotaenia,* é a mais frequente. Costa Lima observou-a em Santarem e Obidos, no rio Amazonas.

Theobald, Mon. Culic. II:182.1901.
Dyar, The Mosq. of the Americas:252.1928.
Costa Lima, Suppl. Mem. Inst. Osw. Cruz (12):297.1929.

Mansonia (Mansonia) titillans (WALKER)

Capturada com relativa constancia em S. Paulo, porém, só femeas. As larvas desta especie, segundo opinião dos auctores, acham-se sempre adherentes ás raizes da *Pistia stratiotes* L..

Walker, Cat. Brit. Mus. I:5.1848.
Shannon & Del Ponte, Rev. Inst. Bact., B. Aires, V(1):65.1927.
Dyar, The Mosq. of the Americas:254.1928.
Root, Animal Parasitology:525.1929.
Costa Lima, Suppl. das Mem. Inst. Osw. Cruz (12):297.1929.
Pinto, Arthr. Paras. Trans. Doenças II:585.1930.
Costa Lima, An. Mus. Nac. Hist. Nat., B. Aires, XXXVI:359.1931.
Lane, Rev. Biol. e Hyg. IV(2):72.1933.

Mansonia (Mansonia) pseudotitillans (THEOBALD)

São colhidas desta especie, em S. Paulo, femeas em certa proporção. Costa Lima conseguiu estudar o macho desta especie, até então desconhecido, baseado em um exemplar procedente de Jacarepaguá, no Districto Federal.

Dyar, The Mosq. of the Americas:253.1928.
Costa Lima, Suppl. Mem. Inst. Osw. Cruz (12):297.1929.

Mansonia (Mansonia) humeralis DYAR & KNAB

Proxima de *M. titillans;* rara. De um exemplar colleccionado em 1902, em S. Paulo, conseguiu-se uma preparação do hypopygio, já descripto.

Dyar & Knab, Ins. Ins. Mens. IV:61.1916.
Dyar, The Mosq. of the Americas:252.1928.
Martini, Rev. de Entom., S. Paulo, I:215.1931.

RESUMO

Este trabalho versa sobre o estabelecimento de chaves capazes de facilitar a determinação dos representantes mais communs do genero *Mansonia*. Em trabalho futuro serão descriptos os principaes fócos larvarios e registadas as plantas aquaticas que favorecem a procriação desses Culicideos, cujas larvas respiram através das raizes de certos vegetaes desse typo, entre os quaes innumeros auctores collocam a *Pistia stratiotes,* planta aliás rara nos arredores de S. Paulo. Apezar da enorme disseminação em toda a região neotropica, os mosquitos do genero *Mansonia* não são considerados transmissores de molestias humanas.

ABSTRACT

A key is given to facilitate the identification of the most common species of *Mansonia* (*Diptera, Culicidae*), together with some information on their distribution in Brazil.

(Trabalho da Secção de Protozoologia e Parasitologia do Instituto Butantan, recebido em agosto de 1933. Dado à publicidade em agosto de 1934. *Nota:* As "Contribuições" de I a IV de serie foram publicadas nas Mem. Inst. Butantan VI. 1931).



Fig. 1
Mansonia juxtamansonia, hypopygio



Fig. 2
Mansonia fasciolata, hypopygio



Fig. 3
Mansonia albifera, hypopygio



Fig. 4
Mansonia albicosta, hypopygio

Fig. 5
Mansonia amazonensis, hypopygio

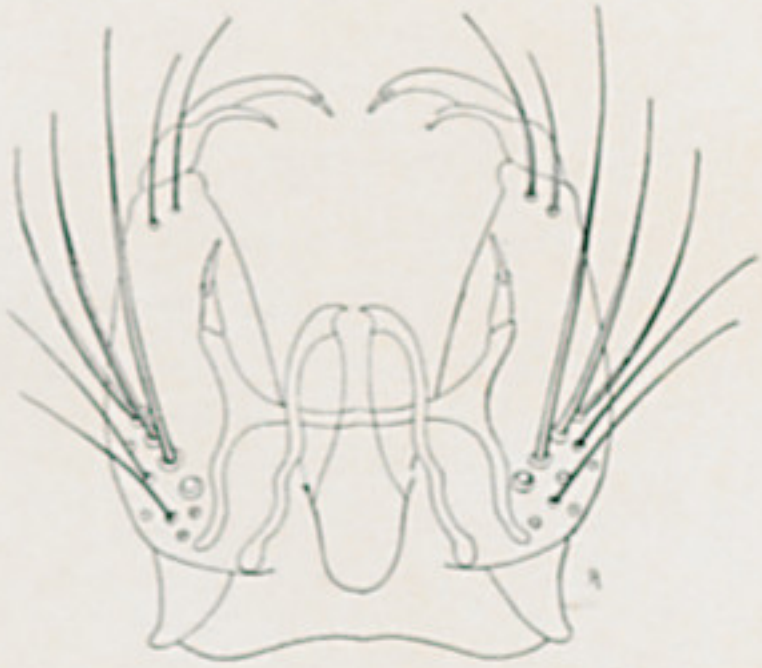


Fig. 6
Mansonia humeralis, hypopygio

VACCINA
CONTRA O "TYPHO EXANTHEMATICO" DE S. PAULO

Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas

POR

J. LEMOS MONTEIRO

(Com 5 graphicos no texto)

614.478:614.526

VACCINA CONTRA O "TYPHO EXANTHEMATICO" DE S. PAULO

Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas

POR

J. LEMOS MONTEIRO

Num trabalho anterior (1) publicámos os resultados de uma serie de experiencias, os quaes evidenciavam estreitas relações immunologicas entre o "typho exanthematico" de S. Paulo e a febre maculosa das Montanhas Rochosas: cobaias que resistiam á infecção pelo virus de S. Paulo, mostravam-se tambem immunes ao virus da febre maculosa. Mostrámos tambem o valor protector de uma vaccina, preparada com carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados com o virus de S. Paulo, em relação á febre maculosa.

Parallelamente, Parker e Davis (2) e Dyer (3), nos Estados Unidos, obtiveram resultados conducentes ás mesmas conclusões, os primeiros estudando o valor protector dos soros de animaes immunes ao "typho" de S. Paulo em relação á febre maculosa das Montanhas Rochosas, e o ultimo, a resistencia ao virus de S. Paulo dos animaes immunes á febre maculosa; verificaram tambem a não resistencia ao nosso virus dos animaes que resistiram a infecção pelo virus do typho exanthematico europeu (epidemico ou classico).

Novos dados em apoio ás relações immunologicas das duas infecções foram depois trazidos: por Parker e Davis (4), com provas de protecção de soros de animaes immunes á febre maculosa em relação ao virus de S. Paulo e de immunidade dos animaes que resistiram á primeira em relação ao virus da segunda infecção; e por Davis e Parker (5), com demonstrações do valor protector da vaccina contra a febre maculosa em relação ao virus de S. Paulo e com outras provas de immunidade cruzada.

No presente trabalho acrescentaremos novos dados em apoio desses primeiros resultados, versando sobre *a*) technica para o preparo de uma vacci-

na contra o "typho exanthematico" de S. Paulo, com o emprego de carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados; *b*) valor protector da vaccina contra o "typho" de S. Paulo em relação á infecção homologa e á febre maculosa das Montanhas Rochosas; *c*) valor protector da vaccina contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas (vaccina de Parker), em relação ao "typho" de S. Paulo e *d*) outras provas de immunização cruzada entre os dois virus.

Vaccina contra o "typho exanthematico" de S. Paulo

Technica do preparo — A technica que empregámos no preparo da partida de vaccina utilizada nas experiencias sobre o seu valor protector, a serem agora descriptas, foi a seguinte:

Um lote de *Amblyomma cajennense,* exemplares femeas, foi posto a sugar uma cobaia infectada (N.º 999) durante a reacção febril, nos dias 7 a 11-IV-933, quando foram retirados e conservados em tubos apropriados. Dias depois alguns exemplares desovaram. Decorridos 15 dias, os carrapatos foram lavados em agua physiologica, alcool e novamente em agua physiologica por varias vezes. Em seguida, foram convenientemente triturados em um gral de porcelana, ao mesmo tempo que se juntava agua physiologica em volume correspondente a 2 cc. por exemplar triturado. O liquido obtido, de aspecto pardacento escuro, foi centrifugado com pequena velocidade para deposito das particulas solidas, chitinosas, etc. e decantado para um frasco munido de rolha esmerilhada. Depois de se ter addicionado formol na proporção de 0,2 % e agitado, foi o frasco collocado na estufa a 37° onde permaneceu 48 horas. O liquido soffreu então uma segunda centrifugação, com maior velocidade, sendo decantado, enfrascado novamente e conservado em logar fresco.

Este liquido que representa a vaccina, tem uma coloração ambar, de aspecto quasi transparente ou com pequena opalescencia, sendo verificada sua esterilidade nos meios communs de laboratorio e sua não infectuosidade, por inoculação previa em cobaia.

Estando já verificado que o virus do "typho" de S. Paulo pode ser transmittido pelo *Amblyomma* á nova geração (6 e 7) e que este Ixodideo é infectante, muito provavelmente nas diversas phases da sua evolução, a vaccina poderia ser preparada. no caso da sua necessidade em larga escala e si dispussessemos de installações adequadas a este mister, segundo a technica descripta e aperfeiçoada por Spencer e Parker (8), usada no "Rocky Mountain Spotted Fever Laboratory", em Hamilton (Montana), nos Estados Unidos, para o preparo da vaccina contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas, nas suas differentes phases, incluindo os meios para a criação dos carrapatos (*).

(*) Agradecemos ao dr. R. R. Parker a remessa de informações completas da sua technica e os meios que usa em seu laboratorio para a criação e infecção dos carrapatos, inclusive as excellentes photographias a respeito.

Apenas, no nosso caso, lançar-se-ia mão, não do *Dermacentor andersoni*, porém do *Amblyomma cajennense*, não nos convindo criar no laboratorio o primeiro, mesmo que sua manipulação seja mais facil, visto não o possuirmos no Brasil e não nos convir, por motivos facilmente comprehensiveis, a sua importação.

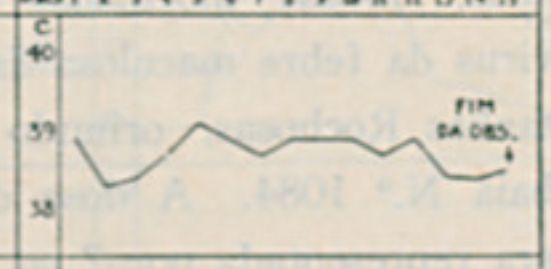
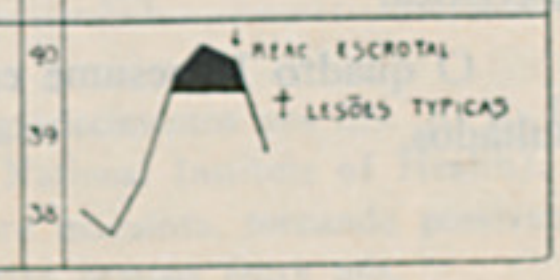
Valor protector da vaccina contra o "typho" de S. Paulo em relação á infecção homologa

Em 28-IV-933 e 5-V-933 foram inoculadas 6 cobaias com a nossa vaccina, preparada pela technica descripta: 4 receberam uma só dose de 0,5 cc. ou 1 cc. e 2 receberam 2 doses, com 5 dias de intervallo, de 0,5 cc. e 1 cc. ou de 1 cc. e 1 cc.. Decorridos 12 dias da ultima inoculação, todas, alem de uma cobaia testemunha, foram inoculadas com o virus do "typho" de S. Paulo, virus de passagem, representado por emulsão de cerebro da cobaia N.º 1060.

Resultados (Quadro I) — As 6 cobaias previamente vaccinadas, mesmo a que havia recebido uma só dose de 0,5 cc. da vaccina, não reagiram á inoculação de prova, durante uma observação de 15 dias, como se verifica pelo quadro I, enquanto que a cobaia testemunha apresentou uma infecção caracteristica, com reacção escrotal e lesões typicas verificadas na necropsia.

QUADRO-I

IMMUNIZAÇÃO DE COBAIAS COM VACCINA PREPARADA COM *AMBLYOMMA CAJENNENSE* INFECTADOS COM O VIRUS DE S. PAULO. RESULTADO DA PROVA DE IMMUNIDADE EM RELAÇÃO AO VIRUS HOMOLOGO.

Nº da Cobaia	Doses de vaccina 1º	Doses de vaccina 2º	Dias decorridos	Resultado da inoculação do virus
1048	0,5cc	1,cc.	12	
1030	1,cc	1,cc.	12	
1038	0,5cc	–	12	
1040	1,cc	–	12	
1044	1,cc	–	12	
1045	1,cc	–	12	
1081	Testemunha			

Valor protector da vaccina contra o "typho" de S. Paulo em relação á febre maculosa das Montanhas Rochosas

Em 28 - IV - 933 e 5 - V - 933 foram inoculadas 4 cobaias com a nossa vaccina: 2 com uma só dose de 1 cc. e 2 com duas doses de 0,5 cc. e 2 cc. ou 1 cc. e 2 cc.. Decorridos 18 dias após a ultima inoculação, em 23 - V - 933, estas 4 cobaias, assim como 3 cobaias normaes, como testemunhas, foram inoculadas com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, oriundo da cobaia N.º 1084. A dose do virus era representada por 2 cc. de uma emulsão, em 25 cc. de agua physiologica, de 3 cc. de sangue desfibrinado, metade de um testiculo e um quarto de cerebro, convenientemente emulsionados.

Resultados (Quadro II) — Das 4 cobaias vaccinadas, 3 não apresentaram reacção febril durante 15 dias de observação e 1 morreu, por infecção intercorrente, na noite do 4.º dia após a inoculação, não se verificando, pela necropsia, augmento do baço. As 3 cobaias testemunhas inoculadas com o mesmo virus, no mesmo dia, apresentaram infecção caracteristica.

O quadro II resume estes resultados.

QUADRO-II

IMMUNIZAÇÃO DE COBAIAS COM VACCINA PREPARADA COM *AMBLYOMMA CAJENNENSE* INFECTADOS COM O VIRUS DE S. PAULO. RESULTADO DA PROVA DE IMMUNIDADE EM RELAÇÃO AO VIRUS DA FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS.

Nº da Cobaia	Doses da vaccina 1º	Doses da vaccina 2º	Dias decorridos	Resultado da inoculação do virus
1029	0,5 cc	2 cc	18	FIM DA OBS.
1031	1 cc	2 cc	18	FIM DA OBS.
1041	1 cc	—	18	FIM DA OBS.
1042	1 cc	—	18	† INFECÇÃO INTERCORRENTE
1092	Testemunha			REAC ESCROTAL † LESÕES TYPICAS
1093	Testemunha			REAC ESCROTAL SACRIFICADA LESÕES TYPICAS
1094	Testemunha			† LESÕES TYPICAS

Valor protector da vaccina contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas (vaccina de Parker) em relação ao "typho exanthematico" de S. Paulo (*)

Em 13-VII-933 foi iniciada a vaccinação, com a vaccina de Parker, de 10 cobaias. Em 5 foi inoculado, nesse dia, por via sub-cutanea, uma dose de 1 cc.; decorridos 12 dias, as 5 cobaias e 2 testemunhas foram inoculadas com o virus do "typho exanthematico de S. Paulo" (emulsão de cerebro da cobaia N.º 1173). As 5 vaccinadas e uma das testemunhas (N.º 1190) foram inoculadas com emulsão de cerebro e a outra testemunha, com sangue da mesma cobaia, 3 dias antes.

As 5 restantes receberam, depois de 5 dias, em 18-VII-933, nova inoculação sub-cutanea de 2 cc. da mesma vaccina. Decorridos 16 dias, todas e 1 cobaia testemunha foram inoculadas com o virus do "typho" de S. Paulo (emulsão de cerebro da cobaia N.º 1195); a outra testemunha (N.º 1203) foi inoculada, no mesmo dia, com sangue da que forneceu a emulsão de cerebro.

Resultados com 1 dose da vaccina (Quadro III) — Das 5 cobaias vaccinadas com uma só dose da vaccina contra a febre maculosa e inoculadas, depois de 12 dias, com o virus de S. Paulo, 1 (N.º 1158) apresentou reacção febril

QUADRO III

IMMUNIZAÇÃO DE COBAIAS COM 1 DOSE DE VACCINA PREPARADA COM *DERMACENTOR ANDERSONI* INFECTADOS COM O VIRUS DA FEBRE MACULOSA DAS MONT. ROCH. (VACCINA DE PARKER N. 1740). RESULTADO DA PROVA DE IMMUNIDADE EM RELAÇÃO AO VIRUS DO "TYPHO EXANTH.º" DE S. PAULO.

N.º da Cobaia	Doses da vaccina 1.ª	2.ª	Dias decorridos	Resultado da inoculação do virus — Dias 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
1157	1cc	–	12	C 40 / 39 / 38 — FIM DA OBS.
1158	1cc	–	12	40 / 39 / 38 — FIM DA OBS.
1159	1cc	–	12	40 / 39 / 38 — FIM DA OBS.
1160	1cc	–	12	40 / 39 / 38 — FIM DA OBS.
1161	1cc	–	12	40 / 39 / 38 — FIM DA OBS.
1182	Testemunha			41 / 40 / 39 / 38 — ↓REAC. ESCROTAL + LESÕES TYPICAS
1190	Testemunha			41 / 40 / 39 / 38 — † LESÕES TYPICAS

(*) Deixamos aqui consignados os nossos maiores agradecimentos aos drs. R. R. Parker, de Hamilton, McCoy e R. E. Dyer, de Washington (National Institute of Health), que nos forneceram diversas partidas da vaccina contra a febre maculosa, tornando possiveis as experiencias descriptas, assim como a immunização de varias pessoas entre nós.

de 40°0 durante 3 dias, resistindo á infecção; não apresentou reacção escrotal, parecendo ter sido pequena a immunidade conferida, que apenas protegeu da morte, a se julgar pelas duas testemunhas. Duas outras (N.os 1157 e 1160), apresentaram uma curva thermica pouco nitida, não ultrapassando 39°5, porém acima da media normal dos animaes. As 2 restantes (N.os 1159 e 1161) apresentaram maior immunidade, não reagindo á inoculação. As 2 cobaias testemunhas apresentaram reacção caracteristica, inclusive reacção escrotal em uma, morrendo ambas como consequencia da inoculação do virus. O quadro III mostra os resultados desta experiencia.

Resultados com 2 doses da vaccina (Quadro IV) — As 5 cobaias vaccinadas com 2 doses da vaccina de Parker e inoculadas, após 16 dias, com o virus de S. Paulo, nenhuma reacção apresentaram, não se lhes modificando a temperatura da media normal, enquanto que as 2 testemunhas apresentaram reacção caracteristica, morrendo ambas como consequencia da infecção.

O quadro IV mostra os resultados desta serie.

QUADRO IV

IMMUNIZAÇÃO DE COBAIAS COM 2 DOSES DE VACCINA PREPARADA COM *DERMACENTOR ANDERSONI* INFECTADOS COM O VIRUS DA FEBRE MACULOSA DAS MONT. ROCH (VACCINA DE PARKER N.º 1240). RESULTADO DA PROVA DE IMMUNIDADE EM RELAÇÃO AO VIRUS DO "TYPHO EXANTH.º" DE S. PAULO.

N.º da Cobaia	Doses da vaccina 1.ª	Doses da vaccina 2.ª	Dias decorridos	Resultado da inoculação do virus
1162	1 cc.	2 cc.	16	C 40 39 38 — FIM DA OBS.
1163	1 cc.	2 cc.	16	40 39 38 — FIM DA OBS.
1164	1 cc.	2 cc.	16	40 39 38 — FIM DA OBS.
1165	1 cc.	2 cc.	16	40 39 38 — FIM DA OBS.
1166	1 cc	2 cc.	16	40 39 38 — FIM DA OBS.
1205	Testemunha			41 40 39 38 — ↓ SANGRIA PARA PASSAGEM E SACRIFICADA. LESÕES TYPICAS
1204	Testemunha			41 40 39 38 — † LESÕES TYPICAS

Provas de immunidade cruzada entre os dois virus; novas experiencias

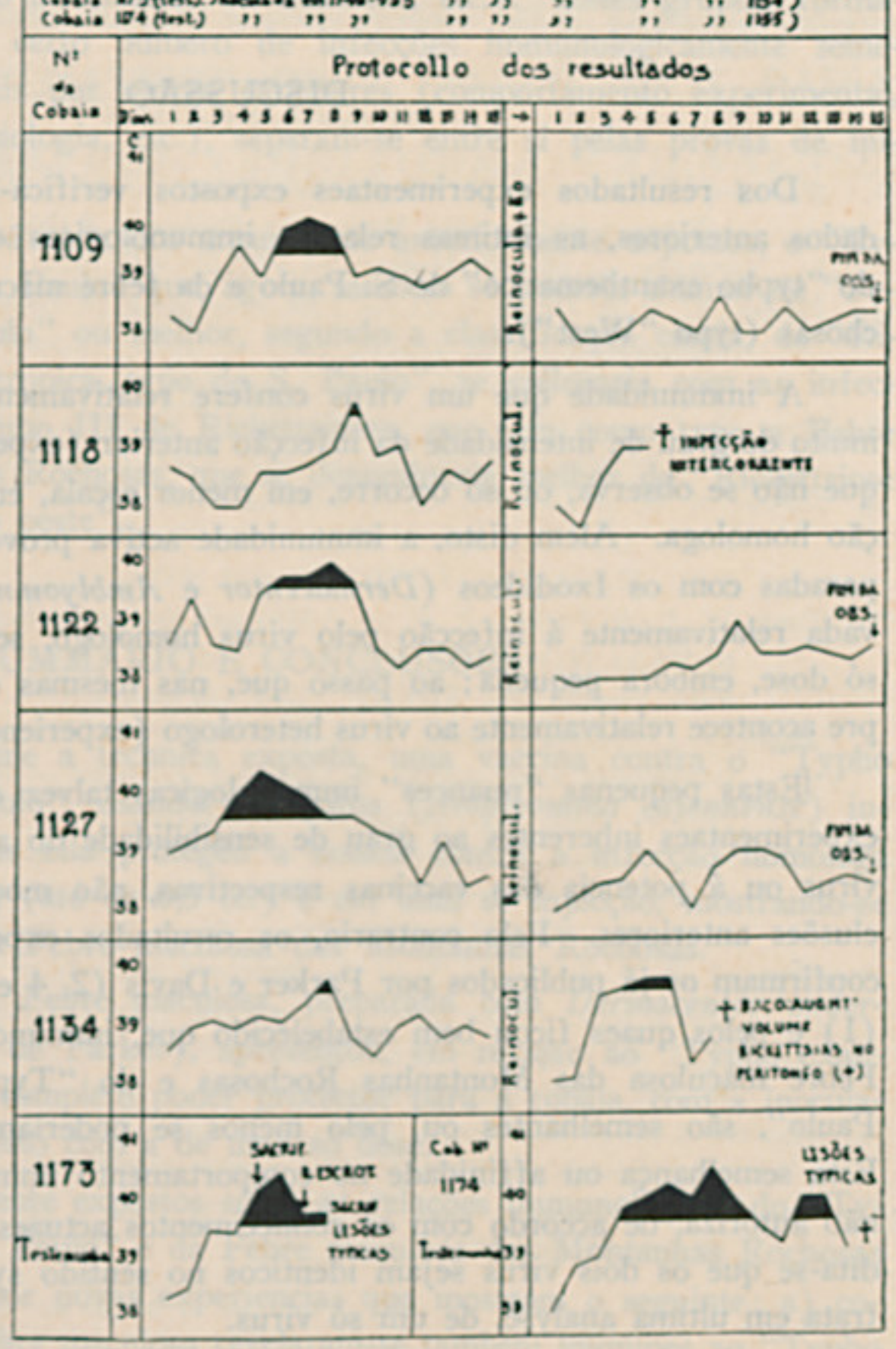
No nosso citado trabalho anterior (1) descrevémos os resultados de provas de immunização cruzada entre os virus de S. Paulo e da febre maculosa. Verifica-se por elles que cobaias que resistiram á infecção pelo virus de S. Paulo, após terem tido reacção febril caracteristica, não reagiam á inoculação do virus da febre maculosa. O facto ficou demonstra-

do com virus de S. Paulo proveniente originariamente de doentes e mantido por passagem em cobaias e com o mesmo virus, passado previamente pelo *Amblyomma cajennense* e reisolado.

Acrescentamos agora alguns resultados obtidos em sentido inverso, isto é, da reinoculação do nosso virus em cobaias que haviam resistido á infecção pelo virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas. Nesta nova serie de experiencias foram utilizadas 5 cobaias que haviam resistido á infecção pelo virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, sendo que 3 haviam tido reacção febril mais ou menos caracteristica. Decorridos 30 a 45 dias foram reinoculadas com o virus do "typho" de S. Paulo, sendo empregada uma emulsão de cerebro de 2 cobaias infectadas com as 2 amostras que mantemos em nosso laboratorio: virus L, da 140ª. passagem (cobaia N.° 1155) e virus W, da 64ª, passagem (cobaia N.° 1154). Como testemunhas foram inoculadas 2 cobaias com as respectivas amostras do nosso virus.

QUADRO-V

RESULTADOS DAS PROVAS DE IMMUNIDADE CRUZADA DE COBAIAS QUE RESISTIRAM Á INFECÇÃO PELO VIRUS DA FEBRE MACULOSA DAS MONT. ROCHOSAS EM RELAÇÃO AO VIRUS DO "TYPHO EXANT." DE S. PAULO.



Resultados (Quadro V) — As 3 cobaias (N.os 1109, 1122 e 1127) que reagiram ao virus da febre maculosa com reacção febril mais ou menos caracteristica, não apresentaram, após a inoculação do virus de S. Paulo, reacção febril

ou outro signal de infecção, mostrando-se immunizadas. Outra cobaia (N.º 1118) que teve ligeira a primeira infecção, sendo reinoculada, amanheceu morta no 6.º dia, talvez devido a infecção intercorrente. A 5.ª cobaia que apresentou infecção ligeira (39º8) após a inoculação do virus da febre maculosa, não se mostrou completamente immunizada quando reinoculada, após 30 dias, com o virus de S. Paulo, tendo tido infecção ligeira a julgar pela intensidade da reacção febril, morrendo porem na noite do 8.º para o 9.º dia e apresentando baço augmentado de volume, exsudato peritoneal e presença de rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal.

As cobaias testemunhas (N.os 1173 e 1174) apresentaram infecção caracteristica com passagens positivas do virus.

Estes resultados são consignados no quadro V.

DISCUSSÃO

Dos resultados experimentaes expostos verifica-se, em confirmação aos dados anteriores, as intimas relações immunologicas existentes entre os virus do "typho exanthematico" de S. Paulo e da febre maculosa das Montanhas Rochosas (typo "West").

A immunidade que um virus confere relativamente ao outro depende em muito do grau de intensidade da infecção anterior (experiencias do quadro V), o que não se observa, ou só occorre, em menor escala, em se tratando de reinfecção homologa. Alem disto, a immunidade activa provocada pelas vaccinas preparadas com os Ixodideos (*Dermacentor* e *Amblyomma*), se mostra mais elevada relativamente á infecção pelo virus homologo, sendo conferida após uma só dose, embora pequena; ao passo que, nas mesmas condições, isto nem sempre acontece relativamente ao virus heterologo (experiencias dos quadros I e III).

Estas pequenas "nuances" immunologicas talvez explicaveis por condições experimentaes inherentes ao grau de sensibilidade do animal e á actividade dos virus ou á potencia das vaccinas respectivas, não modificam, todavia, as conclusões anteriores. Pelo contrario, os resultados experimentaes aqui expostos confirmam os já publicados por Parker e Davis (2, 4 e 5), Dyer (3) e por nós (1) e pelos quaes ficou bem estabelecido que, immunologicamente, os virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas e do "Typho exanthematico de S. Paulo", são semelhantes ou, pelo menos se poderiam dizer muito proximos. Esta semelhança ou affinidade no comportamento immunologico, por enquanto, não autoriza, de accordo com os conhecimentos actuaes sobre o assumpto, acredita-se que os dois virus sejam identicos no sentido systematico, isto é, que se trata em ultima analyse, de um só virus.

Discutimos já este assumpto (1), achando que a prova de immunidade cruzada nas infecções que constituem a familia typho-exanthematica ou Rickettsioses serve somente para reunir certo numero de modalidades nosologicas em determinados grupos, sendo insufficiente para a distincção das modalidades de um mesmo grupo. E' o que acontece com as infecções que se collocam em cada um dos 4 grupos, mais ou menos definidos, que constituem as "Rickettsioses", segundo a classificação suggerida por Amaral e Monteiro (9 e 10): grupo I, que tem como infecção typo a Rickettsiose oriental, typo japonês (Tsutsugamushi); grupo II, cuja infecção typo é a Rickettsiose tropical, typo Malayo, constituindo um grupo intermediario; grupo III, cuja infecção typo é a Rickettsiose maculosa nearctica, typo oeste (Febre maculosa das Montanhas Rochosas); grupo IV, tendo como infecção typo a Rickettsiose major (Typho exanthematico epidemico ou classico ou historico, etc.). Estes grupos, formados cada um por um certo numero de infecções immunologicamente semelhantes, mas distinguiveis por outros caracteres (comportamento experimental, histo-pathologia, epidemiologia, etc.), separam-se entre si pelas provas de immunidade cruzada.

Nestas condições e á vista dos argumentos anteriormente expostos, o "Typho exanthematico de S. Paulo" que, agora, tambem se poderia chamar de "Febre maculosa de S. Paulo" ou melhor, segundo a classificação citada, de "Rickettsiose maculosa neotropica, typo de S. Paulo", se collocaria com as infecções pertencentes ao grupo III de Rickettsioses, que tem como typo a Febre maculosa das Montanhas Rochosas, que se denominaria melhor de "Rickettsiose maculosa nearctica, typo oeste".

SUMMARIO E CONCLUSÕES

Preparando, conforme a technica exposta, uma vaccina contra o "Typho exanthematico de S. Paulo", usando carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados, verificámos que ella protegeu a cobaia contra a infecção homologa mesmo em pequena dose (até de 0,5 cc.) e em uma só injecção, mostrando-se tambem efficaz contra a Febre maculosa das Montanhas Rochosas.

A vaccina contra a Febre maculosa, preparada com *Dermacentor andersoni* infectados (vaccina de Parker), apresentou, em relação ao "Typho exanthematico de S. Paulo", completo poder protector para a cobaia, com a inoculação de 2 doses e incompleto com a de uma só dose.

Os factos anteriormente expostos sobre as relações immunologicas do "Typho exanthematico de S. Paulo" e da Febre maculosa das Montanhas Rochosas são agora corroborados por novas experiencias que mostram o seguinte: a) cobaias que resistiram á Febre maculosa revelaram-se tambem immunes ao "Typho

de S. Paulo"; b) o grau de immunidade adquirida parece estar em relação com a intensidade da primeira infecção.

ABSTRACT

A single dose of a tick vaccine for the S. P. spotted fever has completely protected guinea-pigs against not only the specific infection but the R. M. spotted fever as well; a single dose of a tick vaccine for the R. M. spotted fever (Parker's vaccine) has incompletely protected guinea-pigs against the S. P. spotted fever, their complete protection being obtained only when two doses of it were given.

Guinea-pigs immunized against the R. M. spotted fever have proved to be immune to the S. P. spotted fever, the degree of their acquired immunity apparently depending on the severity of their original infection.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos* — O "Typho exanthematico de S. Paulo" e suas relações com a Febre maculosa das Montanhas Rochosas, á luz das provas de immunidade cruzada — Brasil Medico XLVII(25) :437.1933.
2. *Parker, R. R. & Davis, G. E.* — Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Moutain Spotted Fever — U. S. Publ. Health Rep. XLVIII(19) :501.1933.
3. *Dyer, R. E.* — Relationship between Rocky Mountain Spotted Fever and "Exanthematic typhus of S. Paulo" — U. S. Publ. Health Rep.XLVIII(20) :521.1933.
4. *Parker, R. R. & Davis, G. E.* — Further studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain Spotted Fever and São Paulo exanthematic typhus — U. S. Publ . Health Rep. XLVIII(29) :839.1933.
5. *Davis, G. E. & Parker, R. R.* — Additional studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain Spotted Fever and São Paulo exanthematic typhus — U. S. Publ. Health Rep. XLVIII .1933 (in press).
6. *Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A.* — Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus por *Ixodidae* — Brasil Medico XLVI(3) :49. 1932 *et* Mem. Inst. Butantan VI:139.1931.
7. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da* — Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*) — Brasil Medico XLVI(48) :993.1932 *et* Mem. Inst. Butantan VII :35.1932.
8. *Spencer, R. R. & Parker R. R.* — Improved methods of manufacture of the vaccine and a study of its properties — Hyg. Lab. Bulletin (154) :63.1930.
9. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Ensaio de classificação das Rickettsioses á luz dos nossos actuaes conhecimentos — Mem. Inst. Butantan VII :349.1932.
10. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Historia Natural e Classificação das Rickettsioses. Posição systematica do "Typho exanthematico de S. Paulo" — Apres. ao 2.º Congresso Med. Paulista, Nov. 1933 *et* Rev. Sud-Amér. Méd. & Chir. IV(11) :781-817.1933.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado ao 2.º Congresso Medico Paulista em novembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934).

COMPORTAMENTO EXPERIMENTAL DO VIRUS DO "TYPHO EXANTHEMATICO" DE S. PAULO APÓS PASSAGEM PELO CARRAPATO (*AMBLYOMMA CAJENNENSE*)

POR

J. LEMOS MONTEIRO

(*com* 12 *graphicos e* 2 *photographias no texto*)

614.526:614.43.+616.9685

COMPORTAMENTO EXPERIMENTAL DO VIRUS DO "TYPHO EXANTHEMATICO" DE S. PAULO APÓS PASSAGEM PELO CARRAPATO (*AMBLYOMMA CAJENNENSE*)

POR

J. LEMOS MONTEIRO

Em trabalhos anteriores publicámos, juntamente com Fonseca e Prado (1) e Fonseca (2), os resultados de estudos sobre a transmissão experimental do "typho exanthematico" de S. Paulo por meio de carrapatos. Pela propria epidemiologia da infecção e pelas observações experimentaes que apresentámos, o papel possivelmente representado pelo carrapato *Amblyomma cajennense,* como transmissor do virus na natureza muito se evidencia, visto este Ixodideo poder transmittir a infecção pela picada, alguns dias após a alimentação em cobaias infectadas, e ser ella "hereditaria", no sentido de ser transmissivel á futura geração de carrapatos.

Neste trabalho mostraremos os resultados da transmissibilidade do virus por novos lotes de *Amblyomma cajennense* infectados, confirmando aquelles nossos primeiros resultados; mostraremos tambem o comportamento experimental do "virus" reisolado dos carrapatos e suas relações com o "virus" de passagem, original de doentes, por nós já estudado (3).

Technica e methodo de estudo

Amblyomma cajennense, adultos, de preferencia femeas, colhidos em cavallos do Instituto, eram postos a sugar, em lotes de cerca de 20 exemplares, em cobaias infectadas, desde o 1.º ou 2.º dia de reacção febril e durante 3 a 4 dias. Os exemplares que se desprendiam depois de cheios eram colhidos e collocados em tubos separados e rotulados com as indicações precisas. No fim daquelle prazo, os exemplares ainda seguros eram tambem retirados e collocados em tubos, com as respectivas indicações. Os exemplares mais cheios, devido

ao desenvolvimento dos ovos após a alimentação eram separados, em tubos aparte, para postura e desenvolvimento das larvas respectivas. Para a alimentação infectante, os carrapatos eram postos a sugar directamente sobre a cobaia, protegidos das mordidas do animal por uma especie de canga de papelão, como mostra a figura 1, technica que exige muita paciencia e muito cuidado (principalmente si se tratar de exemplares já anteriormente infectados); ou então segundo o methodo usado no Rocky Mountain Spotted Fever Laboratory, em Hamilton. A figura 2 que reproduzimos de photographias que nos foram gentilmente enviadas por Parker, mostra uma cobaia na qual carrapatos estão sendo alimentados pelo dispositivo que adopta e que tambem empregamos com exito para alimentação e infecção de *Amblyomma*.

Após differentes periodos, exemplares dos diversos lotes infectados eram fixados para posterior inclusão e cortes destinados a pesquisa e localização das Rickettsias. Outros eram postos a sugar cobaias normaes, afim de transmittir o virus por picada e os restantes, emulsionados (após conveniente lavagem) em agua physiologica e inoculados em cobaias normaes.

As reacções dos animaes eram observadas (temperatura diaria, reacção escrotal, etc.) e feitas passagens do virus pela sangria durante a reacção febril e inoculação do sangue a novas cobaias ou pela inoculação de emulsão de seu cerebro após sacrificio. As que resistiam á infecção, eram reinoculadas, após certo periodo, com o virus de passagem, original de doentes, para prova de immunidade e comparação dos virus.

Um *Amblyomma* (♀) do lote XI que, depois de infectado, tornou a sugar nova cobaia e desovou no fim de 30 dias após a alimentação infectante. trouxe nova confirmação de transmissão do virus á sua progenie, visto os ovos, após inoculação, se terem mostrado infectantes. Ovos provenientes de desova feita após somente 8 ou 10 dias da alimentação infectante, portanto já preformados naquella occasião. não se mostraram infectantes após a inoculação.

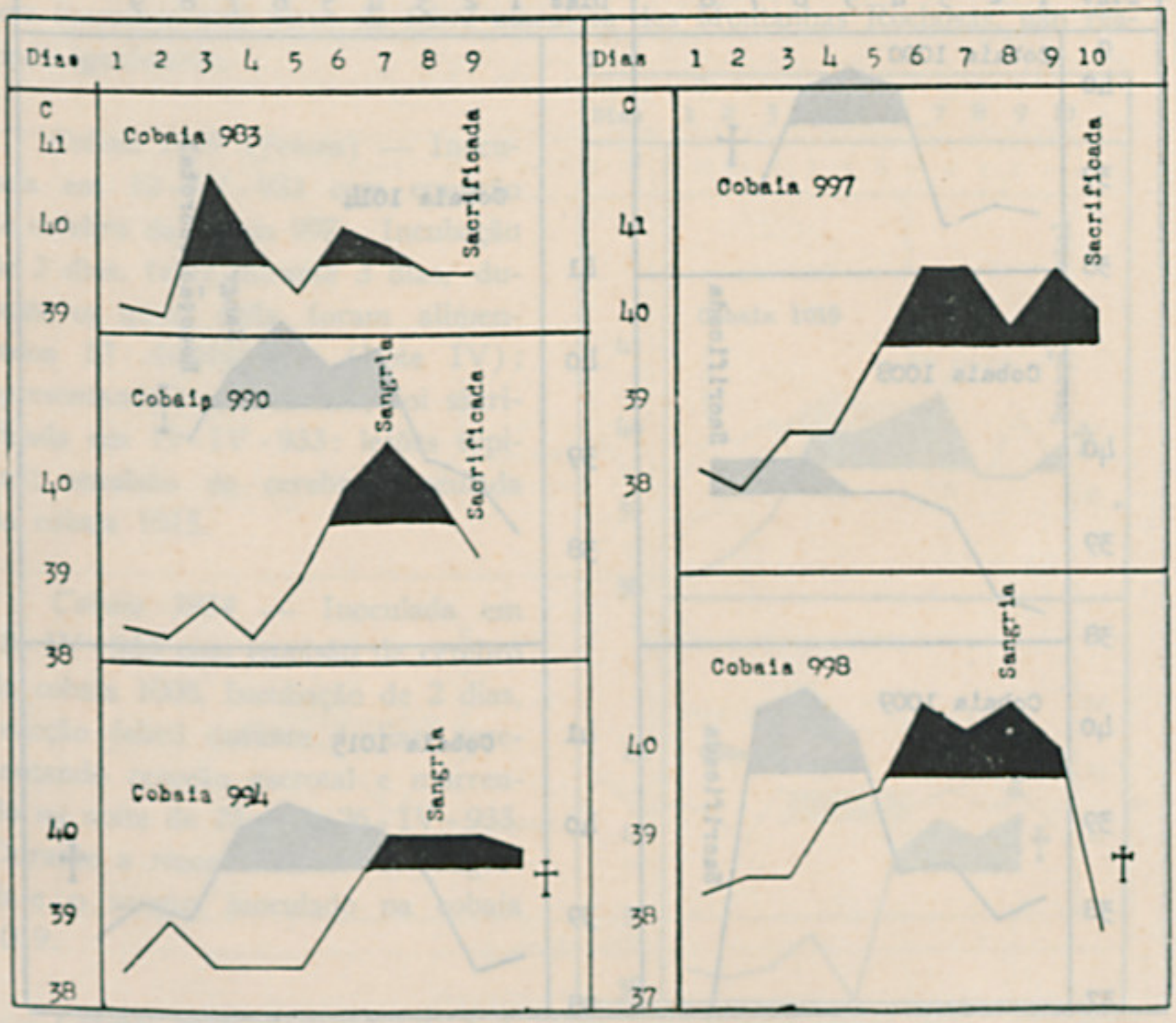
Resultados das experiencias

Os resultados das experiencias referidas são resumidos nos protocollos seguintes e respectivos graphicos.

Amblyomma Lote IXa (graphicos 1, 2 e 3):

Cobaia 983 (femea) — Inoculada em 21-III-933 com emulsão de 1 ♀ que, 5 dias antes, terminava a alimentação (de 13 a 16-III-933) na cobaia 967, infectada. No 2.º dia a temperatura se elevou a 40º5, o que se pode attribuir a influencia do material inoculado, descendo a seguir para se elevar durante 2

dias (40° e 39°8), nos 5.° e 6.° dias após a inoculação. Durante a reacção (6.° dia) foi sangrada: o sangue inoculado na cobaia 990; no 8.° dia foi sacrificada, verificando-se augmento do baço, sendo inoculada emulsão de cerebro na cobaia 994.

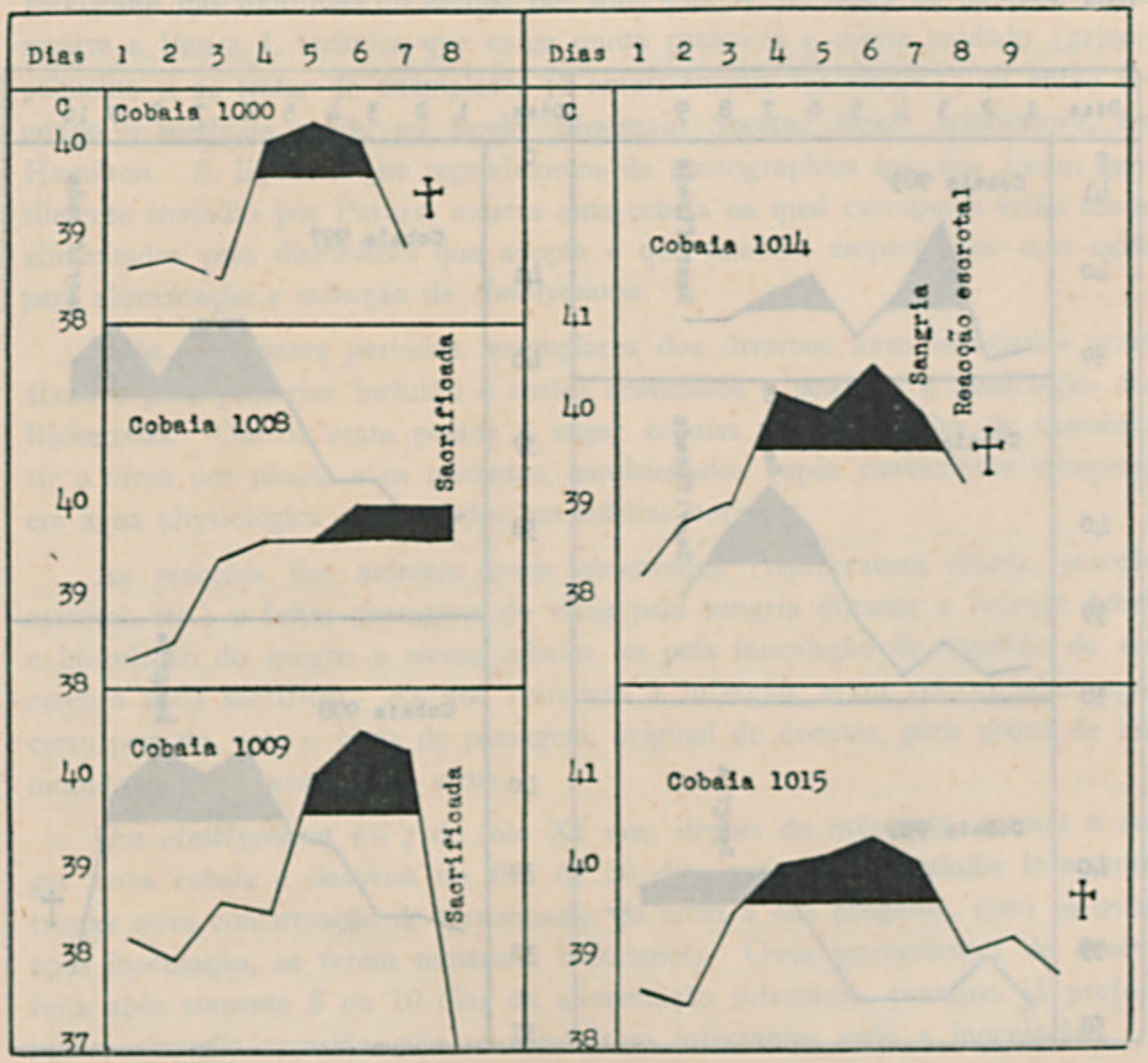


Graphico 1

Cobaia 990 (*femea*) — Inoculada em 28 - III - 933 com 1 cc. de sangue da cobaia 983. Reacção febril caracteristica após incubação de 5 dias. No 2.° dia de reacção febril foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 997; sacrificada no 4.° dia de reacção febril, mostrou lesões typicas, sendo inoculada emulsão de cerebro na cobaia 1000.

Cobaia 994 (*femea*) — Inoculada em 29 - III - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 983. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite de 6 para 7 - IV - 933. No 2.° dia de reacção febril foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 998.

Cobaia 997 (*femea*) — Inoculada em 4-IV-933 com 1 cc. de sangue da cobaia 990. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 4 dias, sendo sacrificada. Lesões typicas, emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1009.



Graphico 2

Cobaia 998 (*femea*) — Inoculada em 4-IV-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 994. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 4 dias e morte durante a noite de 13 para 14-IV-933. No 3.º dia de reacção febril foi sangrada e com o sangue inoculada a cobaia 1008.

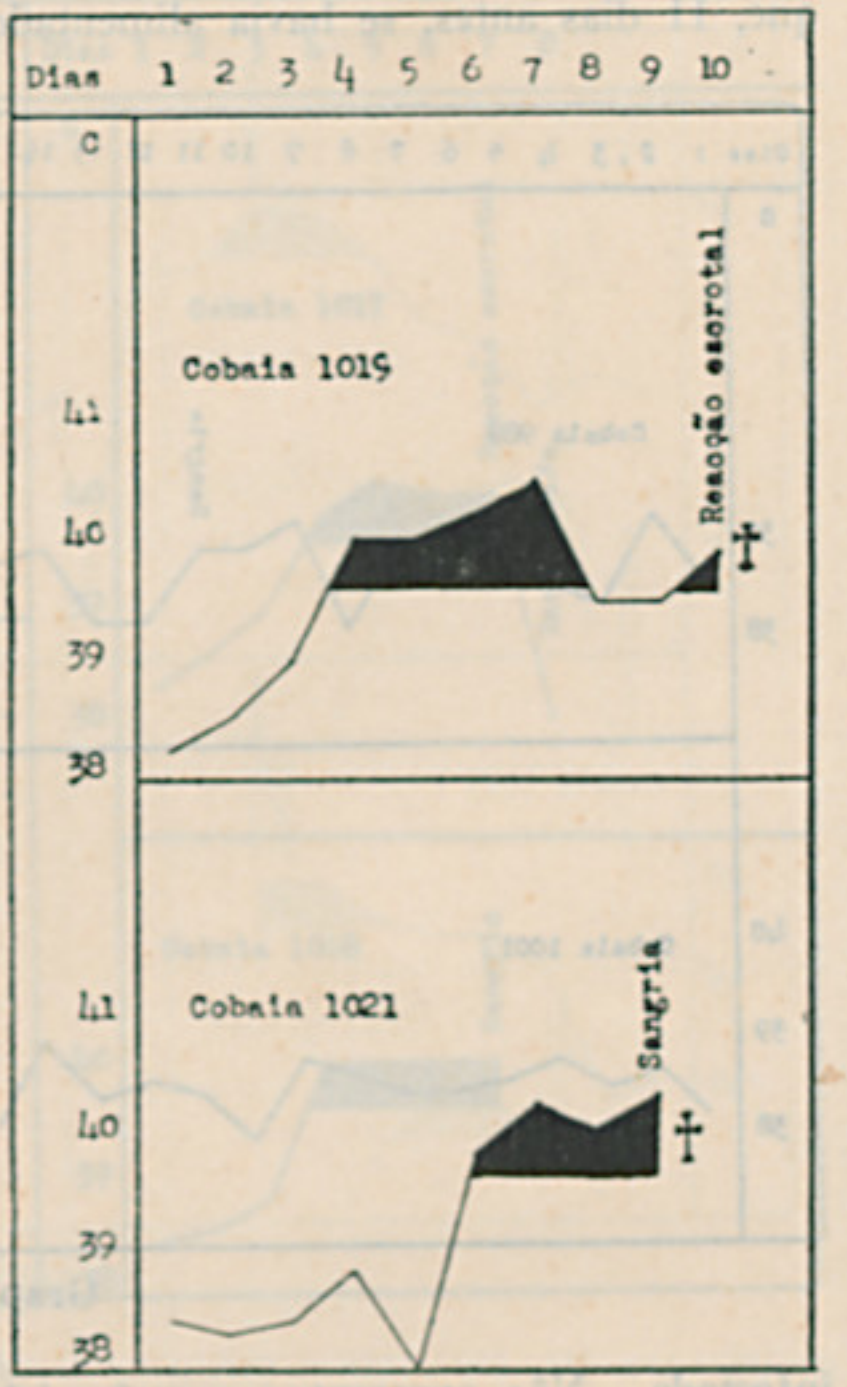
Cobaia 1000 — Inoculada em 6-IV-933 com emulsão de cerebro da cobaia 990. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite de 13 para 14-IV-933.

Cobaia 1008 — Inoculada em 11-IV-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 998. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 5 dias, sendo sacrificada em

18 - IV - 933. Lesões typicas. Emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1014 e na cobaia 986. Esta ultima havia sido inoculada com emulsão de cerebro da cobaia 974, virus de passagem, original de doente, tendo tido infecção caracteristica, mas resistido. Após reinoculação com o virus da cobaia 1008, passado pelo carrapato, não apresentou reacção alguma; posteriormente foi tambem inoculada com virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, não reagindo igualmente.

Cobaia 1009 (*femea*) — Inoculada em 12 - IV - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 997. Incubação de 3 dias, febre durante 3 dias, durante os quaes nella foram alimentados 13 *Amblyomma* (Lote IV); apresentando-se muito mal, foi sacrificada em 19 - IV - 933: lesões typicas; emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1015.

Cobaia 1014 — Inoculada em 18 - IV - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1008. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 4 dias, apresentando reacção escrotal e morrendo na noite de 25 para 26 - IV - 933. Durante a reacção febril foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1019.



Graphico 3

Cobaia 1015 (*femea*) — Inoculada em 19 - IV - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1009. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite de 28 para 29 - IV - 933. Durante a reacção febril foi sangrada, sendo inoculada a cobaia 1021.

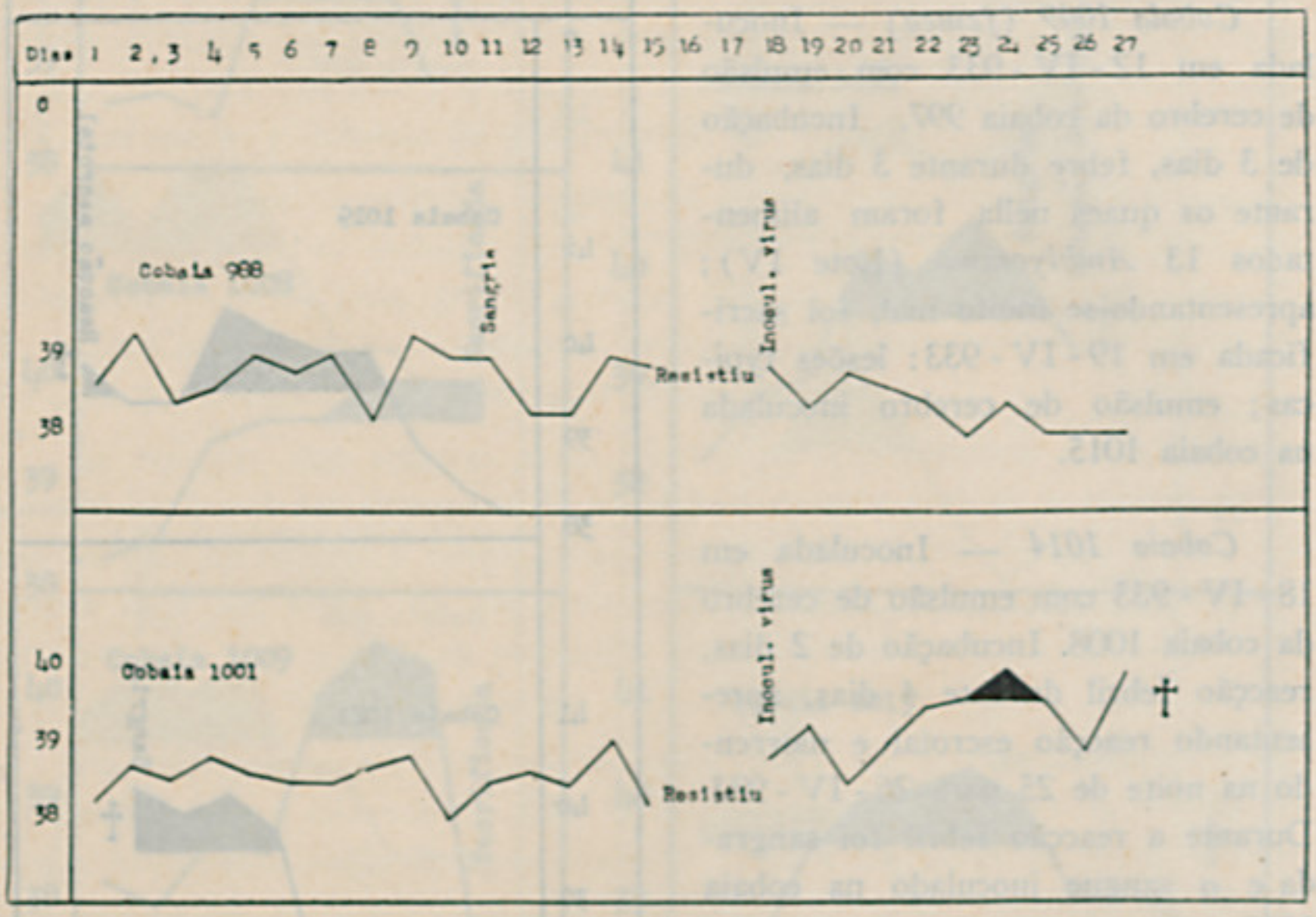
Cobaia 1019 — Inoculada em 24 - IV - 933 com 1 cc. de sangue da cobaia 1014. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 5 dias, apresentando reacção escrotal e morrendo na noite de 3 para 4 - V - 933.

Cobaia 1021 — Inoculada em 25 - IV - 933 com 1 cc. de sangue da cobaia 1015. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 4 dias e morte durante a noite de 3 para 4 - V - 933.

Estes protocollos mostram que o virus isolado do carrapato soffreu, nesta serie, 6 passagens pela cobaia e não provoca reacção na cobaia já immunizada relativamente ao virus original de doente, conservado em cobaia.

Amblyomma Lote IXb (graphico 4):

Cobaia 988 (femea) — Inoculada em 27 - III - 933 com emulsão de 1 ♀ que, 11 dias antes, se havia alimentado (de 13 a 16 - III - 933) na cobaia 967



Graphico 4

infectada. Não apresentou reacção febril caracteristica. No 10.º dia foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1001. Em 2 - V - 933 foi inoculada com virus de passagem (emulsão de cerebro da cobaia 1024), mostrando-se immunizada. Posteriormente, em 23 - V - 933, foi inoculada com virus da febre maculosa, ao qual tambem não reagiu.

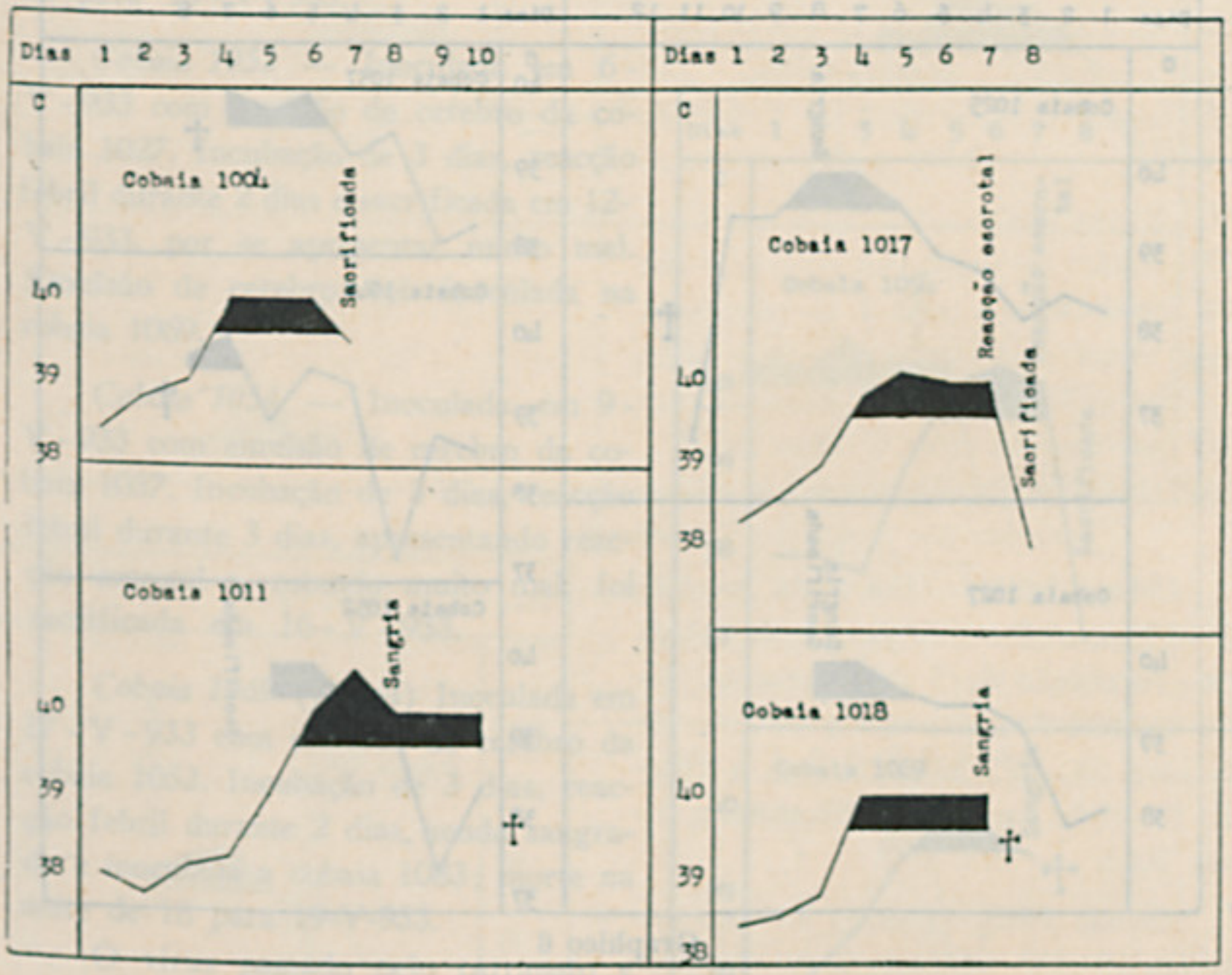
Cobaia 1001 (femea) — Inoculada em 6 - IV - 933 com 3 cc. de sangue da cobaia 988. Não apresentou reacção febril caracteristica, pelo que em 2 - V - 933 foi reinoculada com virus de passagem (emulsão de cerebro da cobaia 1024): apresentou, após incubação de 4 dias, reacção relativamente pouco accentuada, morrendo em 12 - V - 933, com lesões typicas.

Verifica-se, nesta serie, que o virus do carrapato não provocou infecção da primeira cobaia, porém sua immunidade; já na 2.ª passagem, a sua virulen-

cia ou quantidade era mais reduzida e incapaz de determinar mesmo immunidade do animal.

Amblyomma Lote IXc (graphicos 5, 6 e 7):

Cobaia 1004 (*femea*) — Inoculada em 6 - IV - 933 com emulsão de 1 ♀ que, 21 dias antes, se havia alimentado (de 13 a 16 - III - 933) na cobaia 967,



Graphico 5

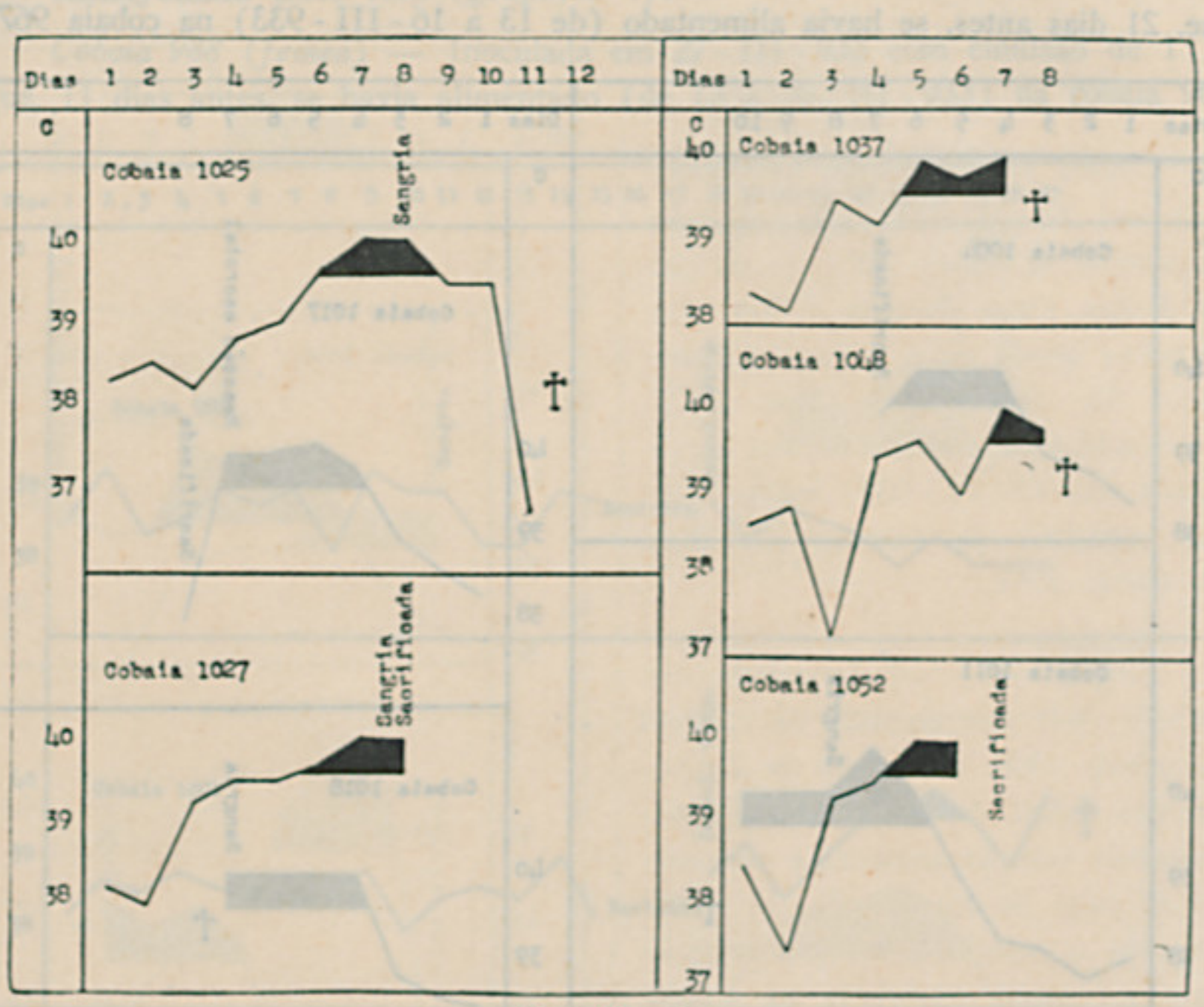
infectada. Após incubação de 2 dias, apresentou reacção febril durante 3 dias, sendo sacrificada em 12 - IV - 933. Verificam-se lesões typicas, sendo a emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1011.

Cobaia 1011 — Inoculada em 12 - IV - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1004. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 5 dias, morrendo na manhã de 22 - IV - 933. Durante a reacção febril foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1017. Na necropsia verificaram-se lesões typicas; as rickettsias, pesquisadas nas cellulas mesotheliaes do peritoneo, mostraram-se abundantes (++++); emulsão de cerebro foi inoculada na cobaia 1018.

Cobaia 1017 — Inoculada em 19 - IV - 933 com 1 cc. de sangue da cobaia 1011. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 4 dias, apresentando reacção

escrotal. Sacrificada em 26 - IV - 933. Rickettsias pesquisadas no peritoneo (+); emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1025.

Cobaia 1018 — Inoculada em 22 - IV - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1011. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite



Graphico 6

de 28 para 29 - IV - 933. Durante a reacção foi sangrada, sendo inoculada com seu sangue a cobaia 1027.

Cobaia 1025 — Inoculada em 26 - IV - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1017. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 3 dias e morte na noite de 6 para 7 - V - 933. Durante a reacção foi sangrada, sendo inoculada a cobaia 1037.

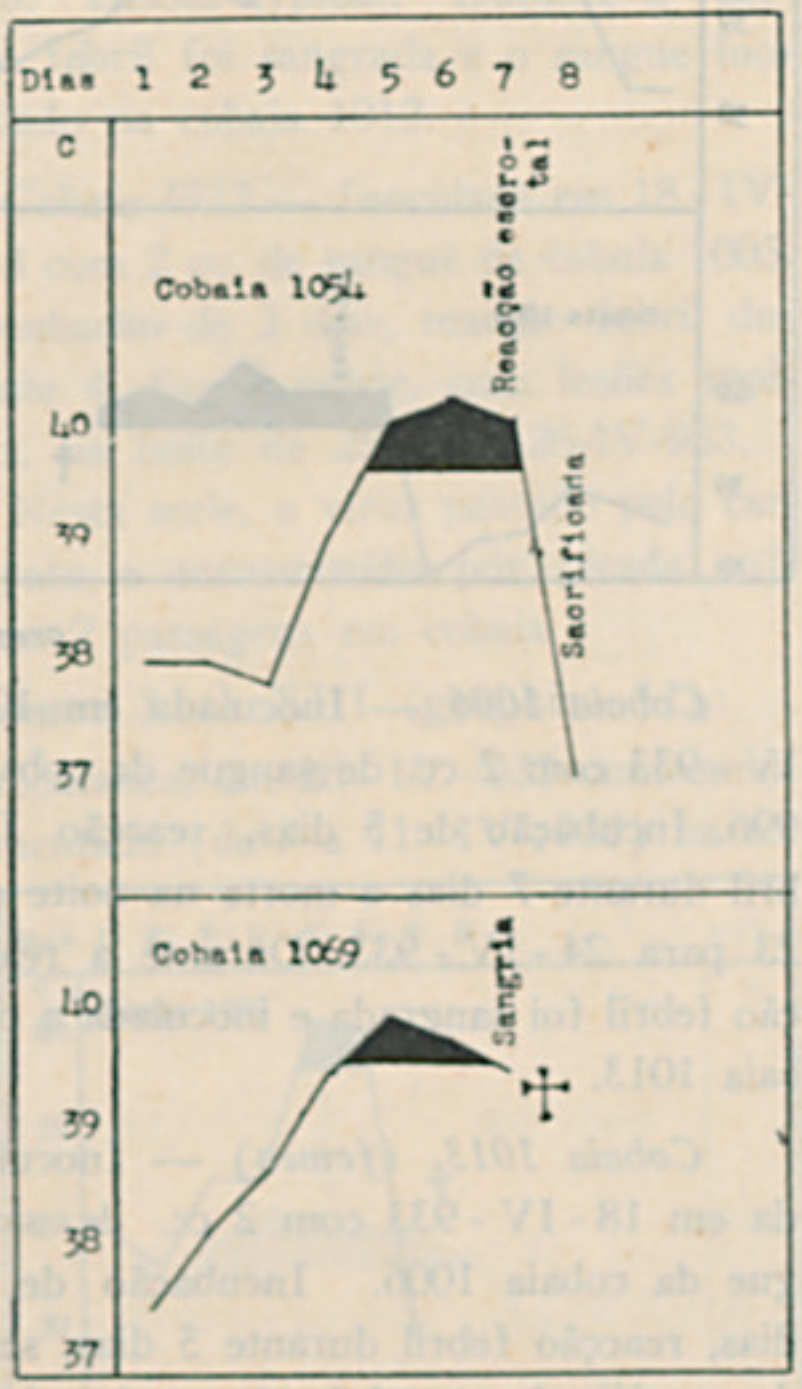
Cobaia 1027 (*femea*) — Inoculada em 28 - IV - 933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1018. Incubação de 4 dias, reacção febril durante 3 dias, sendo sangrada e com o sangue inoculada a cobaia 1048 e sacrificada. Rickettsias pesquisadas no peritoneo mostraram-se abundantes (+++). Emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1052.

Cobaia 1037 (*femea*) — Inoculada em 2 - V - 933 com 2,5 cc. de sangue da

cobaia 1025. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 3 dias e morte na manhã de 9 - V - 933. Rickettsias pesquisadas no peritoneo (+++); emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1054.

Cobaia 1048 — Inoculada em 5 - V - 933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1027. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 3 dias e morte na noite de 12 para 13 - V - 933.

Cobaia 1052 — Inoculada em 6 - V - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1027. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 2 dias e sacrificada em 12 - V - 933, por se apresentar muito mal. Emulsão de cerebro foi inoculada na cobaia 1069.



Graphico 7

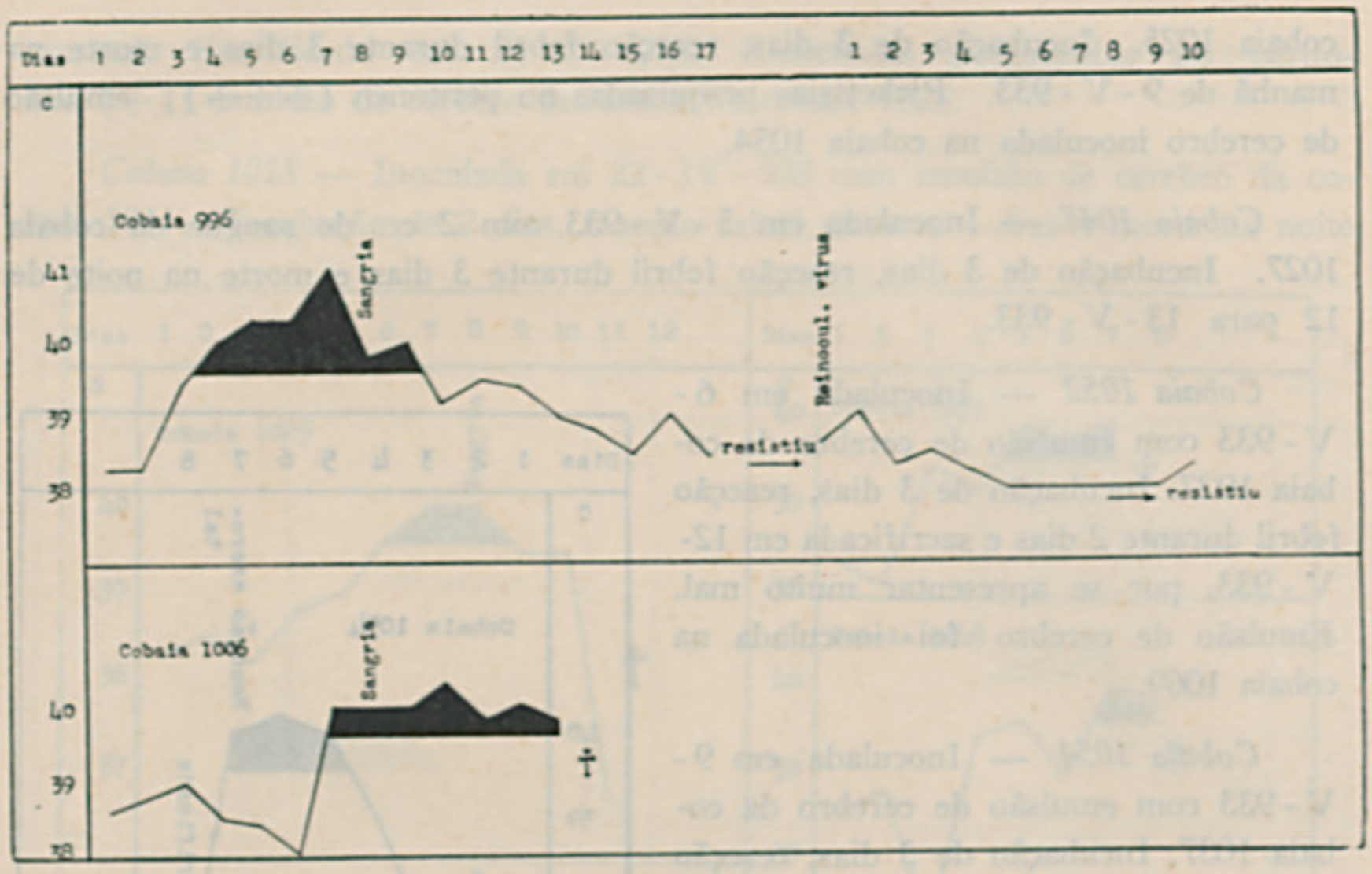
Cobaia 1054 — Inoculada em 9 - V - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1037. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 3 dias, apresentando reacção escrotal e, estando muito mal, foi sacrificada em 16 - V - 933.

Cobaia 1069 (*femea*) Inoculada em 17 - V - 933 com emulsão de cerebro da cobaia 1052. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 2 dias, sendo sangrada e inoculada a cobaia 1083; morte na noite de 18 para 19-V-933.

O virus passado pelo carrapato e reisolado soffreu, nesta serie, 6 passagens pela cobaia.

Amblyomma Lote Xa (graphicos 8 e 9):

Cobaia 996 — Inoculada em 3 - IV - 933 com emulsão de 1 ♀ que, 18 dias antes, havia terminado a alimentação na cobaia 968, infectada. Após incubação de 2 dias, apresentou reacção febril caracteristica durante 6 dias, durante a qual foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1006, resistindo, porém, á infecção. Em 2 - V - 933 foi reinoculada com o virus activo, de passagem (emulsão de cerebro da cobaia 1024), que nenhuma reacção determinou, provando a immunidade do animal. Posteriormente, em 23 - V - 933, se mostrou tambem immune em relação ao virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas.



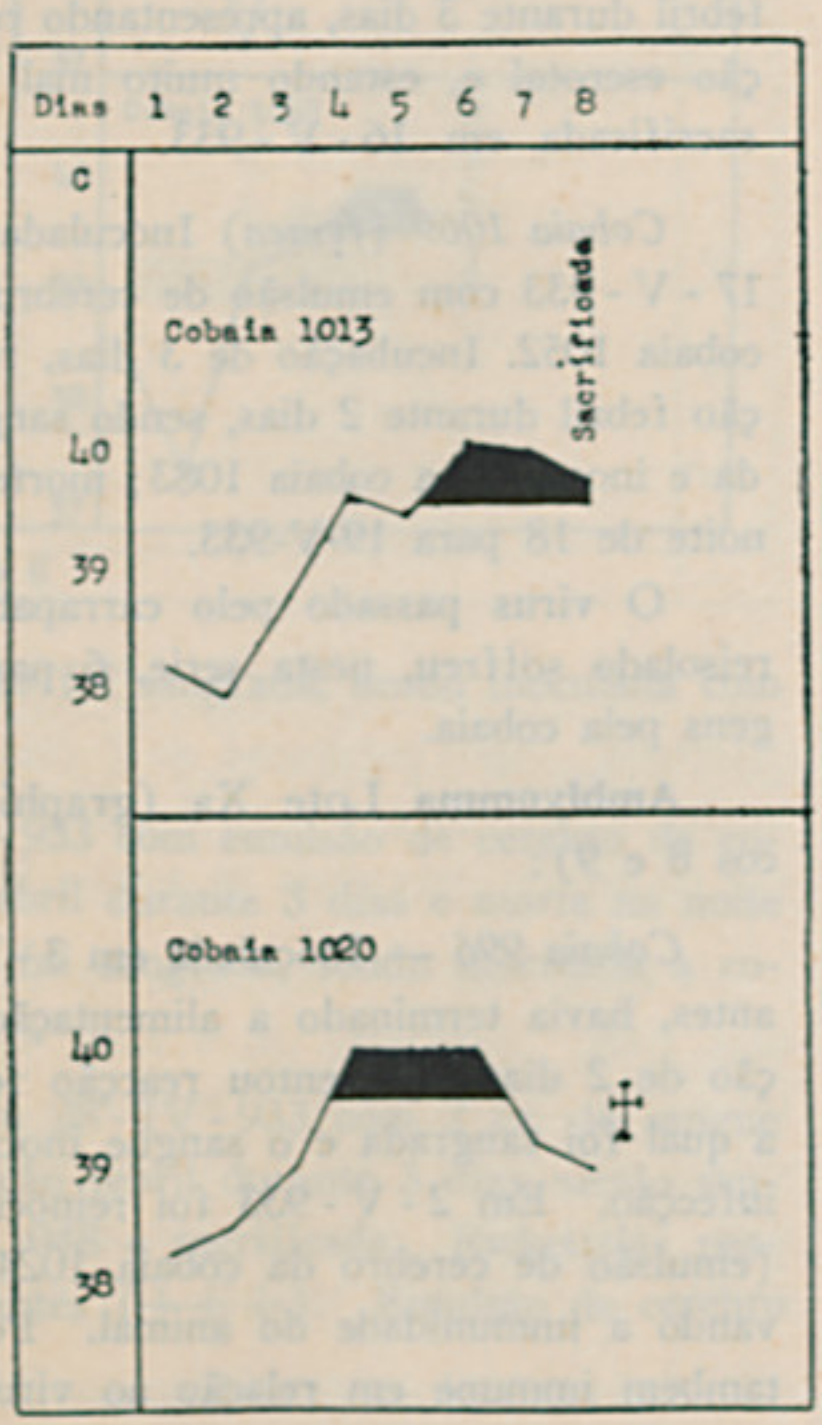
Graphico 8

Cobaia 1006 — Inoculada em 10-IV-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 996. Incubação de 5 dias, reacção febril durante 7 dias e morte na noite de 23 para 24-IV-933. Durante a reacção febril foi sangrada e inoculada a cobaia 1013.

Cobaia 1013 (*femea*) — Inoculada em 18-IV-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1006. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 5 dias, sendo sacrificada; emulsão de cerebro inoculada na cobaia 1020.

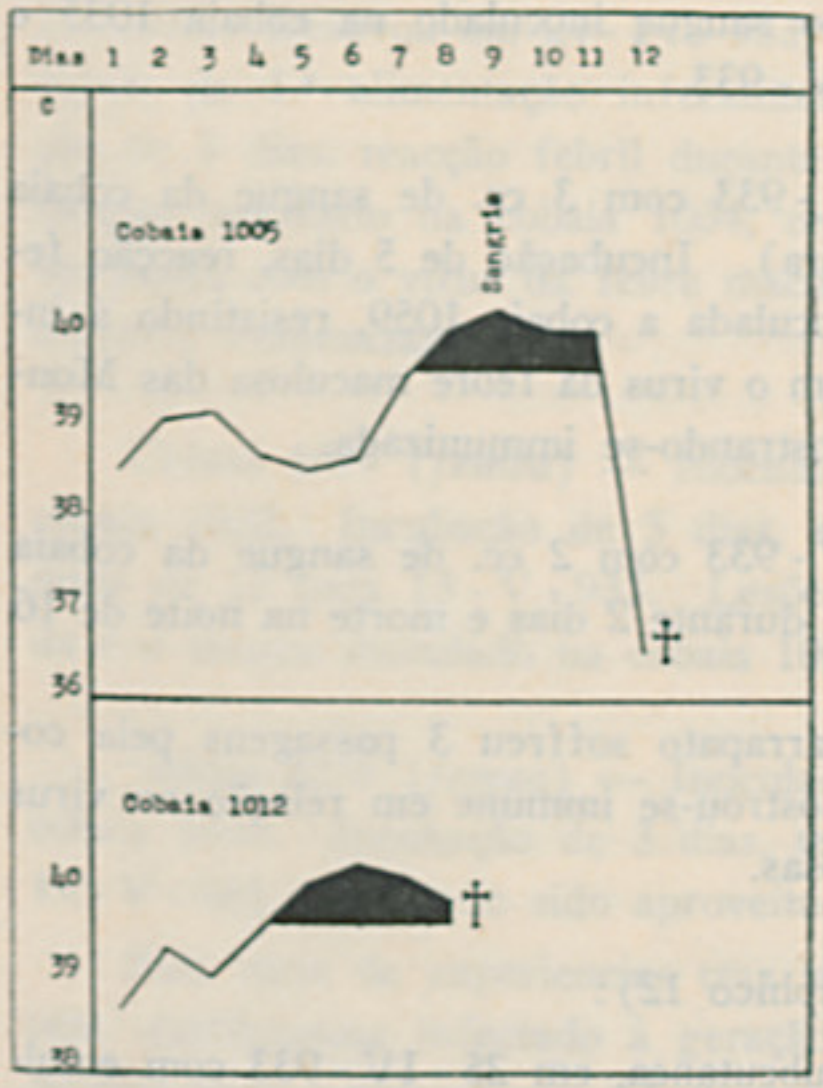
Cobaia 1020 — Inoculada em 25-IV-933 com emulsão de cerebro da cobaia 1013. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite de 3 para 4-V-933.

Nesta serie, o virus do carrapato soffreu 4 passagens pela cobaia, verificando-se que a cobaia a elle immunizado, o é tambem ao virus de passagem, original de doente.



Graphico 9

Amblyomma Lote XI (graphico 10):



Graphico 10

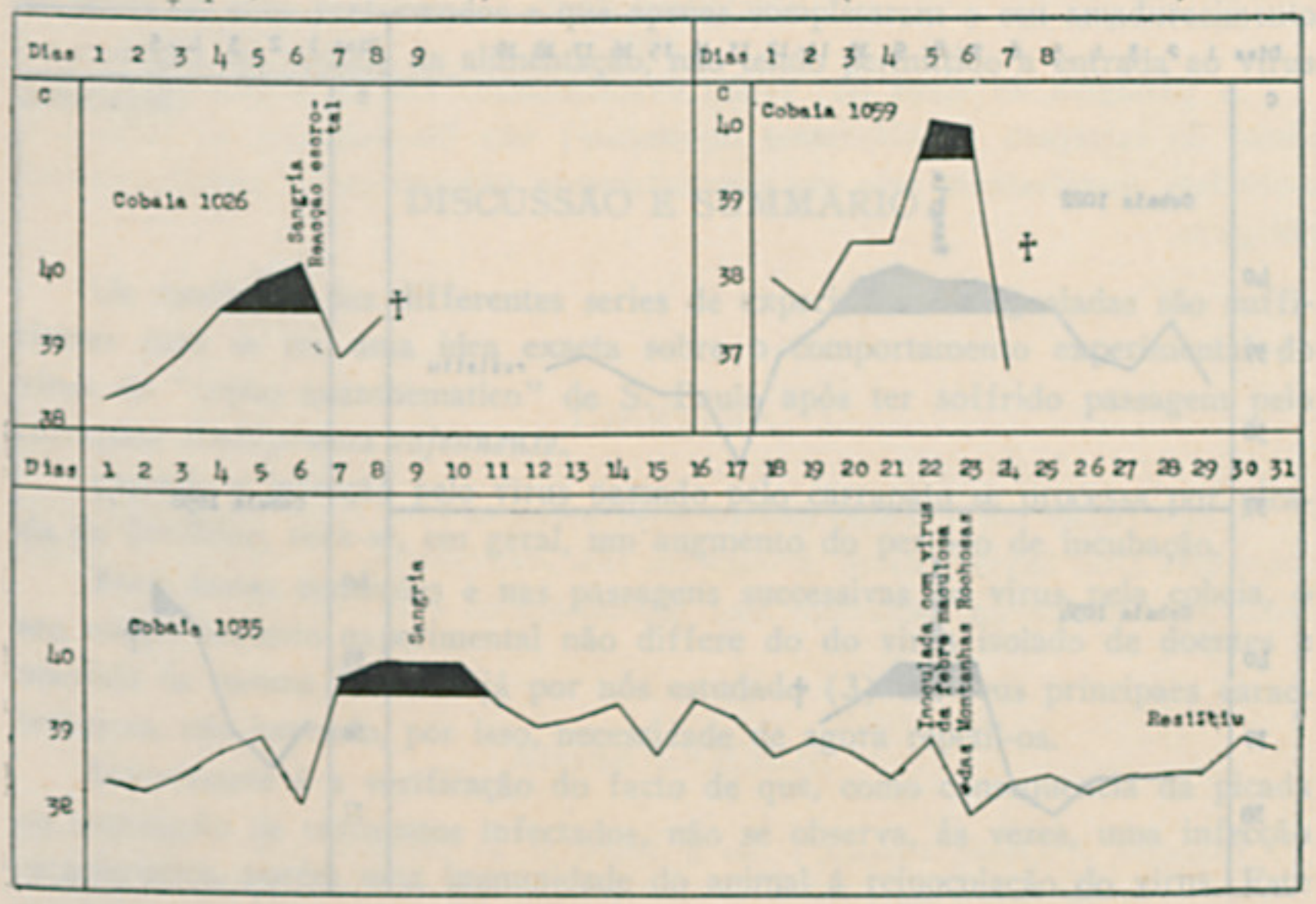
Cobaia 1005 — Picada de 10 a 12-IV-933 por 1 ♀ que, 18 dias antes, se havia alimentado (de 18 a 23-III-933) na cobaia 974, infectada. Incubação de 6 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite de 21 para 22-IV-933. Lesões typicas. Durante a reacção febril foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1012.

Cobaia 1012 — Inoculada em 18-IV-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1005. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 4 dias e morte, com lesões typicas, na noite de 25 para 26-IV-933.

Nesta serie, o virus passado pelo carrapato e transmittido por picada soffreu 2 passagens em cobaia.

Amblyomma Lote XIII (graphico 11):

Cobaia 1026 — Inoculada, por via subcutanea, em 26-IV-933 com emulsão de 1 ♀ que, 15 dias antes, se havia alimentado (de 7 a 11-IV-933) na co-



Graphico 11

baia 999, infectada. Incubação de 2 dias, reacção febril durante 3 dias, tendo tido reacção escrotal, sendo sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1035 e morrendo durante a noite de 3 para 4 - V - 933.

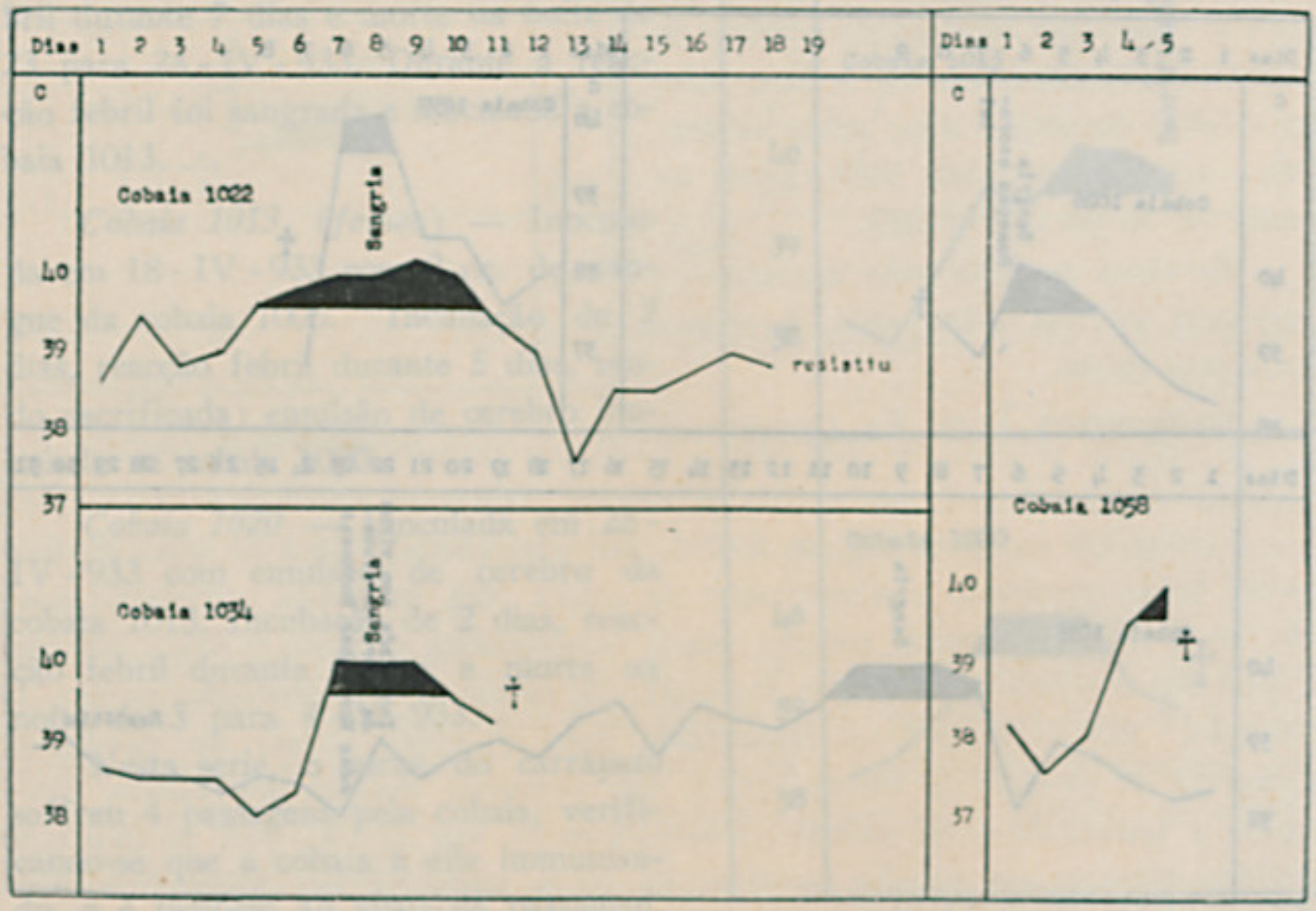
Cobaia 1035 — Inoculada em 2 - V - 933 com 3 cc. de sangue da cobaia 1026 (sangria após a queda da temperatura). Incubação de 5 dias, reacção febril durante 4 dias, sendo sangrada e inoculada a cobaia 1059, resistindo á infecção. Em 23 - V - 933 foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, ao qual não reagiu, mostrando-se immunizada.

Cobaia 1059 — Inoculada em 10 - V - 933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1035. Incubação de 3 dias, reacção febril durante 2 dias e morte na noite de 16 para 17 - V - 933.

Nesta serie, o virus passado pelo carrapato soffreu 3 passagens pela cobaia. Um dos animaes que resistiram mostrou-se immune em relação ao virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Ov. **Amblyomma** XI (*30 dias*) (graphico 12):

Cobaia 1022 — Inoculada, por via subcutanea, em 25 - IV - 933 com emulsão de 20 ovos de 1 *Amblyomma* do Lote XI, infectado na cobaia 974, na qual se alimentou de 18 a 23 - III - 933. A mesma femea se alimentou novamente



Graphico 12

na cobaia 1005, que infectou (experiencia anterior e graphico 10), de 10 a 12-IV-933. Desovou em 24-IV-933, após 10 dias da 2.ª alimentação e 30 dias depois da 1.ª alimentação infectante. Resultado da inoculação: após incubação de 4 dias, reacção febril durante 5 dias, num dos quaes foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1034, resistindo á infecção. Em 15-V-933 foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, ao qual se mostrou immunizada.

Cobaia 1034 (*femea*) — Inoculada em 2-V-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1022. Incubação de 5 dias, reacção febril durante 4 dias e morte na noite de 12 para 13-V-933. Lesões typicas. Durante a reacção foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia 1058.

Cobaia 1058 (*femea*) — Inoculada em 9-V-933 com 2 cc. de sangue da cobaia 1034. Incubação de 3 dias, teve 1 dia de reacção febril, morrendo em 14-V-933, não tendo sido aproveitado material para novas passagens.

Esta serie de experiencias traz nova confirmação da transmissão do virus pelo *Amblyomma* infectado á geração seguinte. Ovos de postura, datando de 30 dias após a alimentação infectante, mostraram-se infectantes.

Em experiencias parallelas, feitas com ovos de postura datando somente de 8 a 10 dias da alimentação infectante, obtivemos resultados negativos, indicando serem os ovos preformados e que apenas completaram o seu amadurecimento ou evolução em virtude da alimentação, não tendo permittido a entrada ao virus infectante.

DISCUSSÃO E SUMMARIO

Os resultados das differentes series de experiencias assignaladas são sufficientes para se ter uma idea exacta sobre o comportamento experimental do virus do "typho exanthematico" de S. Paulo após ter soffrido passagem pelo carrapato *Amblyomma cajennense*.

Quando a infecção pelo virus passado pelo carrapato se processa por picada do Ixodideo, nota-se, em geral, um augmento do periodo de incubação.

Fora destas condições e nas passagens successivas do virus pela cobaia, o seu comportamento experimental não differe do do virus isolado de doentes e mantido da mesma forma e já por nós estudado (3) em seus principaes caracteristicos, não havendo, por isso, necessidade de agora repetil-os.

Interessante é a verificação do facto de que, como consequencia da picada ou inoculação de carrapatos infectados, não se observa, ás vezes, uma infecção caracteristica, porém uma immunidade do animal á reinoculação do virus. Este resultado, estudado com maiores minucias em outro trabalho (4), justifica a

hypothese de que o virus apresenta no organismo do carrapato phases em sua evolução, nem todas infectantes, embora immunizantes, e que a virulencia pode ser adquirida sob certas condições, como acontece com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, no organismo do *Dermacentor andersoni,* de accordo com os estudos de Spencer e Parker (5 e 6).

A não alteração do virus da nossa Rickettsiose após passagem pelo *Amblyomma cajennense,* alem do comportamento experimental já referido, ainda se patenteia pelas provas de immunização cruzada com o virus original de doentes.

Cobaias immunes a este ultimo, o são da mesma forma ao virus do carrapato, o mesmo acontecendo em sentido contrario.

Finalmente, da mesma maneira que o virus original de doente apresenta suas relações immunologicas com o da febre maculosa das Montanhas Rochosas, conforme expusémos em outros trabalhos (7 e 8), o virus após passagem pelo carrapato revela ainda as mesmas relações: cobaias immunizadas contra elle não mostram reacção quando reinoculadas com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas. Estas relações immunologicas justificaram já a inclusão do nosso "typho exanthematico" no grupo de Rickettsioses ou febres exanthematicas que tem como infecção typo a febre maculosa das Montanhas Rochosas.

CONCLUSÕES

A passagem do virus do "typho exanthematico" de S. Paulo pelo organismo do carrapato (*Amblyomma cajennense*) não lhe modifica os caracteres essenciaes, manifestados pelo seu comportamento experimental e relações immunologicas.

ABSTRACT

The virus of the S. Paulo spotted fever seems to keep all of its fundamental characters after having passed through the tick *Amblyomma cajennense,* to judge from its experimental behaviour and immunological relationships.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A.* — Pesquisas sobre a possibilidade de transmissão experimental do virus por *Ixodidae* — Brasil Medico XLVI(33): 49.1932 *et* Mem. Inst. Butantan VI:139.1931.

2. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da* — Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*) — Brasil Medico XLVI(48) :993.1932 *et* Mem. Inst. Butantan VII :33.1932.

3. *Monteiro, J. Lemos* — Estudos sobre o typho exanthematico de S. Paulo. 1.ª parte: Comportamento experimental e propriedades do virus — Mem. Inst. Butantan VI :7.1931.

4. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da* — Localização da *Rickettsia brasiliensis* nas cellulas dos diverticulos intestinaes do *Amblyomma cajennense* — Apres. Congr. Med. Paulista. Nov. 1933 *et* Mem. Inst. Butantan VIII.1933-1934.

5. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* — Studies on Rocky Mountain Spotted Fever. Infectivity of fasting and recently fed ticks — U. S. Public Health Rep. XXXVIII (8) :333.1923.

6. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* — Rocky Mountain Spotted Fever. Experimental studies on tick virus — U. S. Public Health Rep. XXXIX(48) :3027.1924.

7. *Monteiro, J. Lemos* — O "Typho exanthematico de S. Paulo" e suas relações com a Febre maculosa das Montanhas Rochosas, á luz das provas de immunidade cruzada — Brasil Medico XLVII(25) :437.1933.

8. *Monteiro, J. Lemos* — Vaccina contra o "Typho exanthematico de S. Paulo". Novas correlações entre essa infecção e a Febre maculosa das Montanhas Rochosas — Apres. Congr. Med. Paulista. Nov. 1933; VIIIa. Reunião Soc. Arg. Path. Reg. del Norte. Out. 1933 *et* Mem. Inst. Butantan VIII.1933-1934.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado ao 2.º Congresso Medico Paulista, em novembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934)

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII, 1933-1934



Fig. 1

Alimentação directa de *Amblyomma cajennense* em cobaia infectada.

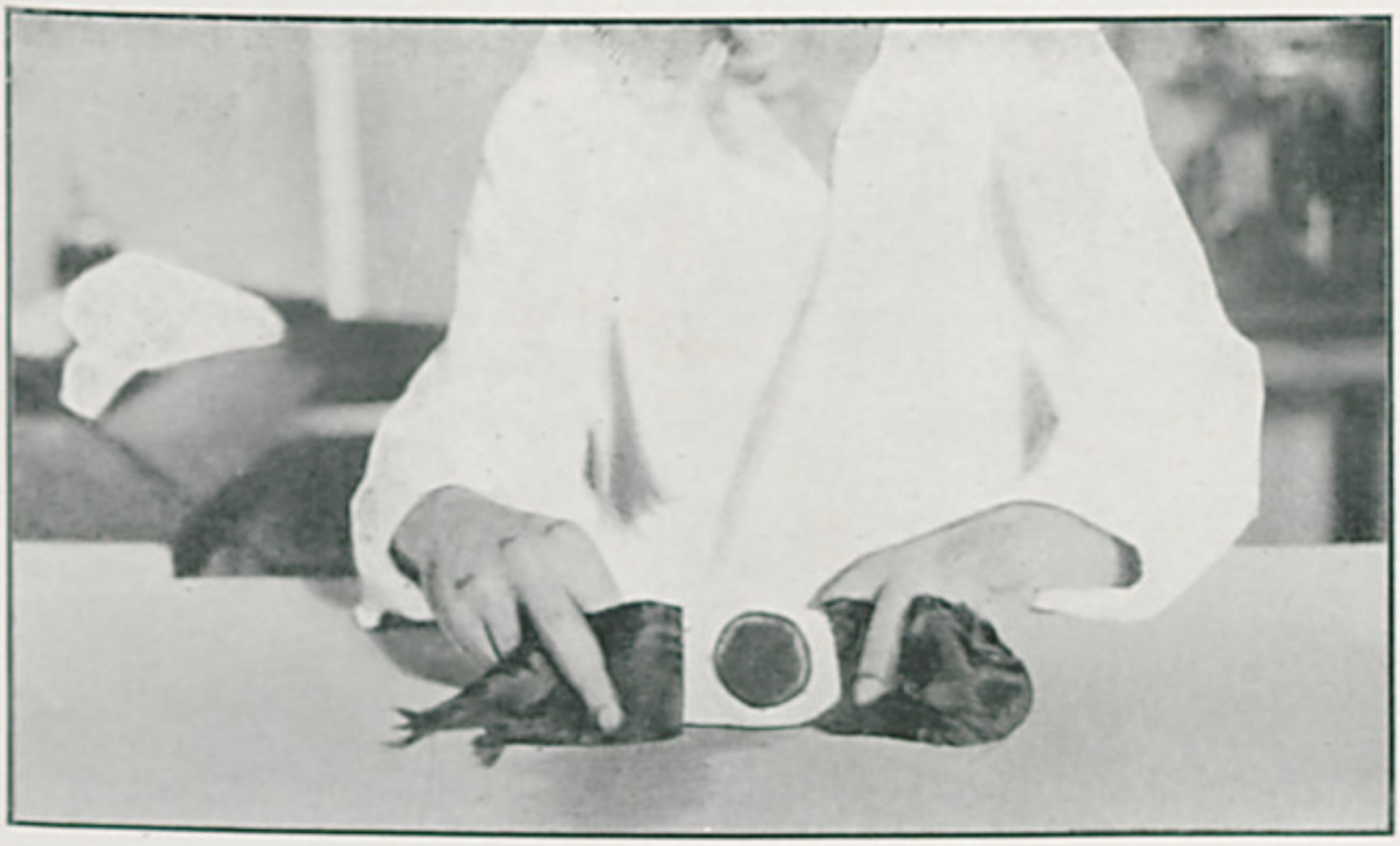


Fig 2

Alimentação, em cobaia infectada, de carrapatos mantidos pelo dispositivo adoptado no Rocky Mountain Spotted Fever Laboratory (photo de Parker).

COMPORTAMENTO EXPERIMENTAL DO COELHO AOS VIRUS DO "TYPHO EXANTHEMATICO DE S. PAULO" E DA FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS

POR

J. LEMOS MONTEIRO

(Com 3 graphicos e 4 photographias, sendo 2 coloridas, no texto)

614.526+599.32

COMPORTAMENTO EXPERIMENTAL DO COELHO AOS VIRUS DO "TYPHO EXANTHEMATICO DE S. PAULO" E DA FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS

POR

J. LEMOS MONTEIRO

Separadas as rickettsioses em 4 grandes grupos, segundo a orientação que A. do Amaral e nós suggerimos (1 e 2), necessario se torna recorrer-se a elementos de varias naturezas para a distincção das modalidades clinicas pertencentes a cada um delles, sendo que nos citados trabalhos o assumpto foi tratado com pormenores e justificada a orientação seguida.

Entre esses elementos figura o comportamento experimental dos virus das diversas infecções relativamente aos animaes de laboratorio.

Particularizando as duas infecções que ora nos interessam e pertencentes, juntamente com outras, ao grupo III, isto é: a Rickettsiose maculosa nearctica, typo oeste (Febre maculosa das Montanhas Rochosas) e Rickettsiose maculosa neotropica, typo de S. Paulo ("Typho exanthematico de S. Paulo"), este comportamento experimental fornece-nos certas indicações para a distincção dessas duas modalidades nosologicas.

No que diz respeito ao "Typho de S. Paulo", o comportamento experimental do respectivo virus tem sido objecto de trabalhos que já publicamos (3 e 4); quanto ao da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, elle tem sido estudado, principalmente nos Estados Unidos e numerosos são os trabalhos a respeito, principalmente os realizados em Hamilton, por Parker e seus collaboradores, por Dyer, e outros.

Já na cobaia se verifica certa differença no comportamento dos dois virus: o da Febre maculosa determina com maior frequencia a reacção escrotal, sendo tambem mais evidentes os phenomenos hemorrhagicos da bolsa escrotal e a necrose.

Retomando, ultimamente, o estudo dos dois virus relativamente ao coelho, fizemos algumas verificações que talvez contribuam para uma melhor diffe-

renciação de ambos, constituindo essa experimentação outro elemento a se juntar aos até agora usados para esse fim.

O emprego do coelho na analyse da estructura antigenica dos differentes virus das Rickettsioses por meio das reacções sorologicas com os varios typos de *Proteus* X, foi recommendado por A. Felix (5). Este auctor concluiu que a simples reacção para verificação da producção de agglutinina no coelho é a unica capaz de demonstrar o antigeno principal O do virus; as pequenas differenças antigenicas entre os virus do "typhus", devidas a sobrepostos grupos antigenicos O, são afastadas pela reacção de immunidade cruzada no coelho; a reestimulação de agglutininas indica diversidade e ausencia de reestimulação de agglutininas indica identidade de estructura antigenica dos virus. Dos seus estudos, Felix poude deduzir que o "Typho de S. Paulo" representa uma variedade sorologica, possuindo um antigeno principal para o *Proteus* X19 e um antigeno de grupo para o *Proteus* XK.

Este aspecto sorologico da nossa Rickettsiose é estudado com pormenor em outro trabalho, que Travassos e nós elaboramos (6).

Na presente contribuição, mostramos o comportamento experimental dos virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" e da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, após inoculação peritoneal em coelhos machos, adultos, de peso superior a 2 kilos.

Algumas verificações feitas, embora não muito numerosas (o que dá a este estudo o caracter de nota preliminar), auctorizam-nos a pensar que o coelho, alem de servir, como pensa Felix, para a distincção sorologica dos diversos virus, pode tambem contribuir para sua distincção sob o ponto de vista do comportamento experimental, pelo menos entre as duas infecções de que tratamos.

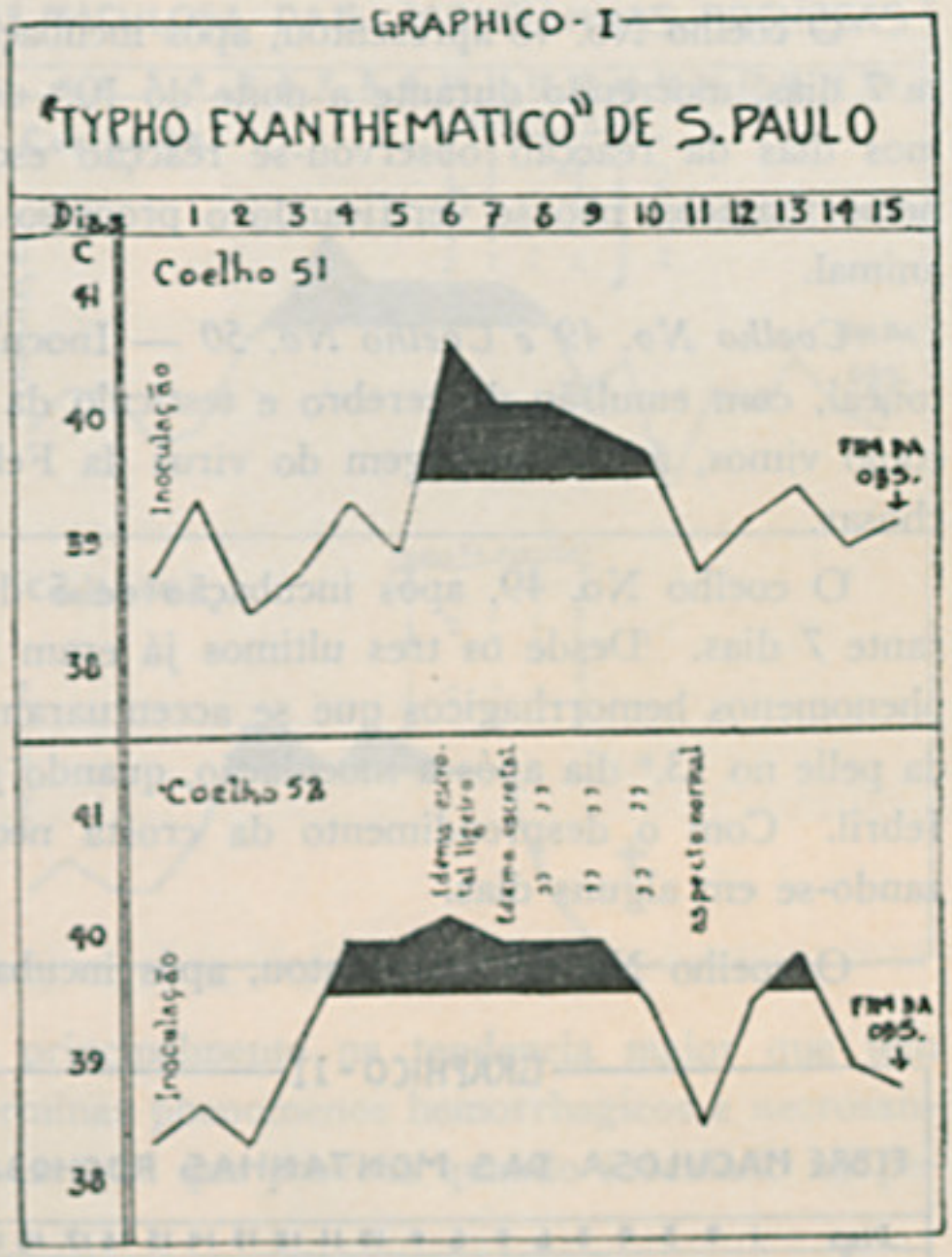
Comportamento do coelho á inoculação peritoneal do virus do "Typho exanthematico de S. Paulo"

Por já ter sido por nós descripto este comportamento (3 e 4), lembramos apenas que a inoculação do virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" provoca no coelho uma reacção febril que dura alguns dias, após certo periodo de incubação. Em mais de 30 coelhos machos inoculados com este virus, representado por duas amostras (L e W), não observamos, a não ser raramente, certa reacção escrotal. Quando esta se manifesta, apenas é representada por edema com ligeira vermelhidão da pelle do escroto. *Nem uma só vez nesse animal observámos phenomenos hemorrhagicos mais intensos terminando pela necrose da pelle.*

O graphico I mostra as reacções de 2 coelhos inoculados ultimamente e que serviram de comparação para a reacção em outros 4 inoculados com o virus da Febre maculosa. Os dois coelhos (Nos. 51 e 52) foram inoculados em 25-IX-33

por via peritoneal com 2 cc. de sangue, cada um, da cobaia No. 1272, correspondente ao nosso virus L da 152ª. passagem. Ambos tiveram reacção febril caracteristica. Somente um (No. 52) apresentou certa reacção escrotal, manifestada por edema e ligeira hyperemia da pelle do escroto, phenomenos que regrediram em alguns dias.

Comportamento do coelho á inoculação peritoneal do virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas (typo oeste)



Como consequencia da inoculação deste virus o coelho apresenta da mesma forma, após certo periodo da incubação, uma reacção febril durante varios dias. Os phenomenos da reacção escrotal iniciam-se nos ultimos periodos da reacção febril. A principio, ligeiro edema, que se vae accentuando juntamente á hyperemia. A pelle do escroto apresenta-se avermelhada e lisa, não podendo formar pregas. Os phenomenos hemorrhagicos accentuam-se, observando-se zonas de coloração azulada ecchymotica, em certos pontos. O processo continua, iniciando-se a necrose da pelle, que se desprende em placas; esta necrose completa só se observa nos animaes que resistem á infecção, evidenciando-se, portanto, mais intensamente após o periodo de reacção febril.

As observações seguintes, dos 4 coelhos inoculados, mostram a marcha da infecção neste animal e a evolução da reacção escrotal até a necrose.

Coelho No. 47 e Coelho No. 48 — Inoculados em 12-IX-933, por via peritoneal, com 2 cc. de sangue, cada um, da cobaia No. 1254, correspondente á 23.ª passagem do nosso virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas (typo oeste) que isolamos de *Dermacentor andersoni* enviados por R. R. Parker, dos Estados Unidos.

O coelho No. 47, após incubação de 2 dias, apresentou reacção febril durante 10 dias, voltando sua temperatura á media normal e resistindo elle á in-

fecção. No 8.º dia de reacção febril, notava-se já a reacção escrotal, caracterizada por edema do escroto. Este edema se accentuou no dia seguinte, com phenomenos inflammatorios e hemorrhagicos, que augmentaram pouco a pouco, com a formação de placas ecchymoticas no ultimo dia de reacção febril. O processo continuou e iniciou-se a necrose da pelle, que progrediu, formando placas que se destacaram depois de terminada a reacção febril do animal.

O coelho No. 48 apresentou, após incubação de 3 dias, reacção febril durante 7 dias, morrendo durante a noite do 10.º dia após a inoculação. Nos 3 ultimos dias da reacção observou-se reacção escrotal, com edema e phenomenos hemorrhagicos, não se verificando o processo até a necrose, devido á morte do animal.

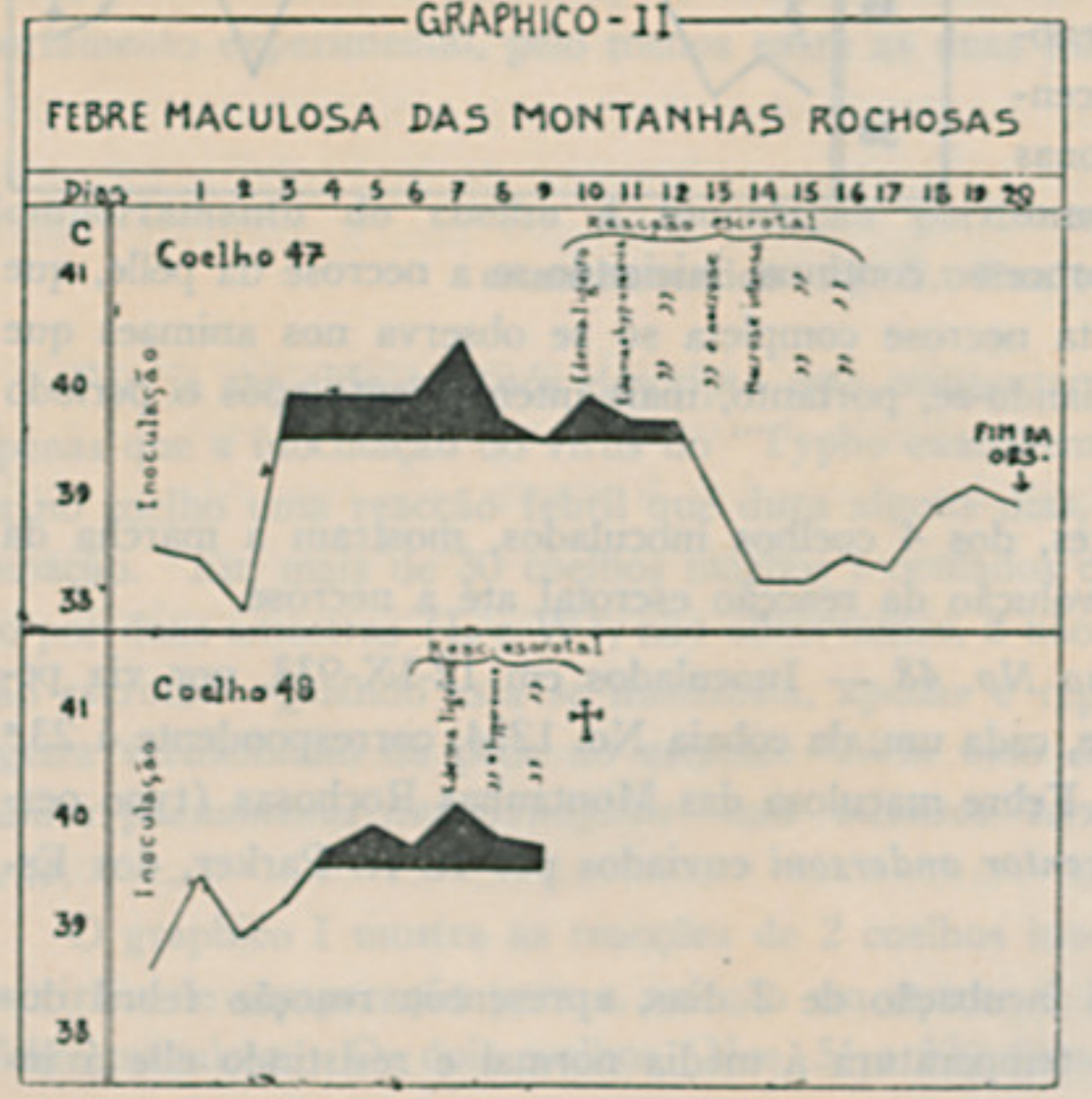
Coelho No. 49 e Coelho No. 50 — Inoculados em 12-IX-933, por via peritoneal, com emulsão de cerebro e testiculo da cobaia No. 1254, correspondente, como vimos, á 23.ª passagem do virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.

O coelho No. 49, após incubação de 5 dias, apresentou reacção febril durante 7 dias. Desde os tres ultimos já eram bem evidentes o edema escrotal e phenomenos hemorrhagicos que se accentuaram, apparecendo a necrose completa da pelle no 13.º dia após a inoculação, quando já terminado o periodo de reacção febril. Com o desprendimento da crosta necrosada, a lesão regridiu, cicatrizando-se em alguns dias.

O coelho No. 50, apresentou, após incubação de 4 dias, reacção febril durante 8 dias. A reacção escrotal iniciou-se nos 3 ultimos dias de febre, com edema e phenomenos hemorrhagicos que se accentuaram, terminando pela necrose já no primeiro dia após a reacção thermica. Este coelho morreu na noite do 14.º dia após a inoculação.

GRAPHICO - II

FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS



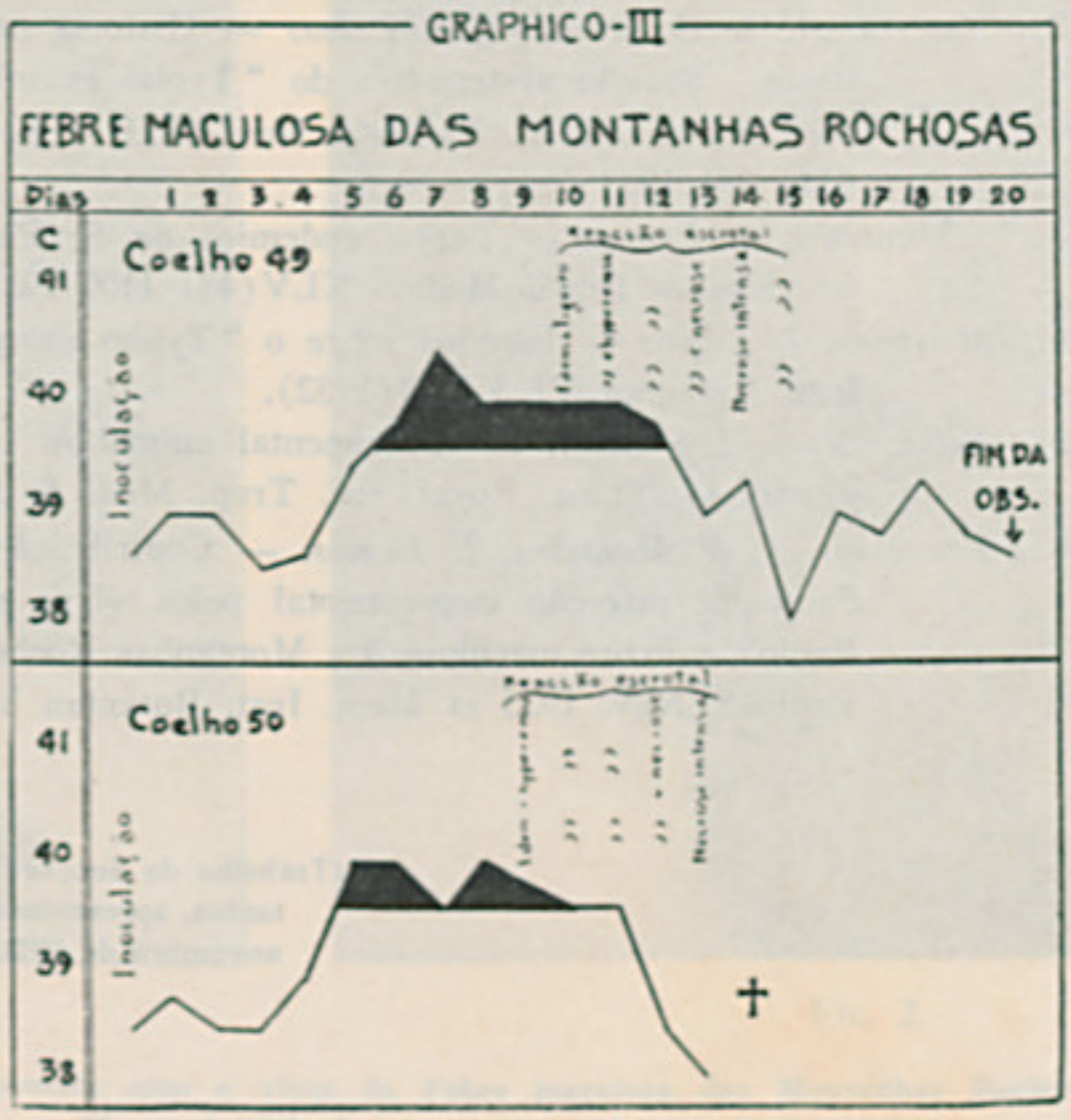
Os graphicos II e III mostram a evolução da infecção (reacção thermica e reacção escrotal com necrose) dos 4 coelhos; as figuras 1 e 2 (esta colorida) mostram melhor o aspecto da reacção es-

crotal do coelho, com a necrose em inicio, e as figuras 3 e 4 (esta colorida) mostram um estado mais adiantado da reacção e da necrose escrotal, provocada pelo virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.

SUMMARIO E CONCLUSÕES

O estudo do comportamento experimental dos virus da Rickettsiose neotropica, typo de S. Paulo ("Typho exanthematico de S. Paulo") e da Rickettsiose nearctica, typo oeste (Febre maculosa das Montanhas Rochosas) relativamente ao coelho adulto macho, mostra certas differenças que, com outros elementos conhecidos, podem servir de novo meio de distincção dos dois virus.

GRAPHICO-III



Estas differenças baseiam-se principalmente na tendencia maior que tem o virus da Febre maculosa em determinar phenomenos hemorrhagicos e necrosantes, como manifestação da reacção escrotal que provoca quando inoculado no peritoneo daquelle animal.

ABSTRACT

The comparative study of the experimental behaviour of the virus of the Neotropical rickettsiosis, S. Paulo type (S. Paulo spotted fever) with that of the Nearctic rickettsiosis, type west (Rocky Mountain spotted fever) upon inoculation into adult male rabbits shows, together with other known characters, certain differences to exist between these viruses so as to facilitate their separation.

These differences consist particularly in the greater tendency borne by the virus of R. M. spotted fever to bring about hemorrhages and necrosis in the scrotum of rabbits that have been peritoneally inoculated with it.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Ensaio de classificação das Rickettsioses á luz dos nossos actuaes conhecimentos — Mem. Inst. Butantan VII:349.1932.
2. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Historia natural e classificação das Rickettsioses. Posição systematica do "Typho exanthematico de S. Paulo" — Apres. ao Congresso Med. Paulista. Nov. 1933 *et* Rev. Sud. Amér. Med. & Chir. IV (11):781.1933.
3. *Monteiro, J. Lemos* — Typho endemico de S. Paulo. Comportamento experimental do virus — Brasil Medico XLV(48):1109.1931.
4. *Monteiro, J. Lemos* — Estudos sobre o "Typho exanthematico de S. Paulo" — Mem. Inst. Butantan VI:3.1931(1932).
5. *Felix, A.* — The rabbit as experimental animal in the study of the typhus group of viruses — Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hyg. XXVI(4):365.1933.
6. *Travassos, J. & Monteiro, J. Lemos.* — Contribuição ao estudo da reacção de Weil-Felix na infecção experimental pelos virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" e Febre maculosa das Montanhas Rochosas — Apres. ao Congresso Med. Paulista. Nov. 1933 *et* Mem. Inst. Butantan VIII. 1933-1934.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado ao 2.º Congresso Medico Paulista em novembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934).



FIG. 1



FIG. 2

Reacção escrotal do coelho inoculado com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas. Phase inicial da necrose.



FIG. 3



FIG. 4

Reacção escrotal do coelho inoculado com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas. Phase adiantada da necrose.

LOCALIZAÇÃO DA *RICKETTSIA BRASILIENSIS* NAS CELLULAS DOS DIVERTICULOS INTESTINAES DO *AMBLYOMMA CAJENNENSE*

POR

J. LEMOS MONTEIRO E FLAVIO DA FONSECA

(Com 2 graphicos e 7 figuras coloridas no texto)

614.526:616.9685

LOCALIZAÇÃO DA *RICKETTSIA BRASILIENSIS* NAS CELLULAS DOS DIVERTICULOS INTESTINAES DO *AMBLYOMMA CAJENNENSE*

POR

J. LEMOS MONTEIRO E FLAVIO DA FONSECA

Em trabalhos anteriores (1,2) e em outro mais recente (3) foram descriptas numerosas experiencias de transmissão experimental do virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" por meio de *Ixodidae,* evidenciando-se, sobretudo, o papel possivelmente representado em condições naturaes pelo *Amblyomma cajennense,* especialmente á luz de certos aspectos da infecção, inclusive o epidemiologico.

Nesta nota, resumimos algumas pesquisas preliminares feitas para a verificação da presença e localização da *Rickettsia brasiliensis* em exemplares de *A. cajennense* experimentalmente infectados, mostrando que este assumpto precisa de ser continuado e ampliado para que se elucide completamente o papel deste carrapato na transmissão da nossa Rickettsiose.

Em exemplares de numerosos lotes de *Amblyomma cajennense* infectados foi effectuada, em periodos diversos, a pesquisa das Rickettsias, quer em emulsões com elles preparadas, quer após fixação, inclusão e coloração adequada de cortes nelles praticados; aqui assignalaremos apenas os resultados dos exames em exemplares dos lotes que se acham documentados com desenhos das respectivas preparações. Citaremos, ao mesmo tempo, os resultados das provas de infecção de cobaia com exemplares de carrapatos de um dos lotes estudados, para confirmação da infecção dos exemplares em que foram encontradas Rickettsias, estando estas provas já descriptas, para os outros lotes, em trabalhos anteriores.

Antes de mais nada devemos indicar, em resumo, a technica por nós empregada para a fixação e coloração dos cortes de carrapatos.

Methodo de estudo e technica

Exemplares de *Amblyomma cajennense* são postos a alimentar em cobaias infectadas durante 3 ou 4 dias, no periodo de reacção febril, nas condições descriptas com maior minucia em outro trabalho (3). Exemplares desprendidos ou retirados no final desse prazo, mantidos separadamente em tubos apropriados, são, decorrido certo numero de dias, lavados convenientemente, emulsionados para pesquisa directa em esfregaços ou fixados para posterior inclusão.

Fixação e inclusão — Empregamos mais commummente a technica de Hoare (4), que assim se pode resumir:

Fixador: liquido de Bouin modificado:

Sol. saturado de acido picrico em alcool a 90 %	75	partes
formol (40%).	25	"
acido acetico.	5	" ;

a quantidade a usar é addicionada, na occasião, de 1 ou 2 gottas de chloroformio;
fixação durante 24 horas, sendo que nas primeiras o frasco deve ser collocado na estufa a 56°.

A marcha a seguir, até inclusão, é:

Alcool a 90°, durante 3 a 7 dias, sendo o alcool trocado varias vezes;
depois, passar por 24 horas nas seguintes misturas:
alcool absoluto;
mistura, em partes iguaes, de alcool e chloroformio;
chloroformio aquecido, saturado de parafina;
parafina pura, estufa a 56°, por 5 — 6 horas;
inclusão.

Coloração dos cortes — O methodo preferido para coloração dos cortes, após dissolução da parafina e hydratação, é o de Giemsa, sendo indispensavel uma differenciação cuidadosa afim de se conseguirem bons preparados. Para esta differenciação foram empregadas duas technicas. Na primeira, a coloração era feita durante 12 - 24 horas no soluto do corante (1 gotta para cada 2 cc.), seguindo-se uma lavagem e differenciação com agua destillada fracamente acidulada com acido acetico, até coloração rosea, seguindo uma lavagem em agua corrente e destillada, alcool absoluto, xylol e montagem em oleo de cedro.

Na segunda technica, a de Mudrow (5), que é mais simples, a differenciação se torna mais perfeita, fornecendo preparados mais claros e que melhor se prestam á conservação.

Resume-se no seguinte: tomam-se 4 frascos de Borrel, perfeitamente limpos e seccos; nos 2 primeiros (I e II) colloca-se acetona pura, neutra, e, nos outros 2 (III e IV), xylol puro.

A coloração é feita durante 20 - 30 minutos em soluto de Giemsa (1 gotta para 1 cc. de agua destillada, de pH = 7.2); após lavagem por meio minuto em agua destillada, retira-se o excesso dagua da lamina; passa-se em acetona I, por 15 - 30 segundos; por acetona II por 10 segundos; por xylol III por 1 minuto, controlar a coloração com objectiva secca para se saber si a differenciação está perfeita ou si ha necessidade de se retornar á acetona II, e, finalmente, xylol IV por 10 minutos, seguindo-se a montagem em balsamo do Canadá.

As pesquisas registadas neste trabalho foram feitas em exemplares de *Amblyomma cajennense* infectados nas seguintes condições:

Lote III, em 4 exemplares, sendo 3 ♀ e 1 ♂ alimentados na cobaia infectada No. 864, durante a reacção febril, nos dias 21 a 23 - X - 932, sendo os carrapatos fixados depois de 7 e 15 dias do fim da alimentação.

Lote V, alimentados na cobaia No. 917, durante a reacção febril, nos dias 6 a 11 - XII - 932, sendo fixados a 24 do mesmo mês; a pesquisa foi feita numa ♀ fixada após ter desovado.

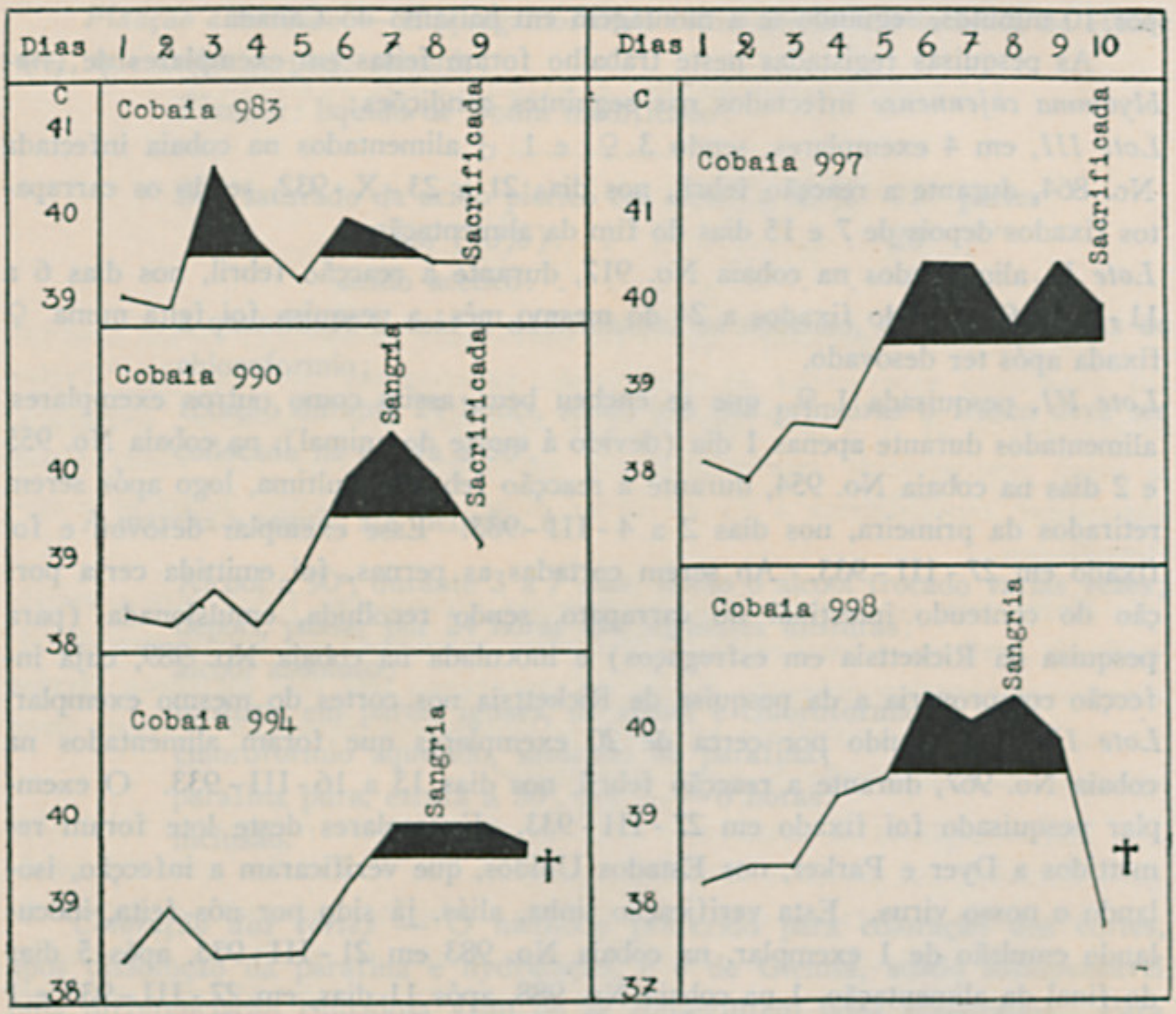
Lote VI, pesquisada 1 ♀. que se encheu bem, assim como outros exemplares, alimentados durante apenas 1 dia (devido á morte do animal), na cobaia No. 955 e 2 dias na cobaia No. 954, durante a reacção febril, na ultima, logo após serem retirados da primeira, nos dias 2 a 4 - III - 933. Esse exemplar desovou e foi fixado em 27 - III - 933. Ao serem cortadas as pernas, foi emittida certa porção do conteudo intestinal do carrapato, sendo recolhida, emulsionada (para pesquisa da Rickettsia em esfregaços) e inoculada na cobaia No. 989, cuja infecção comprovaria a da pesquisa de Rickettsia nos cortes do mesmo exemplar.

Lote IX, constituido por cerca de 20 exemplares que foram alimentados na cobaia No. 967, durante a reacção febril, nos dias 13 a 16 - III - 933. O exemplar pesquisado foi fixado em 27 - III - 933. Exemplares deste lote foram remettidos a Dyer e Parker, nos Estados Unidos, que verificaram a infecção, isolando o nosso virus. Esta verificação tinha, aliás, já sido por nós feita, inoculando emulsão de 1 exemplar, na cobaia No. 983 em 21 - III - 933, após 5 dias do final da alimentação, 1 na cobaia No. 988, após 11 dias, em 27 - III - 933 e 1 na cobaia No. 1004 em 6 - IV - 933, isto é, 21 dias após a alimentação infectante.

Resultados das experiencias

Infecção dos carrapatos — Apenas assignalaremos os resultados da verificação da infecção de exemplares dos lotes VI e IX, que forneceram especimes para fixação e cortes, pois os obtidos com os dois lotes restantes estão já expostos em outros trabalhos.

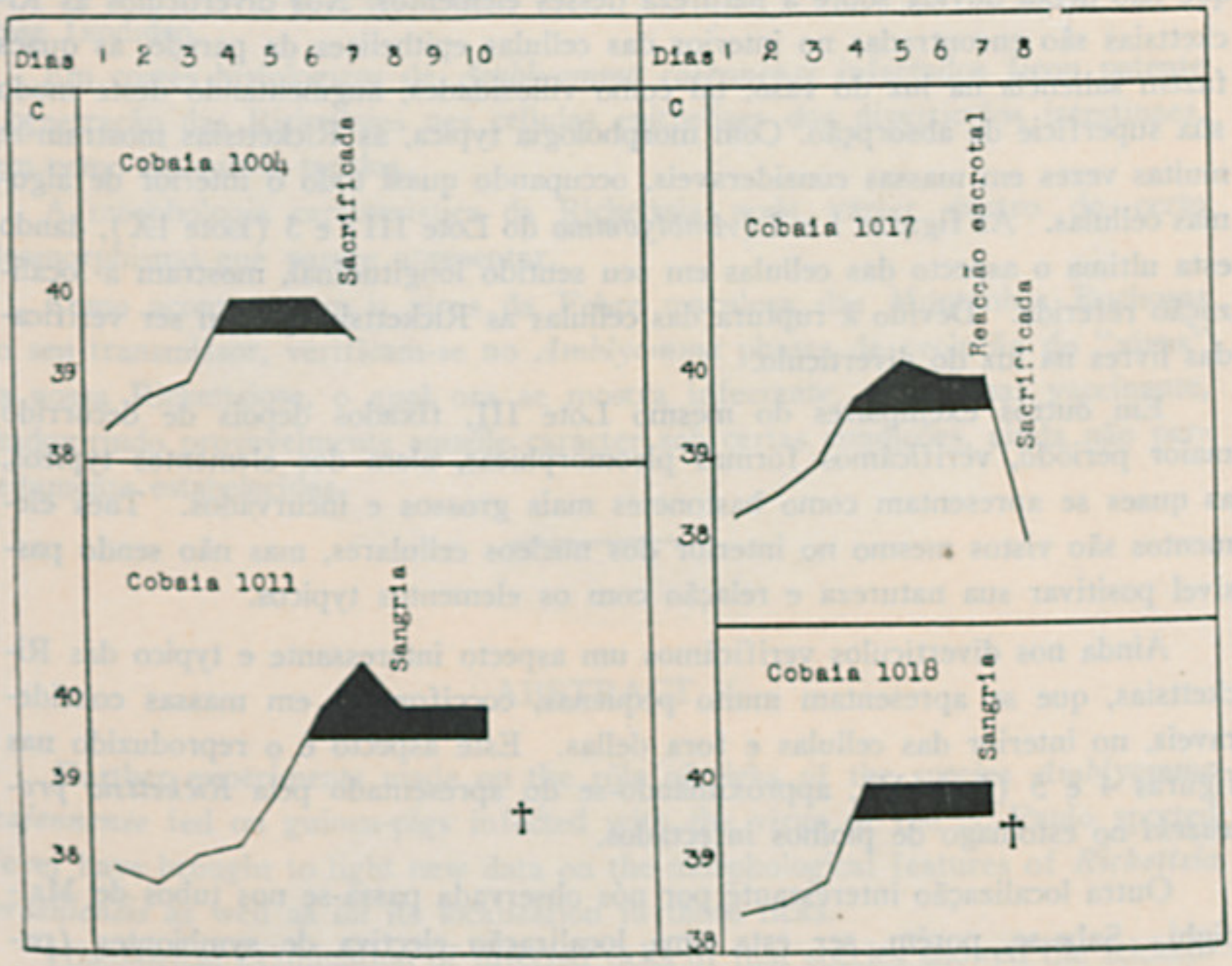
Cobaia No. 989 — inoculada em 27-III-933 com emulsão de material proveniente de um *Amblyomma* ♀ (Lote VI), após ligeiro corte na cuticula externa. Não apresentou reacção febril caracteristica, o maximo attingido tendo sido 39°2. Após 36 dias foi reinoculada com o virus activo, de passagem (emulsão de cerebro da cobaia No. 1024), não apresentando reacção, mostrando-se immunizada. Posteriormente, 21 dias após esta ultima injecção, foi inoculada com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, que tambem não provocou qualquer reacção.



Graphico I

Cobaia No. 983 — (Graphico 1) inoculada em 21 - III - 933 com emulsão de 1 *Amblyomma* ♀ (Lote IX), alimentado, 5 dias antes, na cobaia No. 967, de 13 a 16 - III - 933. Apresentou reacção febril e infecção caracteristica como se verifica no Graphico 1, onde estão registadas apenas as 4 primeiras passagens feitas (cobaias Nos. 990, 994, 997 e 998).

Cobaia No. 988 — inoculada em 27 - III - 933 com emulsão de 1 *Amblyomma* ♀ (Lote IX) que, 11 dias antes, de 13 a 16, se havia alimentado na cobaia No. 967. Não apresentou reacção febril caracteristica, pelo que foi reinoculada com o virus activo (emulsão de cerebro da cobaia No. 1024) decorridos 36 dias, mostrando-se immunizada. Posteriormente tambem se mostrou immune ao virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.



Graphico II

Cobaia No. 1004 — (Graphico II) inoculada em 6 - IV - 933 com emulsão de 1 *Amblyomma* ♀ (Lote IX), alimentado 21 dias antes, de 13 a 16 - III - 933 na cobaia No. 967. Apresentou infecção e reacção caracteristica, como se verifica no Graphico II, onde estão apenas tambem registados os resultados de algumas passagens feitas (cobaias Nos. 1011, 1017 e 1018).

Pesquisas e algumas localizações da ***Rickettsia brasiliensis*** *nos carrapatos infectados* — Em esfregaços directos de emulsão dos carrapatos, como os assignalados e feitos com exemplar do Lote VI, as Rickettsias apresentam a morphologia typica, com coloração de aspecto bipolar ou de finos bastonetes, que se coram em roseo pelo methodo de Giemsa. Nos cortes e com a coloração pelo Giemsa, segundo os methodos acima indicados, o seu aspecto morphologico

é typico, dependendo a coloração em grande parte da boa differenciação conseguida, apresentando-se corados em violeta ou roseo nas boas differenciações ou mais ou menos azuladas, mas não perfeitamente differenciadas.

Nos differentes lotes estudados, de carrapatos infectados, foram verificadas algumas localizações da *Rickettsia brasiliensis*. Em primeiro logar assignalamos a presença dos microorganismos nos diverticulos intestinaes dos *Amblyomma*, o que não deixa duvida sobre a natureza desses elementos. Nos diverticulos as Rickettsias são encontradas no interior das cellulas epitheliaes da parede, as quaes fazem saliencia na luz do vaso, tal como villosidades, augmentando deste modo sua superficie de absorpção. Com morphologia typica, as Rickettsias mostram-se muitas vezes em massas consideraveis, occupando quasi todo o interior de algumas cellulas. As figuras 1 e 2 (*Amblyomma* do Lote III) e 3 (Lote IX), dando esta ultima o aspecto das cellulas em seu sentido longitudinal, mostram a localização referida. Devido á ruptura das cellulas as Rickettsias podem ser verificadas livres na luz do diverticulo.

Em outros exemplares do mesmo Lote III, fixados depois de decorrido maior periodo, verificámos formas pleomorphicas, alem dos elementos typicos, as quaes se apresentam como bastonetes mais grossos e incurvados. Taes elementos são vistos mesmo no interior dos nucleos cellulares, mas não sendo passivel positivar sua natureza e relação com os elementos typicos.

Ainda nos diverticulos verificámos um aspecto interessante e typico das Rickettsias, que se apresentam muito pequenas, cocciformes, em massas consideraveis, no interior das cellulas e fora dellas. Este aspecto é o reproduzido nas figuras 4 e 5 (Lote V), approximando-se do apresentado pela *Rickettsia prowazeki* no estomago de piolhos infectados.

Outra localização interessante por nós observada passa-se nos tubos de Malpighi. Sabe-se, porém, ser esta uma localização electiva de symbiontes (parasitos endocellulares dos organs genitaes e dos tubos de Malpighi) das femeas na superfamilia *Ixodoidea*, segundo Mudrow (5), os quaes podem ser confundidos com aquelles elementos observados sob morphologia typica no cytoplasma cellular. As figuras 6, com pequeno augmento, assignalando o ponto examinado, e 7 com grande augmento, para a demonstração das Rickettsias, dão idéa dos microorganismos e da sua situação nos organs citados.

Proseguindo nestas pesquisas, ainda em andamento, podemos adeantar ternos sido dado observar a presença de microorganismos com os caracteres de *Rickettsia* em musculos e em tecidos pertencentes ao apparelho buccal. Não nos é, todavia, possivel sustentar a asserção por nós feita, em nota ao pé da pagina, em trabalho anterior (2), sobre a situação intranuclear das Rickettsias nas cellulas intestinaes dos carrapatos infectados. Tal verificação preliminar poude ser rectificada logo que nos foi dado obter material rico e mais bem corado.

SUMMARIO E CONCLUSÕES

Novos dados experimentaes demonstram a infectuosidade de carrapatos (*Amblyomma cajennense*) alimentados em cobaias infectadas com o "virus" do "Typho exanthematico de S. Paulo", incluindo-se entre elles alguns dos principaes aspectos morphologicos e certas localizações da *Rickettsia brasiliensis* nesse Ixodideo.

Em cortes histologicos de *Amblyomma cajennense* infectados ficou patente a penetração das Rickettsias nas cellulas epitheliaes dos diverticulos intestinaes, bem como de outros tecidos.

A morphologia caracteristica da Rickettsia pode variar dentro de certo pleomorphismo que parece apresentar.

Como acontece com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas no seu transmissor, verificam-se no *Amblyomma* phases de evolução do "virus" da nossa Rickettsiose, o qual ora se mostra infectante, ora apenas vaccinante, readquirindo provavelmente aquelle caracter sob certas condições, ainda não perfeitamente estabelecidas.

ABSTRACT

Further experiments made on the rôle of ticks of the species *Amblyomma cajennense* fed on guinea-pigs infected with the virus of the S. Paulo spotted fever have brought to light new data on the morphological features of *Rickettsia brasiliensis* as well as on its localization in those ticks.

Histological examination of infected ticks of that species showed the Rickettsiae to enter the endothelial cells of the intestinal diverticula and other tissues. The characteristic morphology of *R. brasiliensis* may vary within certain limits. The same stages of evolution as found in the virus of the Rocky Mountain spotted fever within the body of its carrier seem to be borne by the virus of the S. Paulo spotted fever in the *Amblyomma*. The latter virus proves to be sometimes infecting, some other times immunizing, this change taking place under certain conditions not yet fully understood.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A.* — Typho exanthematico de S. Paulo. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus por *Ixodidae* — Brasil Medico XLVI(3) :49.1932 *et* Mem. Inst. Butantan VI :139.1931.

2. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da* — Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*) — Brasil Medico XLVI(48):933.1932 *et* Mem. Inst. Butantan VII:41.1932.
3. *Monteiro, J. Lemos* — Comportamento experimental do virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" após passagem pelo carrapato (*Amblyomma cajennense*) — Apres. Congr. Med. Paulista. Nov. 1933 *et* Mem. Inst. Butantan. VIII:1933-1934.
4. *Wenyon, C. M.* — Protozoology, New York, 1926.
5. *Mudrow, E.* — Über die intrazellulären Symbionten der Zecken — Zeitschr. f. Parasitenk. V(1):138.1932.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado ao 2.º Congresso Medico Paulista em novembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934)

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII, 1933-1934



FIG. 1 × 940



FIG. 2 × 940

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII, 1933-1934

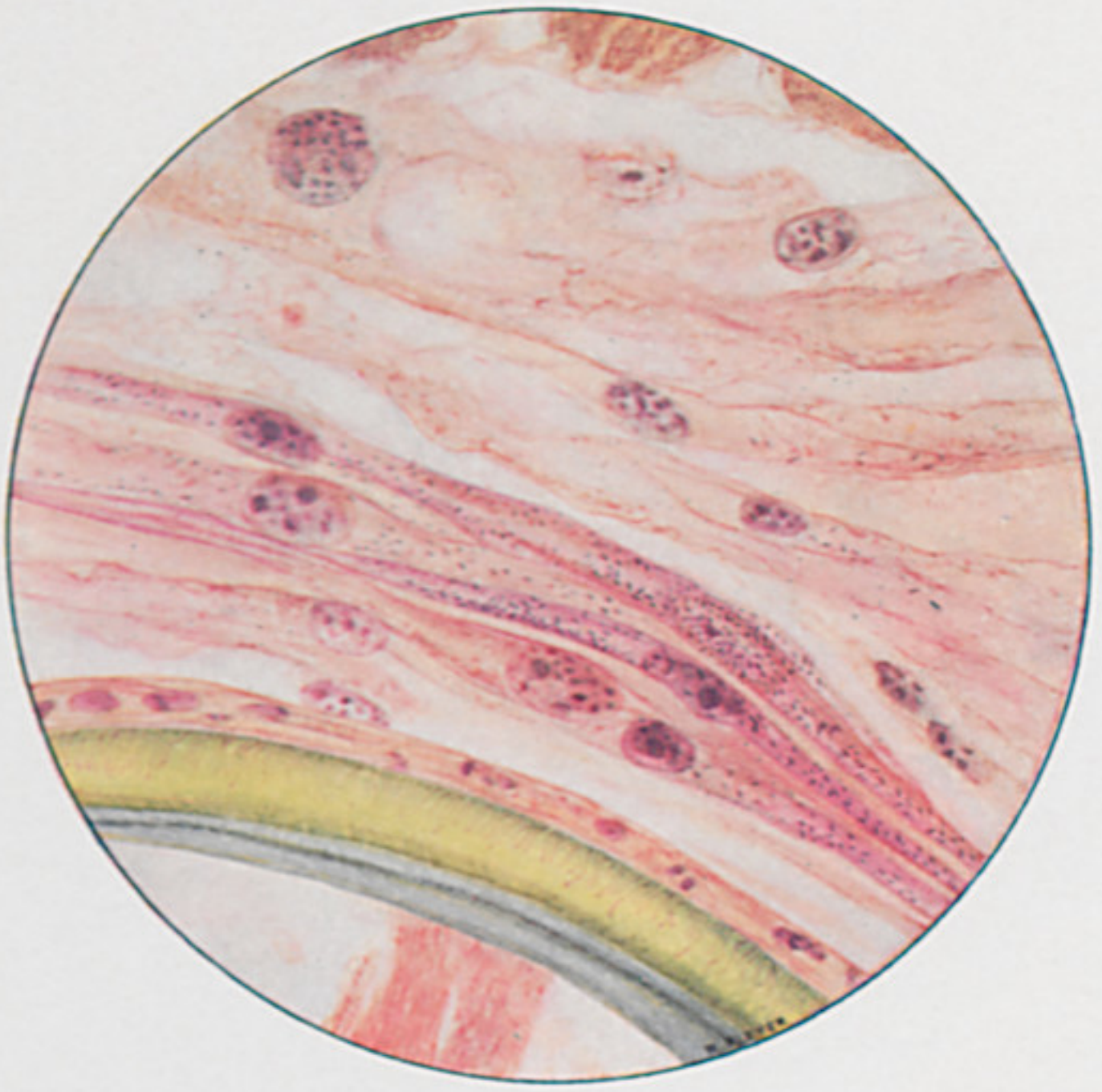


FIG. 3 × 940

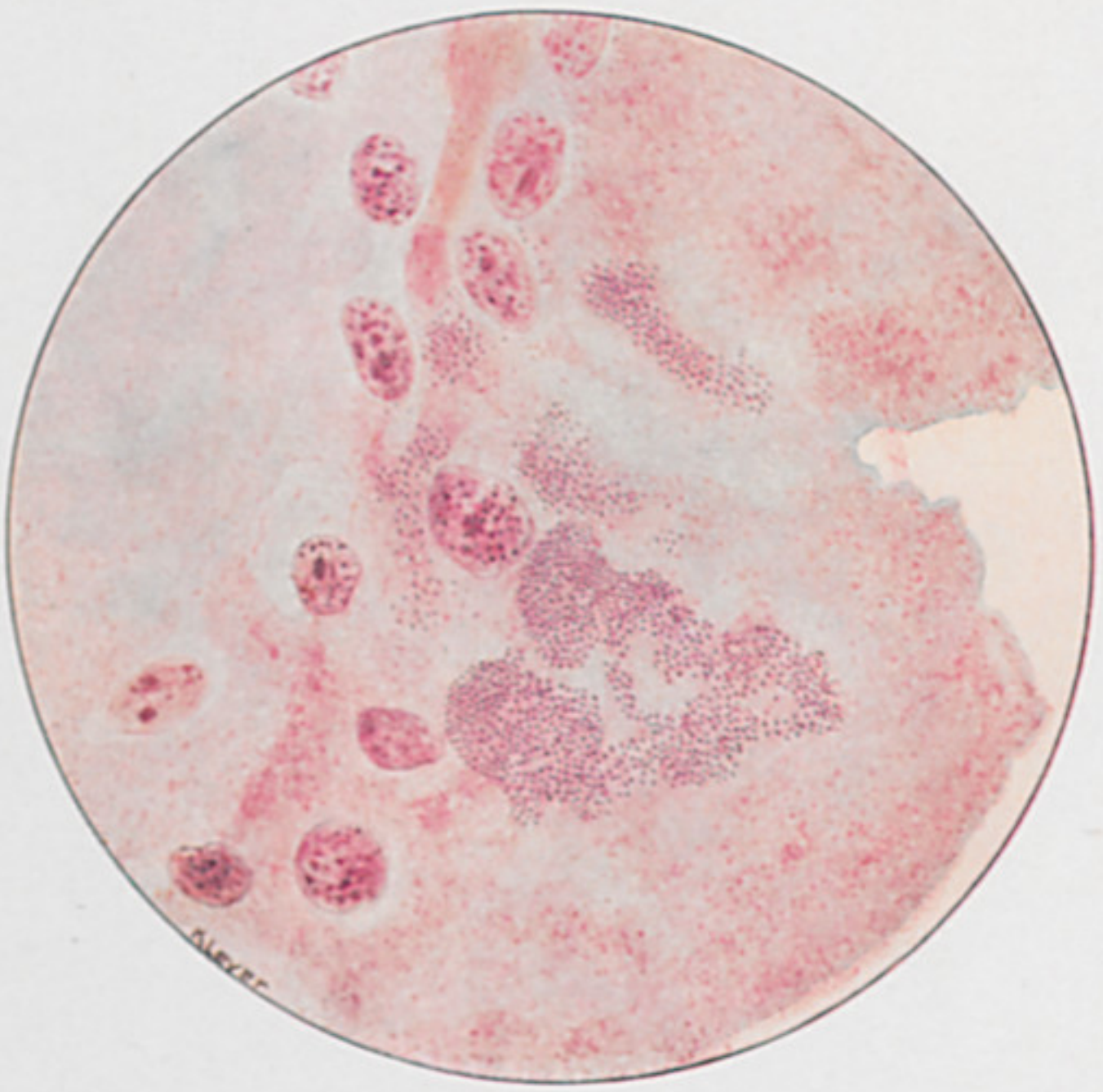


FIG. 4 × 940

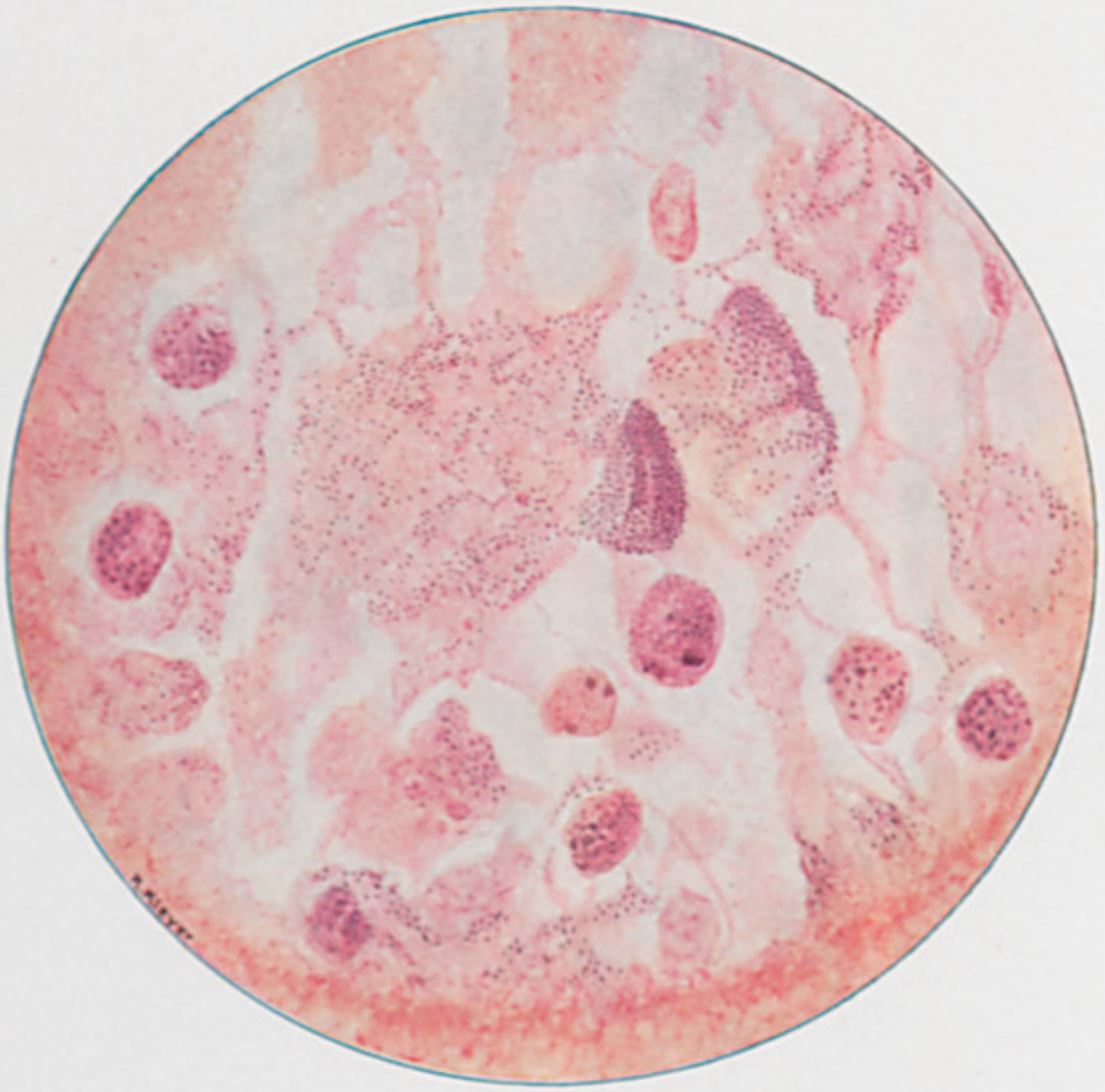


FIG. 5 × 940



FIG. 6 × 80



FIG. 7 × 940

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA REACÇÃO DE WEIL-FELIX NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELOS VIRUS DO "TYPHO EXANTHEMATICO DE S. PAULO" E FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS

POR

J. TRAVASSOS E J. LEMOS MONTEIRO

(Com 7 quadros no texto e 1 graphico)

614.526:612.1182

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA REACÇÃO DE WEIL-FELIX NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELOS VIRUS DO "TYPHO EXANTHEMATICO DE S. PAULO" E FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS

POR

J. TRAVASSOS E J. LEMOS MONTEIRO

Embora não estejam perfeitamente estabelecidos os principios em que se baseia a reacção de Weil-Felix, é indiscutivel a sua importancia no diagnostico das Febres exanthematicas, quando praticada em condições hoje bem conhecidas. Entre estas condições figuram: o emprego de um certo numero de typos de *Proteus* X, relacionados com determinadas formas de infecção; a escolha das variantes apropriadas de cada typo, e, por fim, a verificação do typo de agglutinação obtida. Dentro destas condições indispensaveis, a reacção apresentaria especificidade, já observada pelos differentes auctores que della se têm occupado, e contribuiria para o diagnostico differencial das Febres exanthematicas ou Rickettsioses, algumas das quaes constituiriam variedades sorologicas especiaes em face de determinadas amostras de *Proteus* X.

No caso, porém, das infecções experimentaes, isto é, das reacções praticadas com soros de animaes inoculados, esse valor era até bem pouco tempo muito relativo. Felix mostrou recentemente que a reacção na infecção experimental de certos animaes, coelho principalmente, fornece resultados valiosos e muito contribue para aquella differenciação sorologica das Rickettsioses.

E' já vasta a bibliographia sobre o assumpto e julgamos desnecessaria agora uma revisão geral; apenas registamos alguns trabalhos que dizem respeito ao "Typho exanthematico de S. Paulo".

Na primeira nota publicada sobre esta Rickettsiose (1) foi assignalada certa irregularidade da reacção de Weil-Felix, na infecção humana, para o *Proteus* X19; depois, verificámos (2) que a reacção se mostrava positiva, muitas vezes com o *Proteus* XK (typo de Kingsbury), embora em titulos bem mais baixos do que com o X19, obtendo resultados tambem positivos com soros de certos animaes. Piza (3), em nova contribuição e baseando-se no estudo de numero mais elevado de reacções praticadas no Instituto Bacteriologico de S. Paulo, regista maior frequencia de resultados positivos com o *Proteus* X19. F.

de Oliveira Lima (4), em these apresentada á Faculdade de Medicina da Bahia, fez um estudo geral da reacção e mais particularmente em relação ao "Typho de S. Paulo". Baseando-se em resultados de experiencias pessoaes e de outras feitas naquelle Instituto, tambem consigna que "as agglutinações do soro de doente do Typho exanthematico de S. Paulo se fazem com a raça X19." Carvalho Lima (5), em interessantes pesquisas, conseguiu o isolamento de uma nova amostra de *Proteus* X, comportando-se relativamente aos soros de doentes do nosso "Typho" como a amostra X19, sobre a qual apresentaria certas vantagens que assignala. A. Felix (6), estudando soros de doentes e de animaes que lhe foram daqui remettidos, confirmando nossos primeiros resultados com o *Proteus* XK, poude concluir que o "Typho exanthematico de S. Paulo" constitue uma nova variedade sorologica, possuindo um antigeno principal para o *Proteus* X19 e um antigeno de grupo para o *Proteus* XK. Estudando depois a amostra de *Proteus* isolada por Carvalho Lima, poude Felix confirmar seus resultados sobre as relações com a nossa infecção, considerando que esta amostra, que denominou de *Proteus* XL, melhor corresponde antigenicamente ao virus local. Em trabalho mais recente, Felix (7) faz um estudo mais completo sobre o assumpto, mantendo sua opinião sobre possuir o virus de S. Paulo um antigeno principal para o *Proteus* X19 e um antigeno de grupo para o *Proteus* XK (*).

No presente trabalho registamos os resultados por nós obtidos com a reacção de Weil-Felix praticada com soros de animaes experimentalmente inoculados com o virus do "Typho exanthematico de S. Paulo"; ao mesmo tempo e comparativamente, mostramos os resultados obtidos com soros de alguns animaes inoculados com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas. Antes, porém, e para melhor elucidação do assumpto quanto á nossa Rickettsiose, devemos resumir em quadros os resultados da reacção praticada no Instituto Bacteriologico com soros de doentes e consignados nas observações clinicas de J. T. Piza (8).

Reacção de Weil-Felix na infecção humana pelo "Typho exanthematico de S. Paulo"

Os resultados da reacção com o *Proteus* X19 praticada com soros de doentes, em differentes periodos da infecção, estão consignados no Quadro I.

(*) Segundo trabalho recente, A. de Assis (Brasil Medico XLVIII (15) :253.1934), não observou em nenhum dos anti-soros OXL acção agglutinante sensivel em relação a OXK, não tendo sido possivel, assim, encontrar a rigorosa correspondencia, affirmada por Felix, entre os anti-soros OXL preparados em coelhos e os soros dos doentes de «Typho exanthematico de S. Paulo», relativamente á agglutinação da variante OXK.

QUADRO I

Resultados da raecção de Weil-Felix para o *Proteus* X19 com soros de doentes de "typho exanthematico" de S. Paulo.

Soro e n.º da observação	Dias da doença e titulos de agglutinação para o *Proteus* X19																								Resultados da R. de Widal			Hemocultura	Resultados das inoculações em cobaias	Observações
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	22	24	25	32	35	38	?	T	A	B			
1929																															
1-497P.2									0		320		640													0	0	0	0		† 15° dia
2-501P.2					160				640				(.) 1280													100	0	0	0	+	† 14° dia
3-519P.3								40	40	80																0	0	0	0		† 11° dia
4-519P.2								160			320															0	0	0	0	+	† 12° dia
5-520P.3							100																			0	0	0	0		† 9° dia
6-520P.2		0	0		0																					0	0	0	0	+	† 6° dia
7-533P.3			40																							0	0	0	0		† 4° dia
8-535P.2										100					800			10000								0	0	0	0		Alta - sem exanth.
9-537P.2				40			100																			0	0	0	0	+	† 8° dia
10-538P.2				80																						0	0	0	0	+	† 5° dia
11-548P.2			50			200		200		800																0	0	0	0	+	† 11° dia
12-553P.2					0																					0	0	0	0		† 7° dia
13-555P.2		0																								50	0	0	0		† 5° dia
14-564P.2									800																	0	0	0	0		† 10° dia
15-580P.2		100			50	0																				200	100	100	0		† 7° dia
1930																															
16- 9P.2	0		0																							0	0	0	0		† 7° dia
17- 39P.2				0		0																				0	0	0	0		† 7° dia
18-123P.2				800			3200			(.)12800								25600		30000						0	0	0	0		Alta
19-158P.2					100				200																	0	0	0	0		† 12° dia
20-266P.2				0																						0	0	0	0		† 6° dia
21-472P.3								0		0																0	0	0	0		† 12° dia
22-487P.3							50				3200				6400								3200			50	0	0	0		Alta
23-307P.2							0		0																	0	0	0	0		† 11° dia
24-310P.2	0																									0	0	0	0	+	† 6° dia
25-360P.2							0				400				800											0	0	0	0		Alta
26-618P.3													800					2000		1500						200	0	0	0		Alta
27-689P.3											400				3200							2000	3200			0	0	0	0		Alta
28-438P.2					100													6400								0	0	0	0		Alta
29-440P.2			0																							0	0	0	0		† 6° dia
30-441P.2			400																							0	0	0	0		† 5° dia
31-732P.2				0			200																			0	0	0	0	+	† 9° dia
32-472P.2				0																						0	0	0	0		† 6° dia
33-475P.2								0		100		1000														0	0	0	0		† 15° dia
34-789P.3								0			0		0								0		0			0	0	0	0		Alta
35-801P.3								0																		50	0	0	0		† 13° dia
1931																															
36- 13P.3					0																					0	0	0	0		† 6° dia
37- 19P.2			0																							—	0	0	0	+	† 5° dia
38- 26P.3			0																							50	0	0	0	+	† 6° dia
39- 31P.3															100					100						0	0	—	0		Alta
40- 44P.2								200			1600															0	0	0	0		† 13° dia
41- 74P.2							200																			12800	0	0	0	0		Alta
42- 12P.4														8000													0	0	0	0		
43-178P.2																										0	0	0	0	0		† ?
44-181P.2				100		50																					0	0	0	0		† 7° dia
45-469P.3							100																				—	—	—	—		† 8° dia
46-469P.3						500																					0	0	0	0		† 8° dia
47-255P.2											0																0	0	0	0	+	† 12° dia
48-523P.3				0																							0	0	0	0		† 7° dia
49-579P.3				50																							0	0	0	0	+	† 6° dia
50-288P.2	0			0						100																	50	0	0	0		Alta
51-297P.2														2500													200	0	50	—		† 17° dia
52-307P.2			100																								0	50	100	—		† 5° dia
53-318P.2		200																									0	0	0	0		† 6° dia
54-325P.2	100			800										. 3200													0	0	0	0		Alta
55-326P.2		0		800											1600												0	0	0	0		Alta
56-337P.2			200																								0	0	0	0		† 6° dia
57-344P.2					400					800										6400							0	0	0	0		Alta
58-345P.2							6400																				0	0	0	0		
59-346P.2							800				( ) 6400																0	0	0	—		Alta
60-361P.2						400																					0	0	0	0		†

(*) Ultima diluição praticada.

NOTA: Quadro organizado de accordo com os resultados obtidos no Instituto Bacteriologico e requisitados nas observações clinicas de J. T. Pira.

QUADRO I

Resultados da raecção de Weil-Felix para o *Proteus* X19 com soros de doentes de "typho exanthematico" de S. Paulo.

Soro e n.º da observação	Dias da doença e titulos de agglutinação para o *Proteus* X19																									Resultados da R. de Widal			Hemocultura	Resultados das inoculações em cobaias	Observações
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	22	24	25	32	35	38	?	T	A	B			
1929																															
1-497P.2									0		320		640													0	0	0	0		† 15° dia
2-501P.2					160				640				(.) 1280													100	0	0	0	+	† 14° dia
3-519P.3								40	40	80																0	0	0	0		† 11° dia
4-519P.2								160			320															0	0	0	0	+	† 12° dia
5-520P.3							100																			0	0	0	0		† 9° dia
6-520P.2		0	0		0																					0	0	0	0	+	† 6° dia
7-533P.3			40																							0	0	0	0		† 4° dia
8-535P.2										100					800			10000								0	0	0	0		Alta - sem exanth.
9-537P.2				40			100																			0	0	0	0	+	† 8° dia
10-538P.2				80																						0	0	0	0	+	† 5° dia
11-548P.2			50			200		200		800																0	0	0	0	+	† 11° dia
12-553P.2					0																					0	0	0	0		† 7° dia
13-555P.2		0																								50	0	0	0		† 5° dia
14-564P.2									800																	0	0	0	0		† 10° dia
15-580P.2		100			50	0																				200	100	100	0		† 7° dia
1930																															
16- 9P.2			0		0																					0	0	0	0		† 7° dia
17- 39P.2				0		0																				0	0	0	0		† 7° dia
18-123P.2				800			3200			(.)12800							25600		30000							0	0	0	0		Alta
19-158P.2						100			200																	0	0	0	0		† 12° dia
20-266P.2				0																						0	0	0	0		† 6° dia
21-472P.3								0		0																0	0	0	0		† 12° dia
22-487P.3							50				3200				6400								3200			50	0	0	0		Alta
23-307P.2							0		0																	0	0	0	0		† 11° dia
24-310P.2			0																							0	0	0	0	+	† 6° dia
25-360P.2							0				400				800											0	0	0	0		Alta
26-618P.3													800					2000			1500					200	0	0	0		Alta
27-689P.3											400					3200						2000		3200		0	0	0	0		Alta
28-438P.2						100											6400									0	0	0	0		Alta
29-440P.2				0																						0	0	0	0		† 6° dia
30-441P.2				400																						0	0	0	0		† 5° dia
31-732P.2					0			200																		0	0	0	0	+	† 9° dia
32-472P.2					0																					0	0	0	0		† 6° dia
33-475P.2								0		100		1000														0	0	0	0		† 15° dia
34-789P.3								0			0		0													0	0	0	0		Alta
35-801P.3								0																		50	0	0	0		† 13° dia
1931																															
36- 13P.3					0																					0	0	0	0		† 6° dia
37- 19P.2				0																						—	0	0	0	+	† 5° dia
38- 26P.3				0																						50	0	0	0	+	† 6° dia
39- 31P.3														100					100							0	0	—	0		Alta
40- 44P.2								200			1600															0	0	0	0		† 13° dia
41- 74P.2							200																		12800	0	0	0	0		Alta
42- 12P.4														8000												0	0	0	0		
43-178P.2																									0	0	0	0	0		† ?
44-181P.2				100		50																				0	0	0	0		† 7° dia
45-469P.3							100																			—	—	—	—		† 8° dia
46-469P.3						800																				0	0	0	0		† 8° dia
47-255P.2											0															0	0	0	0	+	† 12° dia
48-523P.3				0																						0	0	0	0		† 7° dia
49-579P.3				50																						0	0	0	0	+	† 6° dia
50-288P.2	0			0						100																50	0	0	0		Alta
51-297P.2														2500												200	0	50	—		† 17° dia
52-307P.2			100																							0	50	100	—		† 5° dia
53-318P.2		200																								0	0	0	0		† 6° dia
54-325P.2	100			800																						0	0	0	0		Alta
55-326P.2		0		800											1600											0	0	0	0		Alta
56-337P.2			200																							0	0	0	0		† 6° dia
57-344P.2					400					800										6400						0	0	0	0		Alta
58-345P.2							6400																			0	0	0	0		
59-346P.2							800				(.) 6400															0	0	0	—		Alta
60-361P.2						400																				0	0	0	0		†

(*) Ultima diluição praticada.

Nota: Quadro organizado de accordo com os resultados obtidos no Instituto Bacteriolo gico e requisitados nas observações clinicas de J. T. Pira.

Num total de 60 doentes, os resultados foram positivos em 41 (sendo em 4 em titulos inferiores a 1/100) e negativos em 19: percentagem de 68,3 de positivos e 31,6 de negativos.

Nas differentes phases da infecção, subdividida em periodos de 5 dias, e somente registando os casos em que a reacção foi praticada nos respectivos periodos, obtêm-se os seguintes dados:

Reacções praticadas nos 5 primeiros dias:

Numero de casos	24	
Resultados positivos.	14 . . .	58.3 %
Resultados negativos.	10 . . .	41.6 %

Reacções praticadas do 6.º ao 10.º dia:

Numero de casos	36	
Resultados positivos.	22 . . .	61,1 %
Resultados negativos.	14 . . .	38.8 %

Reacções praticadas do 11.º ao 15.º dia:

Numero de casos	23	
Resultados positivos.	20 . . .	86,9 %
Resultados negativos.	3 . . .	13,0 %

Reacções praticadas do 16.º ao 20.º dia:

Numero de casos	8	
Resultados positivos.	8 . . .	100 %
Resultados negativos.	0 . . .	0 %

Reacções praticadas do 21.º dia em diante:

Numero de casos	9	
Resultados positivos.	7 . . .	77.7 %
Resultados negativos.	2 . . .	22,2 %

Analysando as percentagens registadas, verifica-se uma curva ascendente de resultados positivos, attingindo um maximo em periodo correspondente do 16.º ao 20.º dia da infecção, tendendo a decrescer em seguida. Uma curva em sentido opposto observa-se com os resultados negativos.

Um estudo mais attento do Quadro I faz resaltar um facto significativo e de importancia: o prognostico foi mais favoravel em quasi todos os casos em que a agglutinação foi positiva e attingiu titulos elevados; nestes se verificou a alta dos doentes. Todos os outros casos, em que estes factos não se verificaram, tiveram exito fatal, muito embora se possa attribuir esse resultado a uma evolução mais rapida e fulminante da infecção.

Na pratica da reacção de Weil-Felix, o emprego dos differentes typos de *Proteus* X, é de grande importancia e, segundo Felix (7), serviria para a distincção antigenica dos virus correspondentes.

Felix (6), estudando uma serie de soros que lhe foram daqui remettidos, obteve, relativamente aos *Proteus* OX19, OX2 e OXK, os resultados consignados no Quadro II:

QUADRO II

Soros (*)	Titulo de agglutinação com *Proteus*		
	OX19	OX2	OXK
1	20.000	0	200
2	2.000	0	500
3	200	0	200
4	10.000	100	100
5	20.000	0	200
6	2.000	0	0
7	5.000	0	100
8	5.000	0	0
9	5.000	100	0

(*) A correspondencia dos numeros da maioria destes soros com os respectivos casos clinicos consta do trabalho de Carvalho Lima (5).

Estes resultados são concordes com os que obtivemos e cujos soros remettemos tambem a Felix.

Carvalho Lima (5), praticando a reacção em soros de varios doentes com esses typos de *Proteus* X e com o typo que isolou, *Proteus* XL, empregando as respectivas variantes O e HO, obteve com este ultimo typo resultados na maioria positivos, sendo os titulos registados um pouco inferiores aos obtidos com o *Proteus* X19. Com o typo XK a percentagem dos seus resultados positivos foi menor.

Reacção de Weil-Felix na infecção experimental pelo virus do "Typho exanthematico de S. Paulo". Resultados comparativos com a Febre maculosa das Montanhas Rochosas

Entrando na parte principal desta contribuição, vamos assignalar os resultados obtidos com a reacção de Weil-Felix que praticamos com soros de animaes (macaco, coelho, cobaia) inoculados com o virus de S. Paulo, mostrando, comparativamente, os que obtivemos em alguns animaes inoculados com virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Technica e methodo de estudo

Soros — Os soros de animaes, provenientes de sangrias feitas em differentes periodos, eram separados por centrifugação, empolados, convenientemente rotulados com os numeros e datas respectivas e conservados em frigorifico até o momento da prova.

Proteus X — As differentes amostras de *Proteus* X, em suas variantes HO e O eram conservadas segundo as recommendações que Felix gentilmente nos enviou. De tempos em tempos praticavamos o reisolamento das colonias em placas de agar, isto sempre que se suspeitava a reversão O ⟶ HO. A variante O era conservada em tubos de agar perfeitamente secco, sem agua de condensação, o que difficulta essa reversão.

Reacção — Os soros eram diluidos em agua physiologica e a emulsão microbiana obtida de cultura em agar commum de 24 horas. A leitura dos resultados era feita após 2 horas de permanencia dos tubos em banho-maria a 37° e, em definitivo, após 18 - 24 horas de temperatura do laboratorio. Por esta ultima leitura poder-se-á ter uma idéa exacta quanto ás agglutininas do typo O, especificas, muitas vezes não reveladas naquelle periodo.

Resultados das experiencias

Reacções praticadas com soros de cobaias inoculadas com o virus do "Typho exanthematico de S. Paulo"

Com estes animaes foram feitas duas series de experiencias: a) reacções com soros colhidos durante a reacção febril; b) reacções com soros colhidos em differentes dias após a reacção febril.

Resultados durante a reacção febril (Quadro III) — As reacções foram feitas com soros obtidos de sangrias praticadas do 3.° ao 6.° dia de reacção febril. Os resultados com os differentes typos de *Proteus* X são resumidos no Quadro III.

Verificam-se reacções positivas (titulo até 1/100) somente com a amostra XK, resultados que não são especificos visto serem obtidos da mesma forma com soros de cobaias normaes.

Resultados após a reacção febril (Quadro IV) — Nesta serie as cobaias foram sangradas desde o 2° ao 53° dia após a reacção febril e os resultados estão resumidos no Quadro IV.

Não levando em consideração os resultados com o *Proteus* XK, pelo motivo acima exposto, verifica-se, pelo quadro dos resultados desta serie, que em 18

soros de cobaias sangradas em differentes periodos, 6 deram reacção positiva, em titulos acima de 1/25, com o *Proteus* OX19; 5 com o OX2 e 5 com o OXL, tendo com este typo sido feitas reacções com soros de 12 cobaias somente.

Com alguns soros (cobaias N.os 898 e 896) obtivemos titulos elevados (até 1/1600) com os *Proteus* OX19 e OXL e 1/100 com o OX2. Não encontramos uma explicação que satisfaça plenamente na interpretação dos resultados obtidos com estes dois ultimos soros assignalados. Talvez se poderiam attribuir a uma infecção anterior ou concomitante dos animaes com algum *Proteus;* todavia, o facto de serem do typo O as agglutininas verificadas torna pouco provavel essa hypothese. Como para certos auctores o *Proteus* X seria uma evolução das Rickettsias, poder-se-ia pensar que nessas duas cobaias essa evolução se tenha processado. Kuczynski e Anigstein, usando meios especiaes, affirmam ter isolado o *Proteus* X de animaes infectados experimentalmente, porém as tentativas de Felix (7) têm sido negativas neste particular.

Dos resultados desta serie pode-se ver que os soros de algumas cobaias apresentam, na convalescença dos animaes, agglutininas provavelmente especificas para os typos de *Proteus* X19, X2 e XL.

Resultados com soros de algumas cobaias inoculadas com virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas (Quadro V) — Reunimos no Quadro V os resultados de algumas reacções praticadas com soros de cobaias sangradas durante e após a reacção febril. Verificam-se resultados em geral negativos, não se levando em conta os com o XK, não especificos na cobaia. Apenas 1 soro de cobaia, sangrada após maior periodo e cuja infecção teve uma incubação mais longa, mostrou um resultado positivo, em titulo a 1/80 com o *Proteus* X19.

Reacções praticadas com soros de macacos e coelhos inoculados com o virus do "Typho exanthematico de S. Paulo"

Resultados durante e após a reacção febril (Quadro VI) — Nesta serie são registados os resultados obtidos com soros de animaes sangrados após o periodo de reacção febril (coelhos) e do ultimo dia de reacção (macaco). Alguns dos coelhos haviam sido reinoculados com o virus.

Observa-se uma maioria de resultados positivos (titulos de 1/50 e 1/100) com os typos de *Proteus* X19 e XL e menor numero com o X2. Para melhor juizo a respeito da presença de agglutininas nos soros dos coelhos, praticámos as experiencias descriptas em seguida.

Resultados com soros de coelhos inoculados com os virus de S. Paulo e da Febre Maculosa e sangrados em differentes periodos (Quadro VII e Graphico I) — Sendo o coelho o animal de escolha para o estudo da variedade antigenica dos differentes virus das Rickettsioses, de accordo com os trabalhos, principal-

QUADRO III

Reacção de Weil-Felix com soros de cobaias infectadas com o virus de S. Paulo. Sangrias praticadas durante a reacção febril.

N.º da cobaia	Marcha da infecção		Sangria		Titulos de agglutinação com *Proteus*							
	Incubação	Reac. febril	Data	N.º de dias após inoculação	HX19	OX19	HX2	OX2	HXK	OXK	HXL	OXL
505	2 dias	3 dias	18-XI-31	5	0	0	0	0	100	50	—	—
464	3 »	3 »	28-X-31	6	0	0	0	0	50	100	—	—
706	1 »	5 »	18-IV-32	6	0	0	0	0	100	100	0	0
304	3 »	3 »	19-VIII-31	6	0	0	0	0	100	50	0	0
268	3 »	5 »	17-VI-31	7	0	0	0	0	100	100	—	—
325	3 »	4 »	21-VIII-31	7	0	0	0	0	100	50	—	—
366	3 »	4 »	16-IX-31	7	0	0	0	0	100	100	—	—
386	3 »	5 »	24-IX-31	8	0	0	0	0	100	50	0	0
866	4 »	5 »	26-X-31	9	0	0	0	0	100	100	0	0
897	4 »	5 »	18-XI-32	9	0	0	0	0	100	100	0	0
278	5 »	4 »	10-VII-31	9	0	0	0	0	100	50	—	—
385	5 »	4 »	24-IX-31	9	0	0	0	0	100	50	—	—
919	4 »	6 »	13-XII-32	10	0	0	0	0	100	100	0	0
Cobaias normaes												
1	—	—	—	—	0	0	0	0	100	100	—	—
2	—	—	—	—	0	0	0	0	100	100	—	—
3	—	—	—	—	0	0	0	0	100	100	—	—

Legenda: O = negativo desde a diluição a $^1/_{25}$.
— = reacção não praticada.
Os numeros indicam os titulos maximos da agglutinação.

QUADRO IV

Reacção de Weil-Felix com soros de cobaias infectadas com o virus de S. Paulo. Sangrias praticadas em differentes periodos após a reacção febril.

Nº da cobaia	Marcha da infecção		Sangria		Titulos de agglutinação com *Proteus*								Observações
	Incubação	Reac. febril	Data	Nº de dias após a reac. febril	HX19	OX19	HX2	OX2	HXK	OXK	HXL	OXL	
868	1 dia	8 dias	31-X-32	2	25	25	0	0	25	50	100	100	
894	19 dias	2 »	30--XI-32	2	0	25	0	25	25	25	25	0	Infecção atypica.
258	3 »	6 »	23-VII-31	3	0	0	0	0	100	50	0	0	
901	3 »	6 »	26-XII-31	3	25	0	25	0	100	100	0	0	
898	6 »	6 »	24-XI-32	3	1600	1600	100	100	100	100	1600	800	
878	5 »	4 »	30-XI-32	3	0	0	0	0	100	100	0	0	
885	4 »	6 »	9-XII-32	3	100	100	25	25	100	100	200	200	Picada por *Amblyomma* e reinocul. virus.
896	6 »	4 »	24-XI-32	5	800	1600	100	100	100	100	1600	800	
911	6 »	6 »	9-XII-32	5	0	0	0	0	100	100	0	0	
907	7 »	6 »	9-XII-32	7	0	0	0	0	100	100	0	0	
282	4 »	6 »	20-VII-31	8	25	200	50	100	100	100	—	—	
941	6 »	8 »	2-II-32	14	0	0	0	0	100	100	0	0	
928	4 »	2 »	13-I-33	20	0	0	0	0	100	100	0	0	Inf. ligeira. Reinocul. virus 7 dias antes.
206	2 »	5 »	26-VI-31	22	0	0	0	0	100	100	—	—	
217	—	—	28-VII-31	29	0	0	0	0	50	50	—	—	Em exp. de vaccinação. Reinocul. com virus. Immune.
231	5 dias	5 dias	31-VI-31	30	0	0	0	0	100	50	50	25	Reinocul. com o virus 21 dias antes. Immune.
326	2 »	9 »	25-X-31	35	0	0	0	0	100	100	—	—	
329	3 »	8 »	25-X-31	53	0	0	0	0	100	50	—	—	Reinocul. com o virus 39 dias antes. Immune.
218	—	—	27-X-31	139	0	0	0	0	100	100	—	—	Em exp. de vaccinação. Reinocul. com virus. Immune.
Cobaias normaes													
4	—	—	—	—	0	0	0	0	100	50	—	—	
5	—	—	—	—	0	0	0	0	100	100	—	—	
6	—	—	—	—	0	0	0	0	100	100	—	—	

Legenda: O = negativo desde a diluição a $^1/_{25}$.
— = reacção não praticada.
Os numeros indicam os titulos maximos da agglutinação.

QUADRO V

Reacção de Weil-Felix com soros de cobaias infectadas com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas. Sangrias praticadas durante e após a reacção febril.

N.º da cobaia	Marcha da infecção		Sangria		Titulos de agglutinação com *Proteus*							
	Incubação	Reac. febril	Data	N.º de dias após a inoculação	HX19	OX19	HX2	OX2	HXK	OXK	HXL	OXL
1117	4	2	14-VI-33	6	0	0	0	0	80	80	0	0
1271	3	5	27-IX-33	9	0	0	0	0	40	40	0	0
1283	3	4	5-X-33	10	20	10	10	10	40	40	20	10
1280	5	4	5-X-33	12	0	0	0	0	80	80	0	0
1281	3	6	5-X-33	12	0	0	0	0	40	40	0	0
1215	3	5	5-X-33	22	0	0	0	0	80	80	0	0
1260	11	6	5-X-33	24	80	80	0	0	80	80	40	20
1212			21-VIII-33		0	0	0	0	80	80	0	0

QUADRO VI

Reacção de Weil-Felix com soros de macacos *rhesus* e coelhos infectados com o virus de S. Paulo. Sangrias praticadas durante e em differentes periodos após a reacção febril.

N.º do animal	Marcha da infecção		Sangria		Titulos de agglutinação com *Proteus*								Observações
	Incubação	Reac. febril	Data	N.º de dias após a inoculação	HX19	OX19	HX2	OX2	HXK	OXK	HXL	OXL	
Rhesus 3	2	4	27-V-31	6	0	0	0	0	50	0	0	0	
Rhesus 3	4	4	20-II-31	8	0	50	0	0	0	0	—	—	
Coelho 23	5	5	28-XI-31	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
Coelho 14	3	6	28-V-31	14	0	100	0	100	0	0	100	50	
Coelho 8	2	5	28-V-31	26	0	100	0	0	0	0	100	50	
Coelho 10	5	7	28-V-31	26	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sauá (?) 2	1	11	16-VII-31	34	50	100	0	0	100	0	100	50	
Coelho 12	14	3	28-V-31	42	0	100	50	100	0	0	50	0	
Coelho 11	3	6	28-V-31	45	0	50	0	50	0	0	—	—	
Coelho 9	3	7	28-V-31	51	0	0	0	0	0	0	50	0	
Coelho 7	3	6	28-V-31	58	0	50	0	0	0	0	50	100	Reinocul. com virus 29 dias antes. Immune.
Rhesus 10	—	—	25-VIII-31	83	0	50	0	0	0	0	—	—	Reinocul. com virus 30 dias antes. Immune.
Coelhos normaes													
1	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	

Legenda: O = negativo desde a diluição a $^1/_{25}$.
— = reacção não praticada.
Os numeros indicam os titulos maximos da agglutinação.

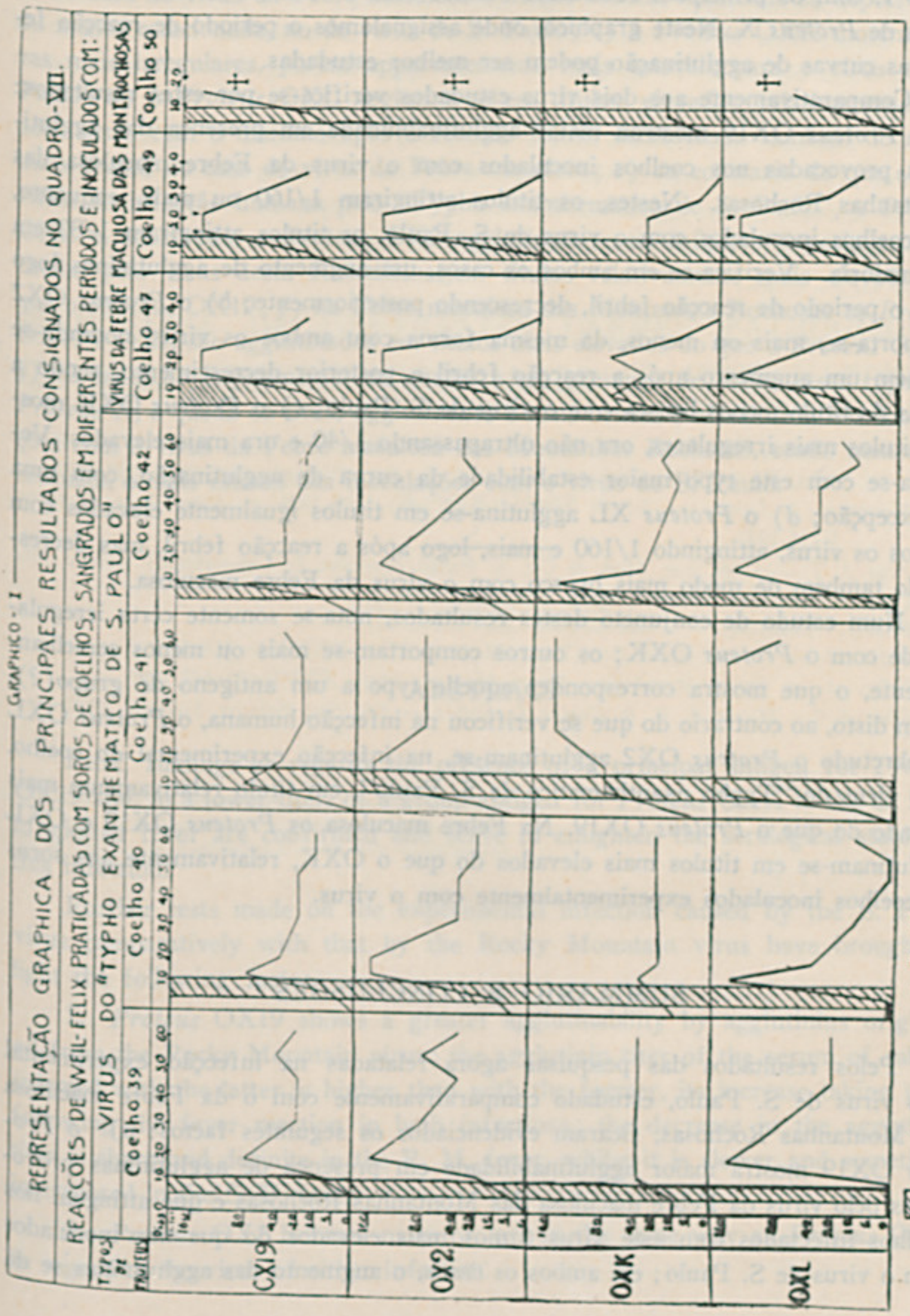
QUADRO VII

Resultados comparativos da reacção de Weil-Felix com sôros de coelhos inoculados com os virus do "Typho exanthematico de São Paulo" e da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Sangrias praticadas successivamente em diversos periodos da infecção e após a reacção febril.

N.º do coelho	Typho exanth. de S. Paulo Marcha da infecção		F. maculosa Mont. Rochosas. Marcha da infec.		Sangrias		Titulos de agglutinação com *Proteus*								Observações
	Dias de incubação	Dias de r. febril	Dias de incubação	Dias de r. febril	Datas	N.º de dias após a inoculação	HX19	OX19	HX2	OX2	HXK	OXK	HXL	OXL	
39	5	5	—	—	25-XI-32	0	0	0	0	0	5	10	0	0	Reinoculado com virus após 40 dias da 1.ª inoculação, mostrando-se immune.
					30-XI-32	5	5	0	5	5	10	10	0	0	
					6-XII-32	11	10	10	20	20	40	40	10	0	
					13-XII-32	18	80	80	160	160	40	40	160	160	
					26-XII-32	31	20	20	80	80	20	40	80	80	
					13-I-33	48	20	20	40	40	20	40	20	20	
					20-I-33	55	40	40	40	80	20	40	20	20	
					27-I-33	62	10	20	20	40	10	40	10	20	
40	4	6	—	—	25-XI-32	0	5	0	5	5	10	10	0	0	idem
					30-XI-32	5	5	5	10	10	10	20	0	0	
					6-XII-32	11	80	80	160	160	20	40	80	160	
					13-XII-32	18	40	40	80	160	20	20	40	40	
					26-XII-32	31	20	20	20	40	20	20	20	10	
					13-I-33	48	20	20	20	40	10	20	10	0	
					20-I-33	55	20	10	10	20	20	20	10	0	
					27-I-33	62	10	10	10	20	10	20	10	10	
41	8	8	—	—	25-XI-32	0	0	0	5	5	5	5	0	0	idem
					30-XI-32	5	10	10	10	20	20	20	20	10	
					6-XII-32	11	80	80	80	160	40	80	160	160	
					13-XII-32	18	40	40	160	160	80	80	160	160	
					26-XII-32	31	20	20	160	80	160	160	160	160	
					13-I-33	48	20	20	160	80	160	160	80	160	
					20-I-33	55	40	20	160	80	160	160	80	160	
					27-I-33	62	80	40	160	80	160	160	80	80	
42	5	5	—	—	25-XI-32	0	0	0	5	5	5	5	0	0	idem
					30-XI-32	5	10	20	10	20	20	20	10	0	
					6-XII-32	11	160	160	40	80	80	160	—	—	
					13-XII-32	18	40	40	160	160	20	40	160	160	
					26-XII-32	31	40	40	40	80	20	20	80	40	
					13-I-33	48	20	20	20	20	10	10	40	40	
					20-I-33	55	20	20	40	40	20	20	20	10	
					27-I-33	62	10	10	20	40	10	10	20	20	
43	6	5	—	—	25-XI-32	0	0	0	0	10	10	10	—	—	Morto por infecção intercorrente, 48 dias após a 1.ª inoculação.
					30-XI-32	5	0	0	0	20	10	10	10	0	
					6-XII-32	11	10	20	10	20	20	20	20	0	
					13-XII-32	18	40	80	40	40	80	80	—	—	
					26-XII-32	31	10	20	20	40	40	40	—	—	
47	—	—	2	10	12-IX-33	0	5	5	0	0	0	5	0	0	
					19-IX-33	7	20	20	20	10	40	80	20	20	
					26-IX-33	14	> 160	> 160	160	160	20	20	> 160	> 160	
					3-X-33	21	160	> 160	> 160	> 160	40	80	80	80	
					10-X-33	28	10	40	10	10	10	10	40	20	
					17-X-33	35	40	10	0	0	0	0	5	5	
48	—	—	3	5	12-IX-33	0	5	5	0	0	10	10	5	5	Amanheceu morto no 11.º dia após inoculação.
					19-IX-33	7	20	20	10	20	40	40	20	20	
49	—	—	5	7	12-IX-33	0	0	0	0	0	5	5	0	0	
					19-IX-33	7	20	20	0	0	20	40	10	20	
					26-IX-33	14	> 160	> 160	160	160	40	40	> 160	> 160	
					3-X-33	21	160	160	160	160	40	40	160	> 160	
					10-X-33	28	80	80	10	10	0	10	80	40	
					17-X-33	35	20	20	0	10	0	0	10	10	
50	--	—	4	5	12-IX-33	0	5	5	0	0	5	5	0	0	Morto por accidente após a 3.ª sangria.
					19-IX-33	7	40	20	10	10	20	20	20	20	
					26-IX-33	14	160	160	80	80	40	20	80	80	

mente, de A. Felix (6), resolvémos, em nova serie de experiencias, praticar as reacções com soros destes animaes inoculados com o virus de S. Paulo e sangrados em periodos successivos. A titulo de comparação fizemos a mesma verificação em coelhos inoculados com o virus da Febre maculosa.



O Quadro VII resume os resultados obtidos com 5 coelhos inoculados com o virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" e 4 com o da Febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Para melhor interpretação dos resultados consignados, organizámos o Graphico I, com os principaes resultados obtidos com a variante O dos differentes typos de *Proteus* X. Neste graphico, onde assignalamos o periodo de reacção febril, as curvas de agglutinação podem ser melhor estudadas.

Comparativamente aos dois virus estudados verifica-se por estes resultados: *a*) o *Proteus* OX19 mostrou maior agglutinabilidade em presença das agglutininas provocadas nos coelhos inoculados com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas. Nestes, os titulos attingiram 1/160 ou mais, enquanto, nos coelhos inoculados com o virus de S. Paulo, os titulos attingiram 1/80 em sua maioria. Verifica-se em ambos os casos, um augmento de agglutininas logo após o periodo de reacção febril, decrescendo posteriormente; *b*) o *Proteus* OX2 comporta-se, mais ou menos, da mesma forma com ambos os virus, notando-se tambem um augmento após a reacção febril e posterior decrescimento, sendo a queda do titulo menos brusca com o virus de S. Paulo; *c*) o *Proteus* OXK mostra titulos mais irregulares, ora não ultrapassando 1/40 e ora mais elevados. Verifica-se com este typo maior estabilidade da curva de agglutinação, com uma só excepção; *d*) o *Proteus* XL agglutina-se em titulos igualmente elevados com ambos os virus, attingindo 1/160 e mais, logo após a reacção febril, mas decrescendo tambem de modo mais brusco com o virus da Febre maculosa.

Num estudo de conjuncto destes resultados, nota-se somente certa irregularidade com o *Proteus* OXK; os outros comportam-se mais ou menos semelhantemente, o que mostra corresponder aquelle typo a um antigeno de grupo(?). Alem disto, ao contrario do que se verificou na infecção humana, o *Proteus* OXL e sobretudo o *Proteus* OX2 agglutinam-se, na infecção experimental do coelho, pelo virus do "Typho exanthematico de S. Paulo", em titulo relativamente mais elevado do que o *Proteus* OX19. Na Febre maculosa os *Proteus* OX19 e OXL agglutinam-se em titulos mais elevados do que o OXK, relativamente aos soros de coelhos inoculados experimentalmente com o virus.

SUMMARIO E CONCLUSÕES

Pelos resultados das pesquisas agora relatadas na infecção experimental pelo virus de S. Paulo, estudado comparativamente com o da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, ficaram evidenciados os seguintes factos: *a*) o *Proteus* OX19 mostra maior agglutinabilidade em presença de agglutininas provocadas pelo virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas e que attingem nos coelhos infectados com este virus titulos mais elevados do que nos inoculados com o virus de S. Paulo; em ambos os casos, o augmento das agglutininas se dá

após a reacção febril; queda brusca do titulo, após certo periodo, na Febre maculosa e menos brusca, mantendo-se depois mais ou menos estacionada, no "Typho de S. Paulo"; *b*) o *Proteus* OX2 comporta-se de modo mais ou menos semelhante relativamente á infecção desse animal por ambos os virus, com queda mais brusca no caso do virus da Febre maculosa e menos brusca, mantendo-se depois mais ou menos estacionada, no do virus de S. Paulo; *c*) o *Proteus* OXK mostra curvas mais irregulares, porem apparentemente mais estaveis para o virus de S. Paulo; *d*) o *Proteus* OXL agglutina-se em titulos elevados relativamente aos dois virus, com o maximo após a reacção febril, decrescendo tambem de modo mais brusco no caso do virus da Febre maculosa; *e*) ao contrario do que se verifica na infecção humana pelo "Typho exanthematico de S. Paulo", o *Proteus* OXL e, sobretudo, o *Proteus* OX2 agglutinam-se na infecção experimental do coelho pelo virus desta Rickettsiose,em titulos relativamente mais elevados do que o *Proteus* OX19; *f*) na Febre maculosa das Montanhas Rochosas os *Proteus* OX19 e OXL são agglutinados em titulos mais elevados do que o *Proteus* OXK; *g*) na infecção experimental do coelho e em presença de todos esses typos de *Proteus* X, a queda do titulo agglutinante é mais brusca e accentuada nas inoculações com o virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, sendo menos accentuada e mais estavel nas inoculações com o virus de S. Paulo.

ABSTRACT

Felix' findings as regards the presence of a principal antigen for *Proteus* OX19 and, in a lower titer, of a group antigen for *Proteus* OXK in the S. Paulo spotted fever are confirmed and serve to enlighten the serological status of this infection.

Further tests made on the experimental infection caused by the S. Paulo virus comparatively with that by the Rocky Mountain virus have brought to light the following facts:

1. *Proteus* OX19 shows a greater agglutinability by agglutinins originated from the Rocky Mountain virus; the agglutinin titer of the serum of rabbits infected with the latter is higher than with the former, its increase taking place following the fever reaction in both infections; the decrease in the agglutinin titer is sharp and definite in the R. M. fever, whilst it is slower and sometimes interrupted in the S. P. fever.

2. *Proteus* OX2 behaves more or less in the same way as *Proteus* OX19 in regard to the virus of either infection.

3. The curves of the agglutinin titer as regards *Proteus* OXK are more irregular but apparently more stable in the case of the S. P. virus.

4. The agglutinin titer of *Proteus* OXL is relatively high in both fevers, but it decreases also more sharply and definitely in the case of the R. M. virus.

5. The titer for *Proteus* OXL and particularly for *Proteus* OX2 is relatively higher than for *Proteus* OX19 in the rabbit experimental infection caused by the virus of the S. P. spotted fever, the opposite being found in the human infection by the same virus.

6. The titer for *Proteus* OX19 and for *Proteus* OXL is higher than for *Proteus* OXK in the case of the R. M. virus. In the rabbit experimental infection the decrease of the agglutinin titer for all these types of *Proteus* X is consistently sharper and more definite in regard to the R. M. virus than in regard to the S. P. virus.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Piza, J. T.; Salles Gomes, F. e L.; Fleury, J. P.; Meyer, J. R.; Castro, J. O.; Rodrigues, C. & Lima, H. da Rocha* — C. R. Soc. Biologie CVI(11):1020.1931.
2. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil Medico XLV(47):1109.1931 *et* Mem. Inst. Butantan VI:3.1931.
3. *Piza, J. T.* — Com. Soc. Med. & Cir. S. Paulo (Semana de Laboratorio) janeiro 1932.
4. *Lima, F. de O.* — These apres. á Fac. Med. Bahia. 1932.
5. *Lima, J. Carvalho* — Brasil Medico XLVII(4):64.1933.
6. *Felix, A.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hyg. XXVI(4):365.1933.
7. *Felix, A.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hyg. XXVII(2):147.1933.
8. *Piza, J. T.; Meyer, J. R. & Gomes, L. Salles* — Ed. Soc. Editora Paulista. 1932.

(Trabalho das Secções de Immunologia e Virus do Instituto Butantan, apresentado ao 2.º Congresso Medico Paulista em novembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934)

RESISTENCIA DE DIFFERENTES GERMES PATHOGENICOS EXPERIMENTALMENTE ASSOCIADOS AO VIRUS VACCINICO

POR

R. GODINHO

(*com* 1 *gravura no texto*)

614.521+589.95

RESISTENCIA DE DIFFERENTES GERMES PATHOGENICOS EXPERIMENTALMENTE ASSOCIADOS AO VIRUS VACCINICO

POR

R. GODINHO

O descobrimento de Edward Jenner, em 1798, conseguindo immunizar o homem contra a variola por inoculação directa do *cow pox*, assignala uma era que pode perfeitamente ser denominada *era Jenneriana*, distincta, por sua vez, de duas outras: a *era pre-jenneriana*, cuja caracteristica principal é o emprego da variolização e a *era post-jenneriana*, que corresponde ao uso do virus vaccinico preservado no laboratorio depois de cultura no organismo animal.

Durante a *era pre-jenneriana* só se conhecia e praticava a variolização, isto é, a passagem do virus da variola de individuo a individuo, visando a transmissão da doença em caracter mais attenuado. Infelizmente, o recurso prophylactico servia tambem para facilitar a propagação das grandes epidemias de variola que varreram todos os cantos da terra. Todavia, de sua pratica intensiva, abrindo caminho á verificação da immunidade conferida ao homem pela contaminação benefica da variola bovina, resultou o descobrimento da vaccina de Jenner.

A transmissão directa da pustula bovina a custo conseguiu acceitação universal, arrostando uma das campanhas mais tenazes que a hygiene tem enfrentado em todos os tempos. Entre outras razões predominava o receio dos incredulos de que os *humores* oriundos da vacca pudessem constituir uma ameaça de possivel "vacalisation", ou, vernacularmente de "avacalhamento" da humanidade. Mas, antes do occaso completo do seculo passado, o beneficio da vaccina vencia as derradeiras resistencias, surgindo então a *era post-jenneriana*, ou era propriamente do virus vaccinico autonomo que teve inicio quando Copemann, em 1891, destacou do vitello a polpa vaccinica e a trouxe para o laboratorio sob influxo das conquistas de Pasteur. Desde então novos aperfeiçoamentos vem o processo conquistando até os nossos dias, assignalando-se, entre os principaes, a lapino-receptividade que dá logar, alem da *lapino-vaccina de Gailleton, a orchi-vaccina de Henseval, Convent e Noguchi*, em 1910, e a *neuro-vaccina de Levaditi*, em 1922. E dentro do mesmo proposito de purificação do virus pelo afas-

tamento dos germes de associação da polpa, outras conquistas de grande valor são feitas em 1929, tanto na Escola Medica de Harvard, nos Estados Unidos, como entre nós, no Instituto Butantan, por meio da filtração do virus através de velas diatomaceas sendo que o producto aqui obtido foi, pela primeira vez no mundo, em condições de completa efficiencia para emprego immediato na pratica.

Caminhando, finalmente, para um gráo de aperfeiçoamento que todos esperam alcançar, procura-se, por toda parte, encontrar um meio de cultura do virus vaccinico *in vitro,* em estado perfeito de pureza e actividade.

Esta summaria descripção das principaes fontes de virus vaccinico para fins de immunização põe em evidencia a preoccupação que têm tido os pesquisadores de obtel-o tanto quanto possivel em estado de pureza, isto é, libertado dos germes de associação que vulgarmente o acompanham, obice maior á sua geral acceitação.

Os processos da technica moderna de preparo da vaccina e os rigorosos cuidados que lhe são dispensados no laboratorio reduzem ao minimo o teor qualitativo e quantitativo da flora microbiana associada, embora o ideal para a pratica seja o virus absolutamente puro, como ficou demonstrado em trabalho anterior publicado nas Memorias do Instituto Butantan (1) comquanto, pela sua extrema exigencia de condições especiaes de manutenção da actividade, não se preste, *larga manu,* a uso corrente entre nós.

A contaminação de que se reveste a polpa vaccinica é propriamente nulla quando demoradamente depurada no laboratorio. Entretanto, não é para ser desprezado o grande cuidado que deve merecer cada partida de polpa, resultante da colheita de um vitello, visto que, em circunstancias especiaes, uma contaminação de germes pathogenicos poderia ter logar durante o periodo de 120 horas consecutivas em que o animal permanece estabulado á espera do completo desenvolvimento pustular. Tanto do organismo do proprio animal, como dos productos da ração alimentar ou ainda vehiculados pelos tratadores e por meios outros inevitaveis podem chegar até a vasta area de pustulação differentes germes ou esporos pathogenicos que, de mistura com a polpa, seriam em conjuncto preservados até o momento de ser esta entregue ao consumo.

São bem raros os casos conhecidos na literatura medica de contaminação humana de tal natureza, mas, desde que possivel, não é injustificavel a insistencia na verificação do limite do seu perigo e dahi a natureza da orientação das presentes investigações, no particular das polpas vaccinicas do Butantan, unico centro productor da vaccina neste Estado.

Da flora normal das polpas vaccinicas — Estudos completos procedidos em todos os Institutos Vaccinogenicos do mundo demonstram que, mesmo dentro de condições optimas da technica de semeadura e colheita da polpa, afastada toda hypothese de infecção do animal vaccinifero, com immediata comprovação pela

necropsia, a polpa fresca é acompanhada de rica flóra de associação de germes cuja media oscilla ao infinito. Somente um longo periodo de depuração em baixa temperatura, pode atenuar esse teor de germes, sem o emprego de antisepticos outros, entre nós desaconselhado, a não ser a glycerina.

Alem das verificações que fizemos em trabalho já publicado (2) para demonstrar a possibilidade de reducção da flora microbiana da vaccina, revelam as fichas do nosso registo de polpas que, num total de 162 verificações durante o periodo de 1929 até o momento presente, apenas a partida No. 4711 teve de ser desprezada, logo depois da colheita, por ter a necropsia do vitello evidenciado lesões tuberculosas do parenchima pulmonar, não obstante prova negativa de tuberculina feita previamente. Nenhuma das demais partidas revelou presença de associação pathogenica que indicasse o seu não aproveitamento.

Não obstante rara e esparsamente assignalados, germes altamente pathogenicos para o homem accidentalmente podem viver em symbiose com o virus vaccinico e determinar infecções graves e mortaes.

Para esses accidentes ainda em sessão de 5 de julho de 1932 M. Luciens Camus chamava a attenção da Academia de Medicina de Paris em virtude de reclamações recebidas (3). Entre os germes que podem occasionar taes accidentes encontram-se alguns proprios do organismo bovino, v.g. o *virus da febre aphtosa;* outros a elle adaptaveis, tanto do tegumento externo, como das mucosas ou do tubo gastro-intestinal e outros ainda vehiculados pelos alimentos ou pelos proprios tratadores.

Procurando pesquisar o comportamento desses differentes germes vimos fazendo, ha mais de um anno, detidas verificações, desprezando apenas a parte que diz respeito ao virus aphtoso em virtude da existencia de trabalho experimental completo a seu respeito.

Technica empregada

Tomamos em 4 de maio de 1932, como ponto de partida para o presente estudo, duas polpas em stock no Laboratorio Vaccinico da Secção de Virus do Butantan, de Nos. 4762 e 4767 e dellas destacamos determinado volume que inicialmente foi submettido a provas bacteriologicas e de verificação da actividade que resultaram a seguinte demonstração:

No. da partida	*Evolução da vaccina no vitello*	*Data da colheita da polpa*	*Verificações bacteriologicas e dosea-mento da actividade do virus*		*Observações*
			Data: 4-V-1932		
4762	normal	18-III-1932	Inoculação em cobaia: Resultado negativo. Verificação de germes anaerobios pathogenicos: Resultado negativo. No. de colonias de germes banaes por c.c. 800.000.	*Methodo de Gins* Dil. 1/10.000 ++++ » 1/50.000 ++++	Os resultados dos exames de ambas as polpas indicaram perfeitas condições para empre-go. Apenas elevado teor de colonias de germes banaes em razão do curto espaço de tempo de permanencia no frigo.
4767	normal	28-IV-1932	Inoculação em cobaia: Resultado negativo. Verificação de germes anaerobios pathogenicos: Resultado negativo. No. de colonias de germes banaes por c.c. 950.000.	*Methodo de Gins* Dil. 1/10.000 ++++ » 1/50.000 ++++	

De ambas as partidas de polpas distribuimos igual quantidade de 5 cc. em vidros apropriados de pequeno tamanho e em outros, de maior capacidade, um volume maior de 50 cc.. Nestes ultimos semeamos, ao mesmo tempo, 10 gottas de uma emulsão concentrada de culturas dos seguintes germes: estaphylococcos, estreptococcos (raças virulentas); b. da tuberculose (typos humano, bovino e equino); *Eberthella typhi, Salmonella paratyphi* e *Salmonella shottmülleri; Eberthella dysenteriae* v. Shiga; *Brucella abortus* (typo bovino) e *Brucella melitensis; Clostridium welchii* e germes esporulados: do tetano e do carbunculo (*) (typos Fischer, B e B_4).

Nos recipientes menores, contendo volume igual de 5 cc. de polpa, semeamos 1 gotta, separadamente, das mesmas emulsões acima referidas para estudo isolado do seu comportamento em symbiose com o virus vaccinico.

(*) Em Janeiro de 1932.

Com as precauções necessarias foi todo esse material collocado no mesmo apparelho de frigo a -10°C usado para depuração das nossas polpas e exames periodicos foram feitos com o fim de demonstrar a resistencia de cada um delles em associação com o virus e postos nas mesmas condições de ambiente por este exigidas.

A partir dessa data, 4 de maio de 1932, durante o periodo successivo de 3, 6, 9 e 12 meses fizemos verificações consecutivas não só quanto á actividade do virus vaccinico como tambem em relação á resistencia dos germes que a elle foram associados. O comportamento geral vae resumido nos dois quadros juntos e os respectivos protocollos de inculações em animaes apropriados, annexos ao presente trabalho.

DISCUSSÃO E SUMMARIO

A possivel associação de germes pathogenicos ao virus vaccinico, em virtude da sua fonte de origem bovina, adoptada pelos mais importantes laboratorios do mundo, desperta em primeiro logar a preoccupação quanto ao virus da febre aphtosa, molestia commum entre os nossos rebanhos e que pode ser transmittida ao homem.

Já comprovada a associação dos dois virus, deixamos por isto mesmo de parte o estudo especial do seu caso e em trabalho por nós anteriormente publicado de collaboração com S. Calazans (4) accentuamos que:

> "E' facto fora de qualquer duvida que numa mesma polpa vaccinica possam coexistir os dois virus, vaccinico e aphtoso, sem que uma longa permanencia em baixa temperatura exerça sobre qualquer delles influencia nociva. Alem dos trabalhos de Mohler e Rosenau (5) e das experiencias de M. Belin (6) sobre a conservação e exaltação da virulencia do virus aphtoso, por culturas simultaneas com o virus vaccinico, um estudo completo sobre o assumpto vem publicado nos "Annales" do Instituto Pasteur, deste anno, por Hellsbergen, provando que os dois virus, mantidos em baixa temperatura, guardam integralmente as suas propriedades especiaes".

Estaphylococcos — Os estaphylococcos são encontrados regularmente na polpa vaccinica e para certos auctores, como Ponndorf (7) não representam germes pathogenicos tendo apenas papel preparador do terreno para o desenvolvimento do virus vaccinico. Sobre o assumpto, em trabalho que fizemos de collaboração com J. Travassos (8) demonstramos, á luz dos modernos conhecimentos, a invalidez desse conceito.

E' certo que, no commum dos casos, as varias raças de estaphylococcos encontradas na vaccina não têm acção pathogenica para o homem; mas o desen-

volvimento da pustula vaccinica não está condicionado á sua presença. E' que o valor bactericida da glycerina e o longo periodo de permanencia da polpa em baixa temperatura, de -10°C não são por si só capazes de extinguir, senão em parte, a flora de associação, como ficou demonstrado, pelas nossas verificações que as amostras pathogenicas de estaphylococcos semeadas ha mais de um anno na polpa mantiveram, pelo menos qualitativamente, a sua integridade.

Estreptococcos — Provenientes tanto da pelle, como da saliva, muco nasal e fezes do vitello, varias especies de estreptococcos podem attingir a area de vaccinação e demonstrar a sua presença pelo maior ou menor gráo de reacção local que, por sua vez, indica desde logo cuidados especiaes para a colheita da polpa. Trabalhos de Belenky & Popowa (9) demonstraram que, na pelle dos vitellos, se encontram estreptococcos, entre os quaes, *Estreptococcus acidominimus* 34 % e *Estreptococcus viridans bovis* 27 %. Depois de descreverem os A. A. as principaes especies de estreptococcos encontrados na saliva, muco nasal e fezes concluem que das experiencias de 54 culturas recentes de estreptococcos do organismo dos vitellos, pertencentes a diversas especies, se comportam os mesmos para animaes de laboratorio como não pathogenicos. A inoculação experimental que fizemos nas duas polpas de Nos. 4762 e 4767 de algumas amostras virulentas de estreptococcos mostrou que elles resistiram á acção depuradora da glycerina durante o periodo de mais de um anno comportando-se em condições de determinar intensa reacção geral e local nos animaes de experiencia, segundo demonstram os respectivos protocollos e photographia annexa.

Germes do grupo coli-typhico-dysenterico — Tambem os germes cujo habitat é o canal intestinal dos vertebrados podem, eventualmente, contaminar a polpa vaccinica. Experimentalmente elles se comportaram, como se vê dos quadros 1 e 2 apenas com persistencia para a *Escherichia coli,* ainda no prazo de 6 meses. Os demais não resistiram á acção conjugada do frigo e da glycerina.

Tuberculose — Ao lado da febre aphtosa, a tuberculose é sempre objecto de acurada preoccupação na escolha do animal vaccinifero e ante a fallibilidade da prova de tuberculina a pesquisa necroscopica de alguma lesão tuberculosa deve ser revestida do maior cuidado. O temor de uma contaminação tuberculosa pela vaccina sempre existiu e na longa campanha contra ella chegou mesmo a ser invocada a theoria de que a vaccinação preparava o terreno para a tuberculose.

Dentro da logica do moderno conceito da tuberculose seria de temer uma symbiose dos dois virus, mas assegurada a permanencia da polpa durante varios meses em baixa temperatura, como praticamos, está, por sua vez, garantida a destruição do bacillo da tuberculose, porventura associado ao virus vaccinico. As nossas verificações comprovaram a nullidade da resistencia do bacillo, quer do typo humano, como do bovino ou equino, a partir da primeira verificação, ao fim de tres meses. Devemos ainda assignalar que todos os cobaios empregados

nas provas de verificação de tuberculose foram previamente submettidos a provas de tuberculina.

Germes esporulados — Tetano — O bacillo tetanico e seu esporo constituem, realmente, serio perigo no preparo da vaccina. Ha condições muito propicias para que elle possa contaminal-a e a acção conjuncta da glycerina e baixa temperatura empregadas na depuração da polpa não chegam e influir na sua actividade pathogenica. Na propria literatura da vaccina são conhecidos casos de tetano consecutivos á vaccinação (10).

Demonstraram as nossas verificações que, tanto nas amostras de polpas contaminadas isoladamente com o bacillo tetanico, como na amostra semeada com a miscellanea de varios germes, a sua persistencia foi mantida perfeitamente integral ainda depois de um anno, com todas as suas propriedades pathogenicas.

Carbunculo — Apesar de bem conhecida a longevidade de resistencia dos esporos carbunculosos e estudada por numerosos auctores, em meio antiseptico e em baixa temperatura, esta longevidade não é conhecida com bastante precisão. Estudos de Seiffert (11) demonstraram grande valor bactericida da glycerina para todas as bacterias da lympha vaccinica com excepção dos germes esporogenicos, em ensaios realizados, entretanto, durante algumas semanas apenas.

As nossas verificações tomadas, em relação a tres typos differentes de bacillo do carbunculo, tanto em conjuncto com outros germes, como isoladamente, em duas polpas vaccinicas differentes, ainda dentro do prazo de 12 meses, revelaram franco poder pathogenico de todos elles.

EXPERIENCIA No. I — POLPA No. 4762

— 1 — (*) Polpa No. 4762 Vol. 50 cc.	1.ª verif. c/3 meses	2.ª verif. 6 meses	3.ª verif. 9 meses	4.ª verif. 1 anno	*Observações*
Preparada em 4 de maio de 1932 e semeada com 10 gottas da emulsão concentrada de cultura dos seguintes germes: estaphylococcos, estreptococcos (raças virulentas) bacillos da tuberculose (typos humano, bovino e equino) *Eberthella typhi, Salmonella paratyphi, Salmonella schottmülleri, Escherichia coli, Eberthella dysenteriae,* v. Shiga, *Clostridium welchii, Brucella melitensis,* bacillo do tetano e bacillo do carbunculo (typos Fischer B e B 4).	+	+	+	+	Actividade do virus integral
— 2 — Mesma polpa No. 4762. Volume de 5 cc. mais 1 gotta da emulsão de cultura de estaphylococcos.	+	+	+	+	»
— 3 — Idem, idem, mais estreptococcos (raças virulentas).	—	—	—	—	»
— 4 — Idem, idem, mais bacillos da tuberculose. (Typos humano, bovino e equino).	—	—	—	—	»
— 5 — Idem, idem, mais *Eberthella typhi.*	—	—	—	—	»
— 6 — Idem, idem, mais *Salmonella paratyphi.*	—	—	—	—	»
— 7 — Idem, idem, mais *Salmonella schottmülleri.*	—	—	—	—	»
— 8 — Idem, idem, mais *Escherichia coli.*	—	—	—	—	»
— 9 — Idem, idem, mais *Eberthella dysenteriae,* v. Shiga.	—	—	—	—	»
— 10 — Idem, idem, mais *Clostridium welchii.*	+	—	—	—	»
— 11 — Idem, idem, mais *Brucella abortus* e *melitensis.*	—	—	—	—	»
— 12 — Idem, idem, mais bacillo do tetano	+	+	+	+	»
— 13 — Idem, idem, mais bacillo do carbunculo (typos Fischer B e B 4)	+	+	+	+	»

(*) Predominancia do bacillo do tetano até no periodo de um anno.

EXPERIENCIA No. II — POLPA No. 4767

— 1 — (*) Polpa N.º 4767 Vol. 50 cc.	1.ª verif. c/3 meses	2.ª verif. 6 meses	3.ª verif. 9 meses	4.ª verif. 1 anno	*Observações*
Preparada em 4 de maio de 1932 e semeada com 10 gottas da emulsão concentrada de cultura dos seguintes germes: estaphylococcos, estreptococcos (raças virulentas) bacillos da tuberculose (typos humano, bovino e equino) *Eberthella typhi, Salmonella paratyphi, Salmonella schottmülleri, Escherichia coli, Eberthella dysenteriae,* v. Shiga, *Clostridium welchii, Brucella melitensis,* bacillo do tetano e bacillo do carbunculo (typos Fischer B e B 4).	+	+	+	+	Actividade do virus integral
— 2 — Mesma polpa No. 4767. Volume de 5 cc. mais 1 gotta da emulsão de cultura de estaphylococcos.	+	+	+	+	»
— 3 — Idem, idem, mais estreptococcos (raças virulentas).	+	+	+	+	»
— 4 — Idem, idem, mais bacillos da tuberculose. (Typos humano, bovino e equino).	—	—	—	—	»
— 5 — Idem, idem, mais *Eberthella typhi.*	—	—	—	—	»
— 6 — Idem, idem, mais *Salmonella paralyphi.*	—	—	—	—	»
— 7 — Idem, idem, mais *Salmonella schottmülleri.*	—	—	—	—	»
— 8 — Idem, idem, mais *Escherichia coli.*	—	—	—	—	»
— 9 — Idem, idem, mais *Eberthella dysenteriae,* v. Shiga.	—	—	—	—	»
— 10 — Idem, idem, mais *Clostridium welchil.*	+	+	+	+	»
— 11 — Idem, idem, mais *Brucella abortus e melitensis.*	—	—	—	—	»
— 12 — Idem, idem, mais bacillo do tetano.	+	+	+	+	»
— 13 — Idem, idem, mais bacillo do carbunculo (typos Fischer B e B 4).	+	+	+	+	»

(*) Predominancia do bacillo do tetano até no periodo de um anno.

RESUMO

1. A flora normal das polpas vaccinicas, embora não exercendo papel indispensavel na formação da pustula, não constitue elemento nocivo, uma vez reduzida qualitativa e quantitativamente pela acção bactericida da glycerina ou por outros meios não prejudiciaes ao virus vaccinico.

2. Si o preparo da polpa não se reveste dos necessarios cuidados technicos, a esta flora podem estar accidentalmente associados germes dotados de pathogenicidade, como certos virus da febre aphtosa, germes do grupo coli-typhico-dysenterico e germes esporulados como o bacillo do tetano e bacillo do carbunculo.

3. Desta flora pathogenica accidental, com excepção dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico e dos bacillos da tuberculose, os demais podem resistir, mesmo depois de um anno, ao poder bactericida da glycerina, quando mantidos na polpa, em temperatura de -10°C.

ABSTRACT

The normal flora although playing no necessary rôle in the pustule mechanism seems to exert no detrimental action on calf's vaccine lymph provided that it be conveniently reduced both qualitatively and quantitatively by the addition of glycerin or by some other way not harmful to the vaccine virus.

Some pothogenic germs such as the virus of foot-and-mouth disease, representatives of the coli-typhoid-dysenteric group, and tetanus, anthrax and tubercle bacilli, may be found accidentally associated with this flora in case the preparation of the vaccine is not made under technical precautions.

Of these germs only those of the coli-typhoid-dysenteric group and the tubercle bacillus are not able to resist the bactericidal action of glycerin over a year in a vaccine batch maintained at -10°C.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos* & *Godinho, Raul* — Do preparo da lympha vaccinica — Mem. Inst. Butantan V:3-23.1930.
2. *Godinho, Raul* — Da purificação da vaccina animal — Arch. Hygiene IV:75-79.1930.
3. *Camus, M. L.* — Rapport de la Commission permanente de la Vaccine sur plusieurs accidentes graves imputés à la vaccination — Bull. Acad. Med. CVII:935.1932.
4. *Calazans, S.* & *Godinho, Raul* — Possibilidade de contaminação da lympha vaccinica pelo virus da febre aphtosa — Mem. Inst. Butantan VII:269-281.1932.

5. *Mohler, J. R. & Rosenau, M.* — Contamination of vaccine virus by the virus of foot-and-mouth diseases. — U. S. Dept. of Agriculture B. A. I. Circular 147, June 16, 1909.

6. *Belin, M.* — Conservation et exaltation de la virulence du virus aphteux par cultures simultanées avec le virus vaccinal — C. R. Soc. Biologie XCIV:816.1926.

7. *Ponndorf* — Le staphylococcus albus du vaccin — Rev. Internat. Vaccine IV(1): 114.1913.

8. *Travassos, J. & Godinho, Raul* — Influencia dos estaphylococcos sobre a actividade do virus vaccinico — Mem. Inst. Butantan VII:261-268.1932.

9. *Belenky, D. E. & Popowa, N. N.* — Streptococci of normal calves contaminating vaccine — Zentralbl. f. Bakt. Orig. CXVIII:435-444.1930.

10. ———— Deux cas de tetanos à la suite de la vaccination — New York. Med. Journal (6).1911 *cit. in* Rev. Internat. Vaccine II(3):395.1911-12.

11. *Seiffert, G* — Zentralbl. f. Bakt. Orig. LXXIV:644.1914.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, recebido em dezembro de 1933. Dado á publicidade em agosto de 1934).

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII, 1933-1934



Lesões produzidas pela vaccina normal (em cima) e pela vaccina contaminada (em baixo)

INFLUENCIA
DO pH SOBRE A ACTIVIDADE DO VIRUS VACCINICO

POR

R. GODINHO E D. VON KLOBUSITZKY

614.521+612.0144626

INFLUENCIA
DO pH SOBRE A ACTIVIDADE DO VIRUS VACCINICO

POR

R. GODINHO E D. VON KLOBUSITZKY

A necessidade do descobrimento de methodos de controle da actividade do virus vaccinico surgiu desde quando a immunização contra a variola passou a ser feita por meio da lympha preservada no laboratorio, depois de destacada da pustulação dos animaes sensiveis.

Abandonado o velho systema da vaccinação directa de "pis-à-bras" e industrializado o preparo da polpa nos institutos vaccinogenicos, começaram, desde logo, a apparecer os methodos de investigações da actividade da vaccina antes do seu emprego na pratica.

O primeiro dentre os processos divulgados foi o de Calmette e Guérin que aproveitou a receptividade do coelho, descoberta por Gailleton, em 1889. Este methodo, dado a conhecer em 1901, é ainda hoje adoptado, com certas modificações, por varios laboratorios e recommendado, entre outros, pelo comité permanente de variola e vaccina da Commissão de Hygiene da Sociedade das Nações.

Valendo-se dessa lapino-receptividade, Guérin, Kelsch, Belin e outros introduziram, posteriormente, modificações no primitivo processo de Calmette e Guérin, e Chaumier, 1910, tentou instituir um methodo de controle humano. Henseval e Convent, quasi na mesma epoca, preconizaram um methodo baseado no poder de neutralização do soro do coelho vaccinado. Em 1921, Groth experimentou um novo methodo visando, ainda no coelho, a via intradermica. Gordon e Sobernheim, respectivamente em 1923 e 1925, do mesmo modo que o Hygienic Laboratory de Washington em 1927 (1), suggeriram alterações interessantes no methodo de Calmette e Guérin.

Todos esses processos de doseamento do virus podem ser enfeixados em um só grupo com a denominação de *dermo-reacções,* que se separariam de outro, por sua vez constituido pelas *corneo-reacções,* baseadas, seja nas verificações originaes de Gorini, feitas em 1903, por meio de inoculação do virus na cornea do coelho, seja, mais tarde, em 1925, nas de Gins, que usou para esse fim a cornea da cobaia. O processo de Gins proporcionou ao experimentador fami-

liarizado com o seu uso, um meio pratico e economico de determinar facilmente no laboratorio o limite de actividade do virus vaccinico em qualquer estado em que este se encontre. A interpretação dos resultados no controle da actividade antigenica da vaccina exige, por sua vez, cuidados especiaes em virtude das extremas variações individuaes dos animaes sensiveis, principalmente o coelho, cuja grande facilidade de infecção accidental já foi experimentalmente confirmada. Por outro lado, para a garantia da actividade da vaccina, como condição principal que lhe deve ser sempre assegurada, não bastam as precauções tomadas desde a selecção da semente para inoculação no animal vaccinifero até a sua colheita cercada de especiaes cuidados. Alem de grande numero de agentes de natureza physica, chimica ou biologica, todo o material de conserva que a seguir entra em contacto com a polpa pode exercer decisiva influencia na determinação ou perda de actividade do virus.

Neste particular, as Secções de Virus e de Physico-Chimica do Instituto Butantan vêm emprehendendo, desde 1932, uma serie de verificações para bem esclarecer o problema da reacção das polpas e ter sempre garantido o grau de virulencia da vaccina aqui preparada contra a variola.

A primeira experimentação realizada foi no sentido de determinar a reacção exacta das nossas polpas existentes em 1932, com differentes prazos de permanencia em baixa temperatura e, em seguida, o grau de actividade do virus vaccinico.

QUADRO No. 1

Verificação do pH das polpas vaccinicas quando emulsionadas em glycerinas acidas, ("neutras" segundo os respectivos rotulos), de procedencias diversas, e doseamento da actividade do virus.

No. das polpas	*Reacção*	*Actividade do virus vaccinico pelo methodo de Gins*	
		Dil. 1/10.000	Dil. 1/50.000
4689	5,34	++++	++
4690	5,76	++++	++++
4691	5,52	++++	—
4692	5,60	++++	++++
4694	5,63	++++	+++
4696	4,92	++++	—
4697	5,16	++++	++++
4699	4,91	++++	—
4700	5,66	++++	—
4701	5,23	++++	—
4702	5,26	++++	++++
4703	5,02	++++	++++
4704	6,08	++++	—
4712	5,27	++++	+++
4713	5,91	++++	++
4739	5,61	++++	—
4740	5,20	++++	+++
4758	5,62	++++	+++
4792	5,65	++++	—
4798	5,97	++++	—

Todas as determinações foram feitas electrometricamente, em condições naturalmente muito demoradas, dada a viscosidade das polpas, em cujo caso o equilibrio entre o gas H e os ions de H só é alcançado muito lentamente.

Os resultados de uma serie de verificações (Quadro No. 1) demonstraram que havia, incontestavelmente, um elemento a desviar o grau de reacção das polpas para um ponto de acidez e, por conseguinte, capaz de favorecer a destruição do virus, cuja integridade não é mais conservada desde que o pH chegue a attingir o indice de 4,0 ou se eleve a 10,0, de accordo com os estudos de Cunningham e Maskar (2).

No doseamento da actividade do virus vaccinico nem todas as polpas attingiram o limite "fortemente positivo" na diluição de 1/50.000 pelo methodo de Gins.

Procurando, em seguida verificar a reacção das polpas recem-colhidas desde aquella epoca, foi encontrado um resultado dentro do limite do ponto optimo e com a actividade do virus nas mesmas condições segundo demonstra o Quadro No. 2.

QUADRO No. 2

Reacção das polpas *in natura*, recem-colhidas, e doseamento da actividade do virus vaccinico.

No. das polpas	*Reacção*	*Doseamento do virus vaccinico pelo methodo de Gins.* Dil. 1/50.000
4751	6,67	+ + + +
4752	6,58	+ + + +
4753	6.74	+ + + +
4754	6,88	+ + + +
4755	6.74	+ + + +
4756	6,76	+ + + +
4757	7.12	+ + + +
4793	6.20	+ + + +
4794	6.76	+ + + +
4795	6.25	+ + + +
4797	6.76	+ + + +
4798	6.57	+ + + +
4799	6.60	+ + + +
4800	6,92	+ + + +
4802	6,70	+ + + +
4803	8.00	+ + + +
4804	6.95	+ + + +
4806	6.67	+ + + +
4807	6.59	+ + + +
4824	7.70	+ + + +

Tratámos, immediatamente, de verificar a reacção das glycerinas até então empregadas e fornecidas ao Instituto, de varias procedencias, com a indicação de "neutras". Em quatro typos analysados os resultados revelaram que taes glycerinas, tanto as de procedencia nacional, como as estrangeiras, eram *fortemente acidas*, o que explicava a tendencia a franca acidez das polpas então existentes no nosso laboratorio.

QUADRO No. 3

Analyses procedidas em glycerinas de varios typos correntemente fornecidas ao Instituto Butantan.

Marca da glycerina	*Reacção potenciometrica*
SCHERING	5,12
ELLEQUEIROZ	4,30
GLOBO	4,30
EVANS	4,85

Sendo a glycerina um producto largamente empregado nos laboratorios e centros de experimentação de natureza biologica, queremos chamar a attenção dos interessados para este ponto importante da questão, pois não é possivel encontrar tal substancia em estado de neutralidade. Com effeito, normalmente as glycerinas são sempre acidas, e isto porque, ao serem purificadas por destillação no vacuo, não se separam completamente dos acidos oriundos do processo geralmente usado na sua preparação, que é o da hydrolyse de substancias gordurosas por meio do acido sulfurico. Nestas condições, a propria glycerina bidestillada ainda pode conter traços desses acidos.

Na neutralização da glycerina temos usado, com resultado satisfactorio, o hydroxido de Na ou un soluto tampão de phosphatos com pH 7,4. Do soluto tampão é geralmente sufficiente 1 cc. para 1.000 cc. de glycerina. Na neutralização com NaOH precisamos sempre determinar com exactidão a quantidade a ser usada. Nestas condições, depois que passámos a fazer no Instituto a neutralização systematica da glycerina empregada para emulsionar as polpas, estas, em exames posteriores, feitos após quinze mezes de permanencia no frigo a —10°C., têm demonstrado perfeita approximação do ponto optimo (pH 7,8) á integridade do virus; este, de seu lado, ao ser doseado, tambem tem revelado actividade sempre positiva ainda na diluição de 1/50.000 pelo methodo de Gins, sendo que bastaria para ser considerado em optimo estado de conservação desde o limite de diluição a 1/10.000, segundo esclarece o Quadro No. 4.

QUADRO No. 4

No. das polpas	*Reacção*	*Doseamento do virus vaccinico pelo methodo de Gins.* Dil. 1/50.000
4796	7.55	+ + + +
4797	7.26	+ + + +
4799	7.67	+ + + +
4800	7.11	+ + + +
4802	7.68	+ + + +
4803	8.17	+ + + +
4804	7.46	+ + + +
4825	7.26	+ + + +
4826	7.13	+ + + +
4828	7.45	+ + + +
4829	7.91	+ + + +
4831	7.84	+ + + +
4832	8.01	+ + + +
4833	8.11	+ + + +
4834	8.10	+ + + +
4835	7.81	+ + + +

RESUMO

A interpretação dos resultados no controle da actividade antigenica da vaccina que deve ser feita systematicamente antes do emprego humano, exige cuidados especiaes em virtude não só das variações individuaes dos animaes sensiveis, bastante conhecidas do experimentador familiarizado com o seu uso, como ainda do grande numero de influencias, de ordem physico-chimica ou biologica, que determinam a diminuição ou perda da actividade do virus vaccinico. Entre estas figura a da reacção das polpas porque a integridade do virus não é mais conservada, desde que o pH destas chegue a attingir o indice de 4,0 ou se eleve a 10,0.

Na determinação electrometrica de uma serie de partidas de polpas vaccinicas do Instituto Butantan, emulsionadas em glycerina, foi verificada a existencia de um elemento que desviava o primitivo grau de reacção quando recem-colhidas, entre pH 6,20 e 8,17, para um ponto de accentuada acidez, com prejuizo para a actividade do virus. Analysadas as glycerinas empregadas na suspensão das mesmas polpas com a indicação de *neutras,* os resultados demonstraram que, tanto as de procedencia nacional como as estrangeiras, eram fortemente *acidas.* Sendo a glycerina um producto largamente empregado nos laboratorios e centros de experimentação de natureza biologica, é necessario chamar-se a attenção dos interessados para este ponto importante da questão, pois não é possivel encontrar-se tal substancia em estado de neutralidade. Com effeito, normalmente as glycerinas são sempre acidas, e isto porque, ao serem purificadas por destillação no vacuo, não se separam completamente dos acidos oriundos do processo geralmente usado na sua preparação, que é o da hydrolyse de substancias gordurosas por meio do acido sulfurico. Nestas condições, a propria glycerina bi-destillada ainda pode conter traços desses acidos.

Na neutralização da glycerina usada no Laboratorio Vaccinico, emprega-se, com resultado satisfactorio, o hydroxido de sodio ou um soluto tampão de phosphato com pH 7,4. Do soluto tampão é geralmente sufficiente 1cc. para 1000 cc. de glycerina. Na neutralização com NaOH sempre se determina com exactidão a quantidade a ser usada. Nestas condições, depois que se passou a fazer no Instituto a neutralização systematica da glycerina empregada para emulsionar as polpas, estas, em exames posteriores, feitos após quinze meses de permanencia no frigo a -10°C, têm demonstrado perfeita approximação do ponto optimo (pH 7,8) á integridade do virus; este, de seu lado, ao ser doseado, tambem tem revelado actividade sempre positiva ainda na diluição de 1/50.000 pelo methodo de Gins, sendo que bastaria, para ser considerado em optimo estado de conservação, o limite de diluição a 1/10.000.

ABSTRACT

The pH of the lymph occupies a prominent place among the elements that must be carefully controled in the preparation of small-pox vaccine in order for its activity not to be rapidly modified. By using the best brands of so-called "neutral" glycerin it was found at the Instituto Butantan Vaccine Department that the pH of the vaccine pulp originally near the neutral point or slightly alkaline rapidly changed towards acidity with consequent decrease of the virus activity. An analysis made of these "neutral" brands of glycerin disclosed that they were all decidedly acid so as to require a previous neutralization by sodium hydroxide or by a buffer sulphate solution to become acceptable for the vaccine preparation.

BIBLIOGRAPHIA

1. ———— A method por estimating the potency of smallpox vaccine — Hygienic Laboratory Bull. (149) :1-27. — U. S. P. H. Service, Washington, D. C., 1929.
2. *Cunningham, J. & Maskar, K. S.* — The hydrogen ion content of vaccine etc. — Ind. J. Med. Res. XV(3) :819.1928.

(Trabalho das Secções de Virus e de Physico-Chimica do Instituto Butantan, janeiro de 1934. Dado á publicidade em agosto de 1934).

UM MICRO-METHODO
PARA PESQUISA DE VARIOS SAES DE ESTRYCHNINA

POR

D. von KLOBUSITZKY

(*com 5 microphotographias no texto*)

615.97+541.4:542.65

UM MICRO-METHODO PARA PESQUISA DE VARIOS SAES DE ESTRYCHNINA

POR

D. von KLOBUSITZKY

No decorrer de certas experiencias de laboratorio, haviamos observado que o sal sodico do acido glycerophosphorico (glycerophosphato de Na, $Na\text{-}PO_4C_3H_8O_2$) dá um precipitado quando aquecido com sulfato de estrychnina, pelo que nos lembramos de pesquisar este phenomeno sob um ponto de vista mais geral. Novas experiencias mostraram-nos que a mencionada reacção de precipitação é caracteristica de alguns saes de estrychnina, de que se presta mesmo para a pesquisa de pequenas quantidades.

Nossas investigações giraram em torno dos seguintes compostos de estrychnina e alcaloides:

a) sulfato, chlorhydrato, nitrato, phosphato, hypophosphito, arseniato, cacodylato e glycerophosphato de estrychnina;

b) atropina e sulfato de atropina, chlorhydrato de morphina, veratrina, cafeina, digitoxina, chlorhydrato de pilocarpina, aconitina.

Como reagente usámos o glycerophosphato de sodio em solutos aquosos a 2, 4, 20 e 50 % e em quantidades variaveis, tendo logo verificado que os melhores resultados eram obtidos quando usavamos soluto a 4 % em quantidades iguaes; com solutos mais concentrados separava-se, sob a influencia dos saes de estrychnina e ás vezes mesmo a frio, tanto glycerophosphato de Na, que se tornava muito difficil o reconhecimento dos crystaes caracteristicos dos saes de estrychnina.

Achamos preferivel a seguinte technica:

Juntar 0,5 cc. do soluto com estrychnina num pequeno tubo centrifugo conico; addicionar o mesmo volume de um sol. a 4 % de glycerophosphato de Na, agitar e aquecer até a ebullição. Após curta ebullição (meio minuto é sufficiente), resfriar o conteudo do tubo centrifugo e centrifugar, quando os saes de estrychnina estiverem presentes em quantidades muito pequenas. Com uma pipeta capillar (pipeta de Pasteur) separar a parte fluida e com uma alça

de platina retirar um pouco do sedimento que é collocado numa lamina e, antes de seccar, examinado ao microscopio.

Dos compostos de estrychnina examinados deram resultado positivo os seguintes:

sulfato de estrychnina	até 10 γ
chlorhydrato de estrychnina	até 50 γ
nitrato de estrychnina	até 50 γ
phosphato de estrychnina	até 50 γ
glycerophosphato de estrychnina	até 50 γ

Pelas formas crystallinas pode-se reconhecer com certeza de que sal de estrychnina se trata, conforme se pode verificar nas annexas microphotographias (*), sendo que as formas crystallinas ou o tamanho dos crystaes não dependem da quantidade do composto de estrychnina.

Embora, baseado na forma crystallina, nada se possa dizer em relação ás reacções chimicas que se passam entre os mencionados saes de estrychnina e o glycerophosphato de Na, todavia podem-se tirar da observação algumas suggestões:

1.ª) é bem provavel que o glycerophosphato de Na forme com os saes de estrychnina combinações complexas (segundo a theoria de Werner), as quaes dariam formas crystallinas variaveis de accordo com as uniões dos saes de estrychnina. Julgamos que essa supposição deva ser levada em consideração, porque os crystaes são muito instaveis e facilmente modificados, pois, quando, p. ex., são expostos demoradamente em temperatura do ambiente, tornam á mesma forma, o que nos leva a pensar que este composto formado seja estrychnina livre.

2.ª) pode-se tirar uma outra indicação sobre a natureza da reacção confrontando-se as figuras 1, 2 e 3: nota-se, com effeito, que estas microphotographias, apesar de differentes entre si, mostram alguns crystaes com formas identicas, (prismas curtos e grossos, triangulos, hexagonos, octagonos) ao passo que as figuras 4 e 5 não têm formas identicas, nem entre si, nem em relação ás anteriores.

Pensamos que o facto de o sulfato, o chlorhydrato e o nitrato de estrychnina formarem crystaes em parte identicos se pode explicar admittindo-se que haja uma reacção secundaria entre estes saes e o glycerophosphato de Na, de que resulta a libertação de uma parte de estrychnina (**).

(*) As photographias foram tiradas com um microscopio Leitz em luz polarizada. com objectiva 3 e ocular 8.

(**) Foi verificado que não se trata de saes de estrychnina precipitados.

Além disso, esta supposição nos parece bastante provavel, porque as formas crystallinas identicas e acima mencionadas são muito parecidas ás que se formam secundariamente, isto é, depois de seccagem do phosphato e do glycerophosphato de estrychnina.

A presença de outros alcaloides mencionados no principio deste trabalho não atrapalha, nem lhe altera a sensibilidade. Apenas, como excepção, se verifica que, na presença de aconitina, o chlorhydrato de estrychnina só pode ser pesquisado numa quantidade de 150 γ.

A prova não pode ser usada na urina, porque ella dá com o glycerophosphato de Na um precipitado volumoso, tornando mesmo impossivel o encontro dos crystaes caracteristicos.

RESUMO

Para o conhecimento de sulfato, chlorhydrato, nitrato, phosphato e glycerophosphato de estrychnina em presença de outros alcaloides pode-se empregar um micro-methodo, baseado no facto de esses saes de estrychnina darem, com um soluto aquoso a 4% de glycerophosphato de sodio, um precipitado de crystaes caracteristicos e facilmente reconheciveis.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Mikromethode beschrieben, die es zulässt sehr kleine Mengen von Strychninsulfat, Strychninchlorid, Strychninnitrat, Strychninphosphat und Strychninglycerophosphat in Anwesenheit von anderen Alkaloiden nachzuweisen.

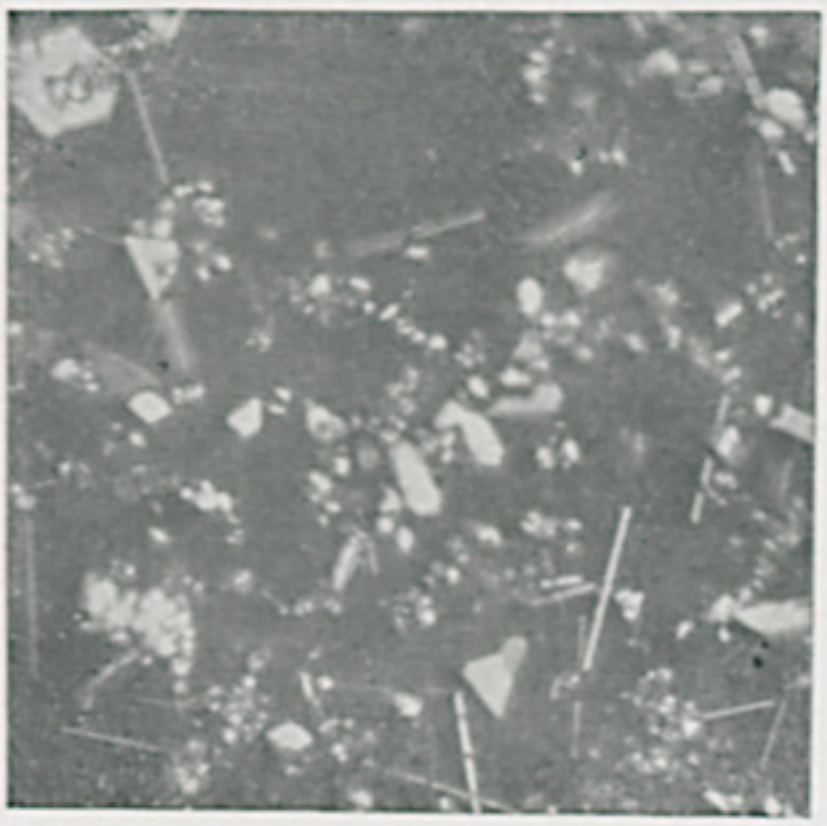
Das Verfahren beruht darauf, dass die erwähnten Strychninverbindungen mit einer 4 %-igen Natriumglycerophosphatlösung beim Sieden charakteristische une leicht erkennbare kristallienische Niederschläge geben.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, a ser publicado em alemão *in* "Biochemische Zeitschrift" e apresentado em fevereiro de 1934. Dado á publicidade em agosto de 1934).

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII, 1933-1934



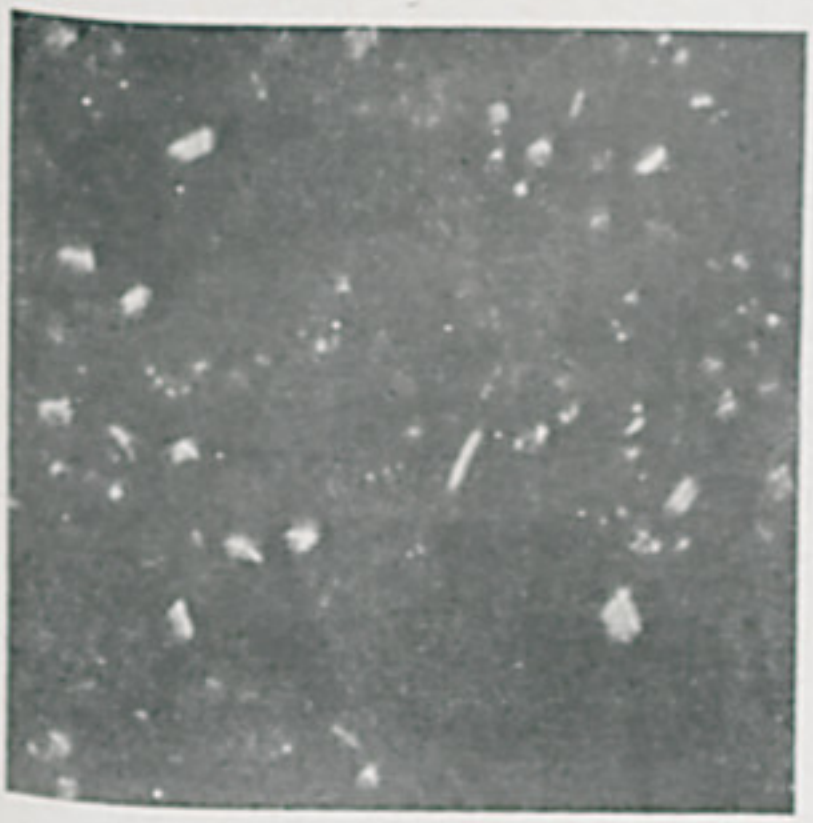
Precipitado de sulfato de estrychnina



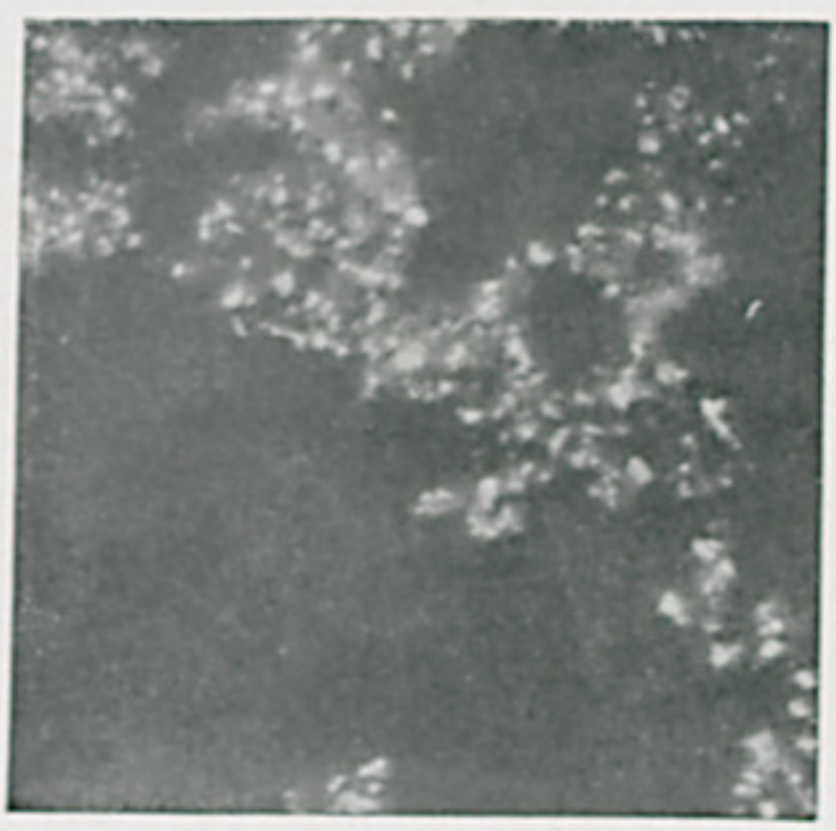
Precipitado de chlorhydrato de estrychnina



Precipitado de nitrato de estrychnina



Precipitado de phosphato de estrychnina



Precipitado de glycerophosphato de estrychnina

ESTUDOS PHYSICO-CHIMICOS SOBRE PROTEINAS EM PRESENÇA DE ALCOOL

POR

D. von KLOBUSITZKY

(*com 6 figuras no texto*)

612.398.12

ESTUDOS PHYSICO-CHIMICOS SOBRE PROTEINAS EM PRESENÇA DE ALCOOL

I. Sobre a coagulação pelo calor das soro-proteinas em presença de alcool ethylico

POR

D. von KLOBUSITZKY

A coagulação pelo calor das soro-proteinas em presença de alcool constitue objecto de relativamente poucos trabalhos e estes tratam quasi que exclusivamente da proteina de Bence-Jones. Ha pouquissimas communicações sobre experiencias feitas com soro ou com albuminas typicas (seralbumina ou ovalbumina). Na literatura que nos era accessivel só encontrámos indicações, quer sobre a relação reciproca entre a acção do alcool e do sal, quer sobre o comportamento de proteinas que, com solutos tampão (em quasi todos os casos foram usados solutos tampão de acetato), davam uma reacção mais ou menos acida. Além disso, a maioria dos auctores experimentava apenas com solutos albuminosos muito diluidos. Não existem dados quanto ao comportamento do soro total e de suas fracções albuminosas na reacção normal do sangue, com um teor de sal correspondente ás condições physiologicas.

Sobre preencherem uma lacuna em nossos conhecimentos sobre as soro-protetinas taes pesquisas são necessarias e uteis do ponto de vista puramente theorico. Com o uso do alcool como factor auxiliar da coagulação pelo calor, os phenomenos colloido-electricos, que tornam as circunstancias mais complicadas, passam para um plano secundario, de maneira que as alterações de dispersão e estabilidade se processam em condições as mais simples possiveis, o que facilita sensivelmente a verificação geral das condições de deshydratação.

Correspondendo a esse fim, esta parte do nosso trabalho relata as experiencias feitas com soro, fibrinoglobulina, euglobulina, pseudoglobulina e seralbumina de concentrações diversas, nas quaes se conservavam constantes o pH

e as concentrações de sal dos solutos albuminosos, variando apenas as quantidades de alcool.

Methodo

Com soro desfibrinado de cavallo eram preparadas, por precipitações fraccionadas com soluto de $(NH_4)_2SO_4$ saturado, fibrinoglobulina (saturação de 30 %), euglobulina (saturação de 36 %), pseudoglobulina e seralbumina. As differentes fracções eram previamente dialysadas, em saccos de pergaminho, com agua corrente de torneira e, depois de ter sido sufficientemente diminuida a sua conductividade, electrodialysadas, no electrodialysador de Pauli, entre duas membranas de pergaminho, ou em um electro-ultrafiltro (1) por nós construido, até obtenção de solutos perfeitamente livres de electrolytos, ou precipitados. Os precipitados de fibrinoglobulina e euglobulina assim obtidos eram dissolvidos em quantidades minimas de NaCl physiologico. Á pseudoglubina e á seralbumina addicionava-se NaCl deshydratado até a concentração final de 0,9%. A reacção de todos os solutos era, por meio de um soluto a 2 % de Na_2CO_3, ajustada mais ou menos em pH 7,4 (*). O pH dos solutos promptos para uso era determinado electrometricamente.

Com excepção da fibrinoglobulina, da qual não conseguimos preparar um soluto sufficientemente concentrado (não achámos conveniente, em virtude das eventuaes alterações do grau de dispersão, proceder á concentração por meio de ultrafiltrações), preparámos solutos padrão a 30,00 % de todas as outras proteinas. A concentração desses solutos padrão era determinada pelo methodo micro-Kjeldahl. Para a diluição dos solutos padrão usámos sempre NaCl a 0,9 %, cuja reacção com o mencionado soluto de Na_2CO_3 estava igualmente ajustada ao pH 7,4. O soro obtido do sangue desfibrinado de cavallo era, sem tratamento nenhum, diluido com soluto physiologico de NaCl até a concentração total de proteina 3,00 %. Usámos o alcool ethylico, "pro analyse" de Merck, deshydratado por nós.

As experiencias foram executadas da seguinte maneira: de cada soluto de proteina preparavam-se series, contendo uma proveta 5 cc. desse soluto e quantidades variaveis de alcool, mas de sorte que o volume total da mistura proteina-alcool fosse igual em todos os tubos da serie. Isto se obtinha addicionando ao primeiro tubo de cada serie 3 cc. de soluto de NaCl physiologico, enquanto nos demais este soluto era juntado gradativamente com o alcool. Sendo elevada de 0,5 cc. a quantidade de alcool em cada tubo seguinte da serie, quantidade esta que corresponde a uma concentração de 6 %, a concentração de alcool poude ser augmentada até 36 %. Conclue-se dahi que as concentrações

(*) Em experiencias previas verificámos que a baixa do pH em consequencia da fervura é insignificante, pois representa menos de 0,1 unidade.

de proteina effectivas na fibrinoglobulina eram: 0,93, 0,465 e 0,233 %, enquanto nas demais fracções albuminosas e no soro correspondiam aos valores: 1,86. 0,93 e 0,465 %

A determinação da coagulação era feita em banho-maria, agitando-se constantemente. O conteudo das provetas era, durante toda a determinação, remexido com o thermometro, o qual, afim de evitar o mais possivel uma evaporação do alcool e da agua, estava fixado, guardando, porém, liberdade de movimento, em uma rolha de cortiça. Mantinha-se, naturalmente, uma illuminação uniforme dos tubos.

A verificação das alterações occasionadas pelo aquecimento era feita pela observação das seguintes circunstancias: opalescencia (Op.), turvação nitida (T. n.), flocos finos, com aspecto de fios (Fl. f.) e flocos grossos, granulosos (Fl. gr.).

Parte experimental

Os resultados estão representados nas tabellas seguintes. A segunda columna contém as concentrações percentuaes de alcool e as demais assignalam as temperaturas, nas quaes houve as alterações que constam da primeira linha.

TABELLA I

Fibrinoglobulina

Concentração da proteina: 0,93 % pH 7,38

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	62	66	68	72
2	6	59	63,5	65	67
3	12	52,5	57	59	60
4	18	48	53,5	55	55
5	24	*	42	46	49

Nota: * Já opalesce em temperatura ambiente (15°).

TABELLA II

Fibrinoglobulina

Concentração da proteina: 0,465 % pH 7,42

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	57	62	62	75
2	6	53	59	56	68
3	12	47	57	53	63
4	18	*	38	42	56

Nota: * Já opalesce em temperatura ambiente (15°).

TABELLA III

Fibrinoglobulina

Concentração da proteina: 0,233 % pH 7,41

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	55	64	57	70
2	6	55	64	57	70
3	12	46	60	53	65
4	18	38	45	45	55
5	24	*	*	36	49

Nota: * Opalesce e mostra turvação em temperatura ambiente (15°).

TABELLA IV

Euglobulina

Concentração da proteina: 1,85 % pH 7.50

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	72	76	76	80
2	6	65	70	67	74
3	12	58	65	63	67
4	18	49	58	55	60
5	24	43	48	45	53
6	30	*			

Notas * Opalesce e apresenta forte turvação em temperatura ambiente (15°).

TABELLA V

Euglobulina

Concentração da proteina: 0,93 % pH 7,48

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	66	75	72	80
2	6	60	68	68	72
3	12	55	60	60	63
4	18	45	50	45	55
5	24	40	45	40	46
6	30	*			

Nota: * Opalesce e apresenta forte turvação em temperatura ambiente (16°).

TABELLA VI

Euglobulina

Concentração da proteina: 0,465 % pH 7,50

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	61	77	64	82
2	6	60	73	64	78
3	12	51	65	54	71
4	18	41	56	45	60
5	24	28	50	30	54
6	30	*	47	31	52

Nota: * Opalesce em temperatura ambiente (16°).

TABELLA VII

Pseudoglobulina

Concentração da proteina: 1,86 % pH 7,54

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	72	78	80	94
2	6	65	71	76 *	86
3	12	57	65	*	77 **
4	18	48	56	58 *	60
5	24	43	50	*	52
6	30 †	34	43	*	45 ††

Notas: * Não é possivel uma observação minuciosa por causa das muitas bolhas de ar. * * A 72° torna-se uma massa muito viscosa, gelatinosa, que contém muitas bolhas de ar. † Ficou parada 20 minutos, conservando-se clara. †† Soluto muito grosso.

TABELLA VIII

Pseudoglobulina

Concentração da proteina: 0,93 % pH 7,46

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	65	78	65	*
2	6	62	74	65	**
3	12	59	68	59	†
4	18	47	58	48	††
5	24	38	52	† *	59
6	30	35	42	42	48 † **
7	36	†† *			

Notas: Nos Nos. 1 a 4 não ha formação de flocos grossos. O alcool influe sobre os solutos no sentido de tornal-os oleosos com o aquecimento. * A 88° apparecem alguns

flocos, porém o soluto, mesmo durante a fervura, permanece liquido e leitoso, sem que augmente o numero dos flocos. ** A 84° podem-se observar alguns flocos mais grossos. † A 85° observam-se alguns flocos mais grossos. †† Turvo a 65°, clarifica-se com a fervura, mas, depois de resfriado, volta a turvação. †* A 56° turvo, clarifica-se quando aquecido até fervura; após resfriamento turva-se novamente. †** Turva-se a 46°, á fervura e ao resfriamento comporta-se como o N° 5. ††* Já se turva em temperatura ambiente (19°).

TABELLA IX

Pseudoglobulina

Concentração da proteina: 0,465 % pH 7,45

	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	65	76	65	*
2	6	62	69	62	**
3	12	58	66	58	†
4	18	52	57	52	††
5	24	47	53	†*	58 †**
6	30	††*	42	40	50

Notas: * Não se formam flocos grossos, nem á fervura. Fervido a fogo livre, pode-se observar abundante floculação. ** Mesmo aquecido até fervura não ha floculação. † Comporta-se como o No. 7. †† A 80° apresenta maxima turvação, com a fervura clarifica-se consideravelmente. Após resfriamento a turvação augmenta novamente. †* A observação é impossibilitada pelas muitas bolhas de ar. †** Turva-se a 57°, clarifica-se á fervura, após resfriamento apparece novamente a turvação. †† ** Já se turva em temperatura ambiente (19°).

TABELLA X

Seralbumina

Concentração da proteina: 1,86 % pH 7,40

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	76	79	*	90 **
2	6	73	76	*	86 †
3	12	67	72	*	80 ††
4	18	62	67	*	75 †*
5	24	55	60	*	68 †**
6	30	45	53	*	59 ††*
7	36	36	43	*	49 †† **

Notas: * Ausencia completa de flocos finos. ** A 86° torna-se turvo e gelatinoso. Aquecido até fervura não se altera. Fervido ao fogo livre observam-se tambem flocos finos. † A 81: turvo e gelatinoso: a differença, mencionada em No. 1, entre o aquecimento em banho-maria e a fogo livre, existe neste como em todos os tubos da serie. †† A 76° tor-

na-se turvo e gelatinoso. † * A 69° turvo e gelatinoso. † ** A 62° turvo e gelatinoso. †† * A 48° turvo e gelatinoso. †† ** A 48° turvo e gelatinoso.

TABELLA XI

Seralbumina

Concentração da proteina: 0,93 % pH 7.35

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	77	84	*	—
2	6	74	78	**	—
3	12	69	75	†	—
4	18	64	70	††	—
5	24	57	61	††	—
6	30	49	55	58	62
7	36	39 † *	46	50	55

Notas: Durante o aquecimento augmenta visivelmentte a viscosidade dos solutos 2-7. Nos 1-5: não se formam flocos grossos, nem á fervura. Fervido ao fogo livre, podem-se observar flocos grossos. * Flocos finos isolados a 90°. ** Flocos finos isolados a 85°. † Flocos finos isolados a 80°. †† Não ha formação de flocos finos. † * Conserva-se claro mesmo após 20 minutos de permanencia em temperatura ambiente (21°).

TABELLA XII

Seralbumina

Concentração da proteina: 0,465 %. pH 7,38

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	77	84	87	—
2	6	72	80	86	—
3	12	67	73	78	—
4	18	62	68	*	—
5	24	59	64	**	—
6	30	50	56	†	—
7	36	39 † *	46	††	—

Notas: Não se formam flocos grossos, nem com aquecimento ao fogo livre. * Flocos finos isolados a 69°. ** Flocos finos isolados a 65°. † Flocos finos isolados a 60°. †† Flocos finos isolados a 49°. † * Conserva-se claro mesmo após permanencia por 15 minutos em temperatura ambiente (18°).

TABELLA XIII

Soro de cavallo

Concentração total da proteina: 1,86 % pH 7,43

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	71	76	81	—
2	6	67	72	78 ?	—
3	12	60	66	82 ?	—
4	18	54	59	*	—
5	24	**	47	†	60
6	30	††	††	† *	52

Notas: Nos. 1-4: não se formam flocos grossos, nem mesmo fervido a fogo livre. A observação dos flocos finos é muito difficil nos Nos. 2 e 3, por causa das bolhas de ar, e dahi incerteza dos numeros indicados. * A 78° torna-se denso e as bolhas de ar impossibilitam a observação dos flocos finos. ** Opalesce já em temperatura ambiente (24°). † Observação de flocos finos impossibilitada pelas bolhas de ar. Gelatinoso a 55°. †† Turva-se em temperatura ambiente. † * Gelatinoso a 48°.

TABELLA XIV

Soro de cavallo

Concentração total da proteina: 0,93 % pH 7,41

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	74	78	84	—
2	6	69	73	78	—
3	12	62	67	73	—
4	18	51	57	71	—
5	24	*	45	**	—

Notas: Em nenhum tubo da serie formaram-se flocos grossos, nem com fervura a fogo livre. * Turva-se em temperatura ambiente (23°). ** Por causa das bolhas de ar não se podem observar os flocos finos.

TABELLA XV

Soro de cavallo

Concentração total de proteina: 0,465 % pH 7,36

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	74	78	70	—
2	6	62	70	62	—
3	12	58	68	*	—
4	18	43	55	**	—
5	24		†	—	—

Notas: Não se formaram flocos grossos em nenhum tubo da serie, nem quando fervidos a fogo livre. * Não ha flocos finos. ** Observação impossibilitada pelas bolhas de ar. † Opalesce já em temperatura ambiente (23°).

Antes de passarmos á discussão dos resultados, desejamos mencionar que tambem fizemos algumas experiencias com fracções de pseudoglobulina. Nessas experiencias a pseudoglobulina era novamente precipitada com um soluto de $(NH_4)_2SO_4$ saturado a 43 %, sendo considerado o precipitado como pseudoglobulina I e o filtrado como pseudoglobulina II. A dialyse e o preparo dos solutos promptos para uso eram feitos conforme está indicado na parte do methodo. Os resultados obtidos com esses solutos divergiam daquelles alcançados com os solutos de pseudoglobulina total apenas dentro do limite dos erros de observação, de maneira que nos restringimos á apresentação de uma tabella de cada um.

TABELLA XVI

Pseudoglobulina I

Concentração da proteina: 0,39 % pH 7,31

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	63	79	68	—
2	6	62	70	62	—
3	12	56	66	58	—
4	18	52	57	52	*
5	24	47	53	**	58
6	30	†	42	40	50

Notas: Nos tubos 1 - 4 da serie não se formaram flocos grossos. Os mesmos, fervidos a fogo livre, contêm muitos flocos grossos. O conteudo dos tubos aquecidos em banho-maria conserva-se perfeitamente homogeneo mesmo após uma parada por tempo mais ou menos longo; nos tubos aquecidos a fogo livre, porém, separam-se precipitados volumosos. Uma parte da mistura aquecida em banho-maria até 90° foi fervida a fogo livre, mas tambem não se observaram flocos grossos. * O maximo de turvação é attingido a 80°; á fervura o soluto clarifica-se consideravelmente; resfriado, a turvação apparece novamente. ** A observação é impossibilitada pelas bolhas de ar. † Opalesce em temperatura ambiente (23°).

TABELLA XVII

Pseudoglobulina II

Concentração da proteina: 0.39 % pH 7,46

No.	C_2H_5OH	Op.	T. n.	Fl. f.	Fl. gr.
1	0	62	78	70	—
2	6	62	72	62	—
3	12	54	64	56	—
4	18	51	59	51	—
5	24	46	52	46	—
6	30	35	42	35	—

Notas: Nenhum dos tubos apresentou flocos grossos. Os Nos. 5 e 6 tornaram-se muito mais claros com a fervura; resfriados voltaram á turvação.

Conforme se deprehende das duas tabellas acima, essas fracções, assim como a pseudoglobulina total, clarificam-se numa temperatura mais elevada. Quanto ao resto — a pseudoglobulina II — e de conformidade com seu grau de dispersão mais fino, toma uma posição intermediaria entre a seralbumina e a pseudoglobulina total, por um lado com temperaturas de coagulação correspondentes ás da pseudoglobulina total e da pseudoglobulina I e, por outro lado, permanecendo, como a seralbumina, clara mesmo numa concentração de alcool de 24 % (em temperatura ambiente) e sem apresentar flocos grossos.

Discussão dos resultados

Baseado nas experiencias relatadas, pode-se estabelecer como regra geral que:

1. o alcool abaixa a temperatura de coagulação;

2. a resistencia absoluta das differentes proteinas em relação ao alcool é diversa em cada especie.

A baixa da temperatura de coagulação é tão evidente e inequivoca que este facto, já estabelecido nas experiencias de Spiro (2), Loeb (3), Schorr (4). Teorell (5) e outros, não carece de discussão.

Considerando agora a resistencia absoluta das differentes proteinas, observa-se o seguinte:

A fibrinoglobulina occupa uma posição especial entre as demais fracções, mostrando-se os seus solutos a 0,93 e 0,233 % mais resistentes em relação ao alcool do que o soluto a 0,465 %. O soluto a 0,93 % só apresenta opalescencia numa concentração de alcool de 24 %, ao passo que o soluto a 0,465 % opalesce até com alcool a 18 %. A resistencia do soluto de 0,233 % é, sob este ponto de vista, intermediaria. Não apresenta opalescencia com 18 % de alcool, porém com 24 % já se nota uma consideravel turvação.

Na euglobulina a infuencia do alcool parece ser independente da concentração da proteina.

Os solutos mais concentrados da *pseudoglobulina* eram mais resistentes em relação ao alcool do que os diluidos, ficando os solutos de 1,86 e 0,93 % perfeitamente claros mesmo com alcool a 30 %, enquanto opalesce o soluto a 0,465 % com igual quantidade de alcool.

A *seralbumina* comporta-se mais ou menos como a *euglobulina,* isto é, o soluto diluido mostra-se tão resistente quanto o concentrado.

O comportamento do *soro* em geral corresponde á expectativa, mostrando-se muito semelhante a um soluto fortemente diluido de fibrinoglobulina. At-

tribuimos a circunstancia de apresentar o soro comparativamente com a fibrinoglobulina pura maior resistencia absoluta (com alcool a 24 % sempre se observava apenas opalescencia) á acção protectora das demais fracções albuminosas existentes no soro, a seralbumina, em primeiro logar. Esta observação está inteiramente de accordo com o effeito de estabilização das fracções albuminosas finamente dispersas que observámos durante o estudo da acção do sal (6).

Além destas influencias generalizadas do alcool, percebemos tambem acções especificas muito evidentes e dependentes da especie e concentração da proteina.

Estas differenças especificas referem-se á: 1) *floculação;* 2) *viscosidade* e 3) *alteração da capacidade de coagulação pelo calor.*

1) — Enquanto nos solutos de fibrinoglobulina e euglobulina (indifferentemente com ou sem alcool) com a elevação da temperatura, após previa opalescencia e turvação, apparecem flocos finos, em forma de fios e finalmente grossos, granulosos, a floculação na pseudoglobulina, seralbumina e soro depende, de um lado, do teor de alcool e, de outro lado, da concentração da proteina. O soluto de pseudoglobulina a 1,86 % apresenta ainda a mesma escala de coagulação dos solutos de fibrinoglobulina, porém nos solutos a 0,93 e 0,465 % só se formam flocos grossos com uma quantidade grande de alcool (pelo menos 24 %). Esta relação da floculação com a concentração de albumina e de alcool é ainda mais evidente na seralbumina. A seralbumina a 1,86 % não diverge absolutamente — quanto á formação de flocos grossos — da fibrinoglobulina e da euglobulina, ao passo que no soluto de 0,93 % só apparecem flocos grossos com alcool na concentração de 30 %, e no soluto de 0,465 % não ha essa floculação nem mesmo com 36 % de alcool.

Este comportamento diverso das fracções de dispersão fina e grossa, relativamente á coagulação pelo calor, indica que as alterações determinadas pelo calor dependem da dispersão das proteinas. Conforme foi primeiramente verificado por Hardy (7) e mais tarde por Pauli e Handovsky (8), essas alterações são determinadas por dois processos completamente independentes um do outro, isto é, a desnaturação e a floculação da proteina. A desnaturação é considerada consequencia de uma reacção entre a proteina e a agua. A floculação, de accordo com Pauli e Handovsky, depende dos iões H e dos outros porventura existentes, representando, portanto, uma reacção colloido-electrica. O processo da desnaturação ainda não está inteiramente esclarecido, havendo a esse respeito duas theorias oppostas: uma parte dos auctores [Sörensen (9), Weber e Versmold (10)] attribue o phenomeno a uma deshydratação; outros [Freund e Lustig (11)], ao contrario, a um augmento de hydratação. Si bem que os resultados das experiencias de Versmold (12), baseadas na determinação do espaço de hydratação, confirmem a theoria de Sörensen, ainda restam duvidas

sobre si essas experiencias, feitas com uma só proteina (ovalbumina) e com reacção acida, constituem base sufficiente para uma generalização da theoria de deshydratação. Considerando as experiencias por nós feitas, devemos suppor que esta generalização não é acertada, porque no processo da desnaturação a reacção do meio e a natureza da proteina desempenham papel da maxima importancia. A nosso ver a theoria da deshydratação — pelo menos com os pH por nós empregados — applica-se somente aos systemas de proteinas de dispersão grosseira, parecendo que nos de dispersão fina a alteração pelo calor é occasionada por um augmento da hydratação.

A influencia da deshydratação manifesta-se pela formação de flocos grossos, a do augmento de hydratação, por uma enorme elevação da viscosidade, a ponto de apresentarem os solutos uma consistencia semelhante á dos pesados oleos technicos. Na deshydratação occorre um desentumescimento das particulas de albumina, ao passo que como augmento de hydratação as mesmas se entumescem. Em consequencia do desentumescimento, as differentes particulas se apresentam asperas e irregulares, de maneira que, com as collisões, ficam presas umas ás outras, formando finalmente, depois de um certo numero de collisões, um unico floco grosso. O entumescimento das particulas naturalmente evita o seu agrupamento e occasiona um augmento da viscosidade. A circunstancia de, na presença do alcool em concentrações mais elevadas, apparecerem os flocos tambem nos solutos e proteinas de dispersão fina está em perfeita conformidade com a opinião acima emittida, pois, si se considerar que neste caso não existe a quantidade de agua necessaria para o entumescimento das particulas, impõe-se a idéa de que a capacidade de deshydratação, conjunctamente do calor e do alcool, produz um desentumescimento, isto é, deshydratação.

Do mesmo modo e baseado na theoria acima exposta, pode-se explicar o phenomeno da semelhança entre o comportamento dos solutos concentrados de pseudoglobulina e seralbumina e o das fracções de dispersão grosseira. Nestas o espaço de hydratação em relação ao espaço preenchido pela agua livre é tão pequeno, que uma aggregação de agua, por parte da proteina, motivada por falta de agua, não é possivel, ou pode occorrer apenas passageiramente, circunstancia esta que necessariamente dentro de pouco tempo conduz á deshydratação.

Deprehende-se do que foi dito que, nas condições das experiencias indicadas, *attribuimos a desnaturação pelo calor, nas fracções de albumina de dispersão grosseira (labeis), a uma deshydratação, nas de dispersão fina (estaveis), a um augmento de hydratação.*

Esta theoria não collide absolutamente com a natureza de phase dupla da coagulação pelo calor, porquanto ella se refere somente á primeira phase, isto é, á desnaturação.

Devemos accrescentar que a acção desnaturadora da deshydratação deve ser de natureza diversa da do augmento de hydratação. Esta conclusão nós a tiramos

da seguinte experiencia: interrompendo-se o aquecimento numa temperatura mais elevada (por exemplo, no caso de um soluto de pseudoglobulina livre de alcool, a 70°) e accrescentando-se á metade do conteudo da proveta algumas gottas de um soluto a 1 % de acido acetico, ha, naturalmente, em todos os solutos de proteina um novo precipitado. Resfriando-se rapidamente a outra metade do conteudo da proveta e juntando-se, agora, só o CH_3COOH aos solutos, não ha alteração perceptivel na pseudoglobulina e na seralbumina, ao passo que na fibrinoglobulina e na euglobulina se forma um precipitado. Donde concluimos que a *desnaturação em consequencia de deshydratação é irreversivel, enquanto a desnaturação consequente a um augmento de hydratação deve ser reversivel.*

O soro neste particular se comportou á semelhança das fracções albuminosas estaveis, o que não pode significar outra cousa sinão que a fibrinoglobulina na presença das fracções estaveis toma o caracter das mesmas. Não podemos por ora averiguar qual a maneira por que se processa esta estabilização; porém, baseado nas nossas experiencias ainda não publicadas, feitas com misturas compostas de fracções electrodialysadas, portanto com "soros artificiaes", estamos inclinado a crer que o grau de dispersão da fibrinoglobulina e da euglobulina é mais fino no soro do que em seus solutos puros.

2) — Conforme se verifica pelas tabellas VII, VIII, X, XI e XIII, os solutos a 1,86 e 0,93 % de pseudoglobulina e seralbumina e a diluição a 1,86 % de soro em presença de alcool são, attingida uma certa temperatura, extremamente viscosos. Procurámos expor a razão desse enorme augmento da viscosidade na parte da discussão sobre o augmento da hydratação, pelo que nos parece superfluo insistir neste ponto.

3) — Pelas observações accrescentadas ás tabellas VIII, IX, XVI e XVII evidencia-se o interessante facto de os solutos de pseudoglobulina mais diluidos, com um certo teor (18 % ou mais) de alcool perderem a sua capacidade de coagulação pelo calor, ou melhor, se comportarem, neste sentido, á semelhança dos corpos albuminosos de Bence-Jones (*). Estes solutos apresentam a turvação maxima bastante abaixo da temperatura de fervura; aquecidos até fervura, clarificam-se e, com o resfriamento, apparece um precipitado, que a um novo aquecimento torna a dissolver-se. A temperatura da turvação maxima depende da concentração da albumina e do alcool. No soluto mais concentrado, a temperatura em que apparece a turvação maxima é mais baixa do que nos mais diluidos e no mesmo soluto ella cae á medida que augmenta o teor de alcool. Resultado semelhante foi publicado por Torsten (13) em relação á ovalbumina e ao soro humano tamponados com acetato e esses resultados seriam, portanto,

(*) Sobre propriedades da proteina de Bence-Jones veja: Willheim, R. — Biochem. Zschr. CLXXX:231.1927.

completados com o comportamento semelhante da pseudoglobulina. A circunstancia de só os solutos relativamente diluidos apresentarem o caracter da proteina de Bence-Jones deve impor maior cuidado na observação desta proteina, especialmente quando na execução da prova, segundo a indicação de Malengrau (14)e Blix (15), se usa alcool.

Pelas observações junto ás tabellas verifica-se ainda que a maneira do aquecimento exerce consideravel influencia sobre os phenomenos da coagulação, o que, sem duvida, é motivado pelo curso differente da deshydratação.

Finalmente, desejamos dizer ainda alguma cousa sobre a proporção da baixa da temperatura de coagulação occasionada pelo alcool, portanto sobre a *resistencia relativa* das albuminas. Comparando-se os resultados obtidos com concentrações differentes da mesma proteina, pode-se tirar uma conclusão quanto á resistencia relativa das mesmas ao calor e ao alcool.

Sendo minimo o erro de observação ($\pm 0{,}5°$) quando se verifica a opalescencia, enquanto a leitura da turvação, mesmo quando se têm á mão solutos para comparação, pode com muito maior facilidade ser influenciada por motivos subjectivos (além disso nem todos os solutos apresentam floculação), tomámos por base essas observações comparativas a temperatura da opalescencia.

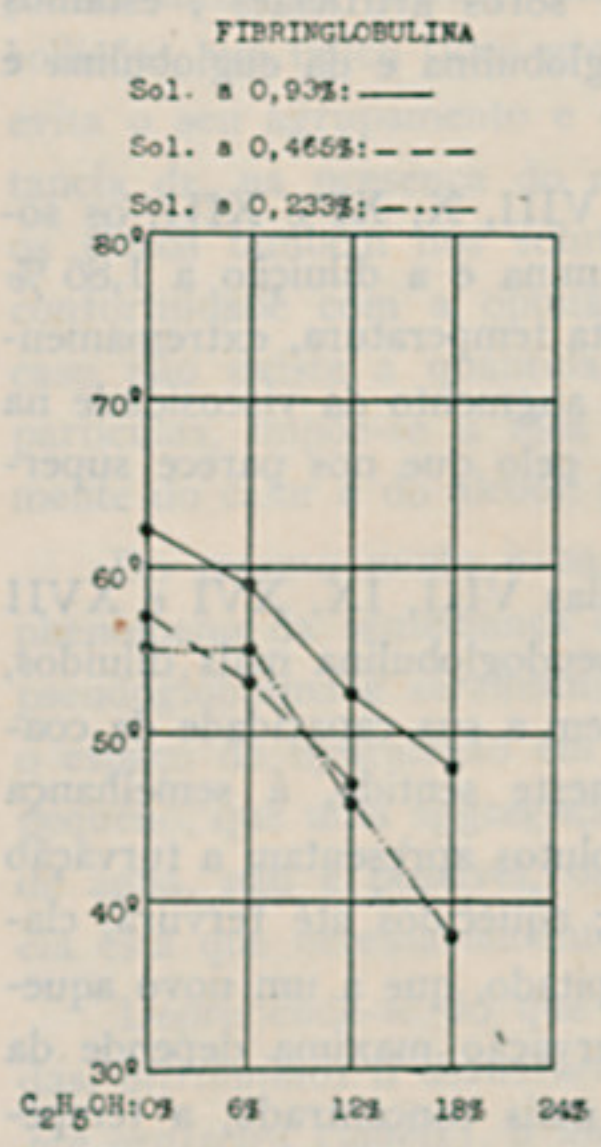


Fig. 1

Pelas Figs. 1 - 5 fica bem evidente que, á semelhança da resistencia absoluta, tambem a resistencia relativa se altera de accordo com a natureza e a concentração da proteina. As curvas dos solutos de fibrinoglobulina a 0,93 e 0,465 %, assim como as de euglobulina a 1,86 e 0,93 % apresentam-se, até um teor de alcool de 12 %, quasi iguaes. As curvas da fibrinoglobulina a 0,233 % e da euglobulina a 0,465 %, por sua vez, tambem são perfeitamente iguaes, até á referida concentração de alcool. A resistencia relativa dos solutos de fibrinoglobulina corresponde á absoluta, sendo minima no soluto a 0,465 %. Os solutos a 1,86 e 0,93 % apresentam a menor resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 12 a 18 %, enquanto a mesma na euglobulina a 0,465 % se manifesta entre as concentrações de alcool de 18 a 24 %. Na pseudoglobulina encontra-se a maior resistencia relativa no soluto a 0,453 %, de maneira que as resistencias absoluta e relativa desta proteina são oppostas. Todos os solutos apresentam a maior resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 12 a 18 %.

A seralbumina tambem possue, de accordo com sua elevada estabilidade, uma grande resistencia relativa, a qual até uma concentração de alcool de 24 %,

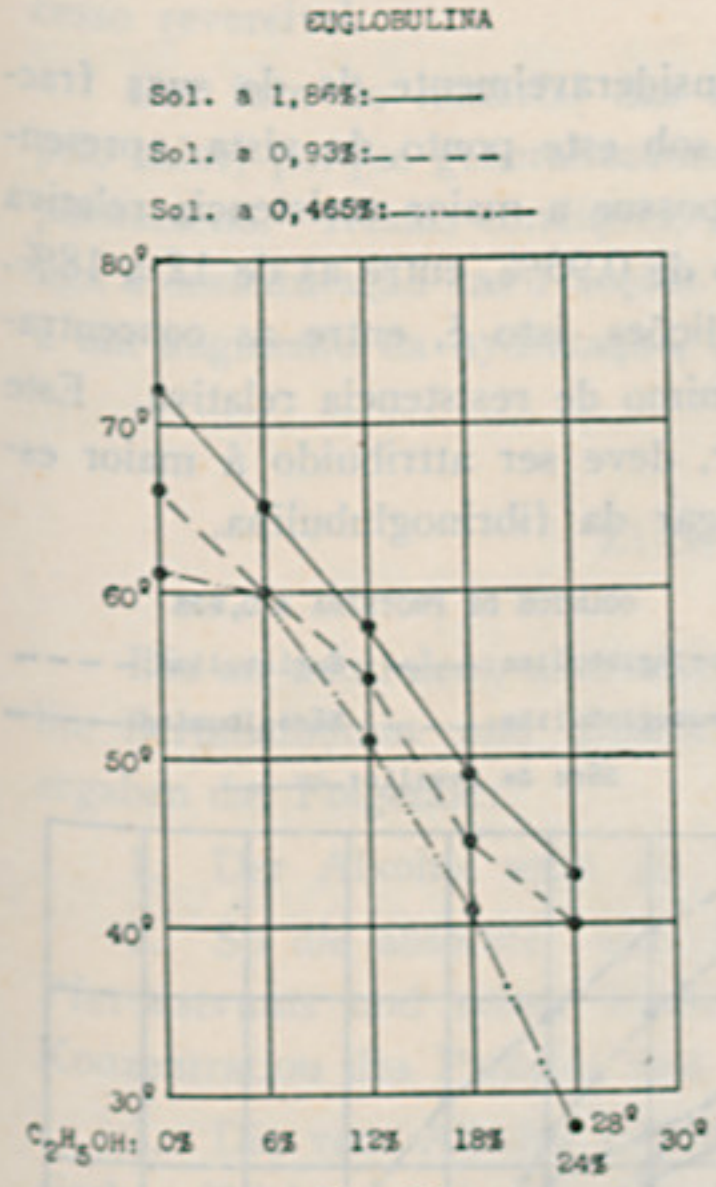


Fig. 2

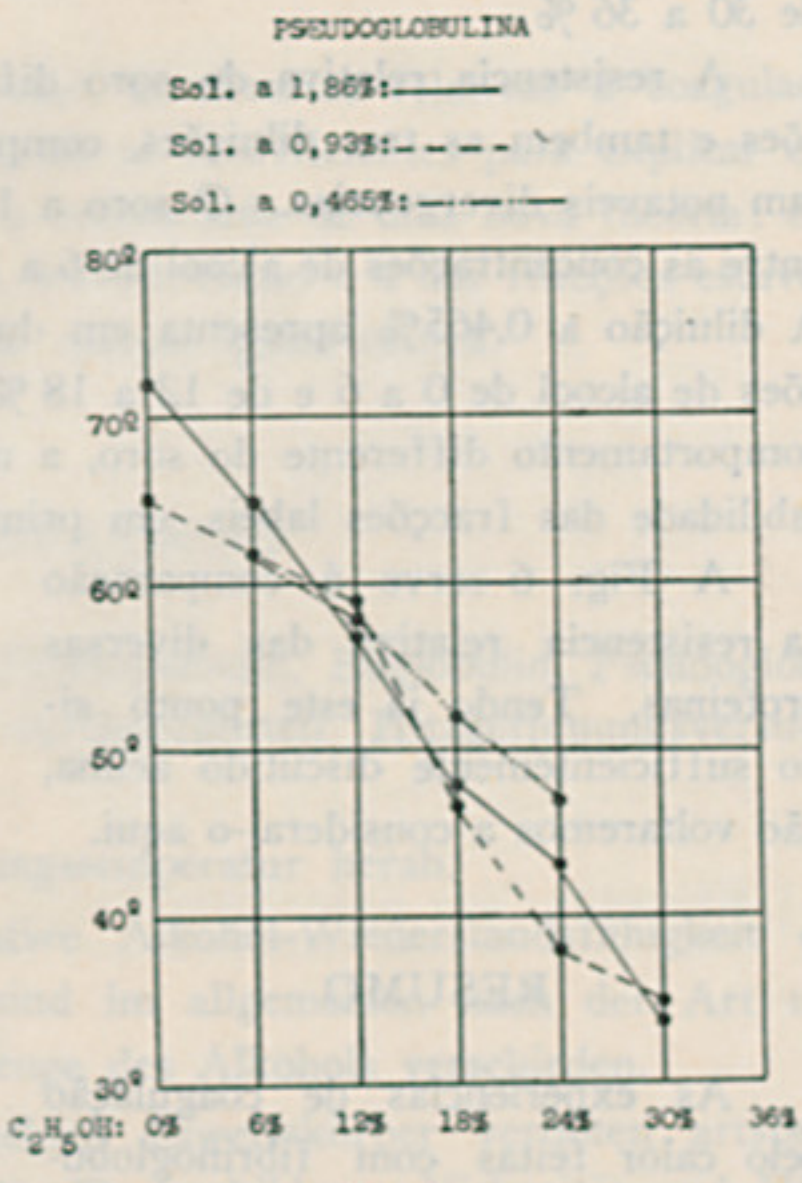


Fig. 3

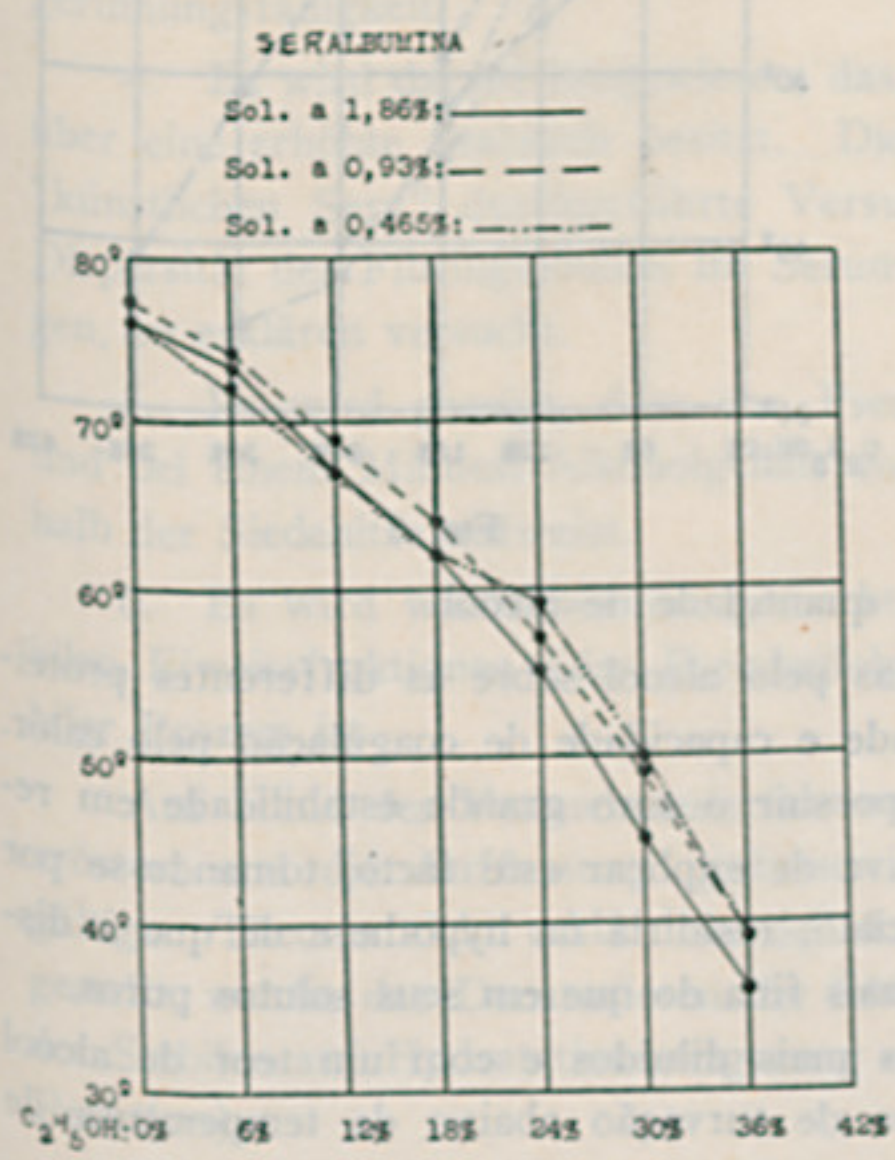


Fig. 4

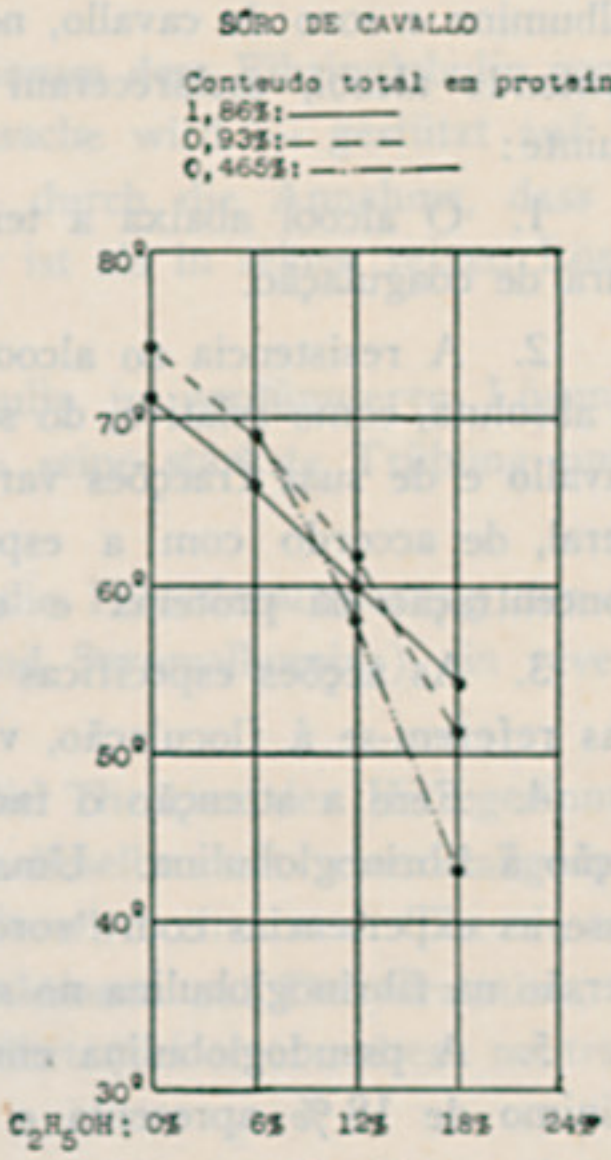


Fig. 5

independente da quantidade de proteina, é quasi perfeitamente uniforme. Esta proteina apresenta a menor resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 30 a 36 %.

A resistencia relativa do soro differe consideravelmente da de suas fracções e tambem as tres diluições, comparadas sob este ponto de vista, apresentam notaveis divergencias. O soro a 1,86 % possue a maior resistencia relativa entre as concentrações de alcool de 6 a 12%; o de 0,93%, entre as de 12 a 18%. A diluição a 0,465% apresenta em duas condições, isto é, entre as concentrações de alcool de 0 a 6 e de 12 a 18 %, o minimo de resistencia relativa. Este comportamento differente do soro, a meu ver, deve ser attribuido á maior estabilidade das fracções labeis, em primeiro logar da fibrinoglubulina.

A Fig. 6 serve á comparação da resistencia relativa das diversas proteinas. Tendo já este ponto sido sufficientemente discutido acima, não voltaremos a consideral-o aqui.

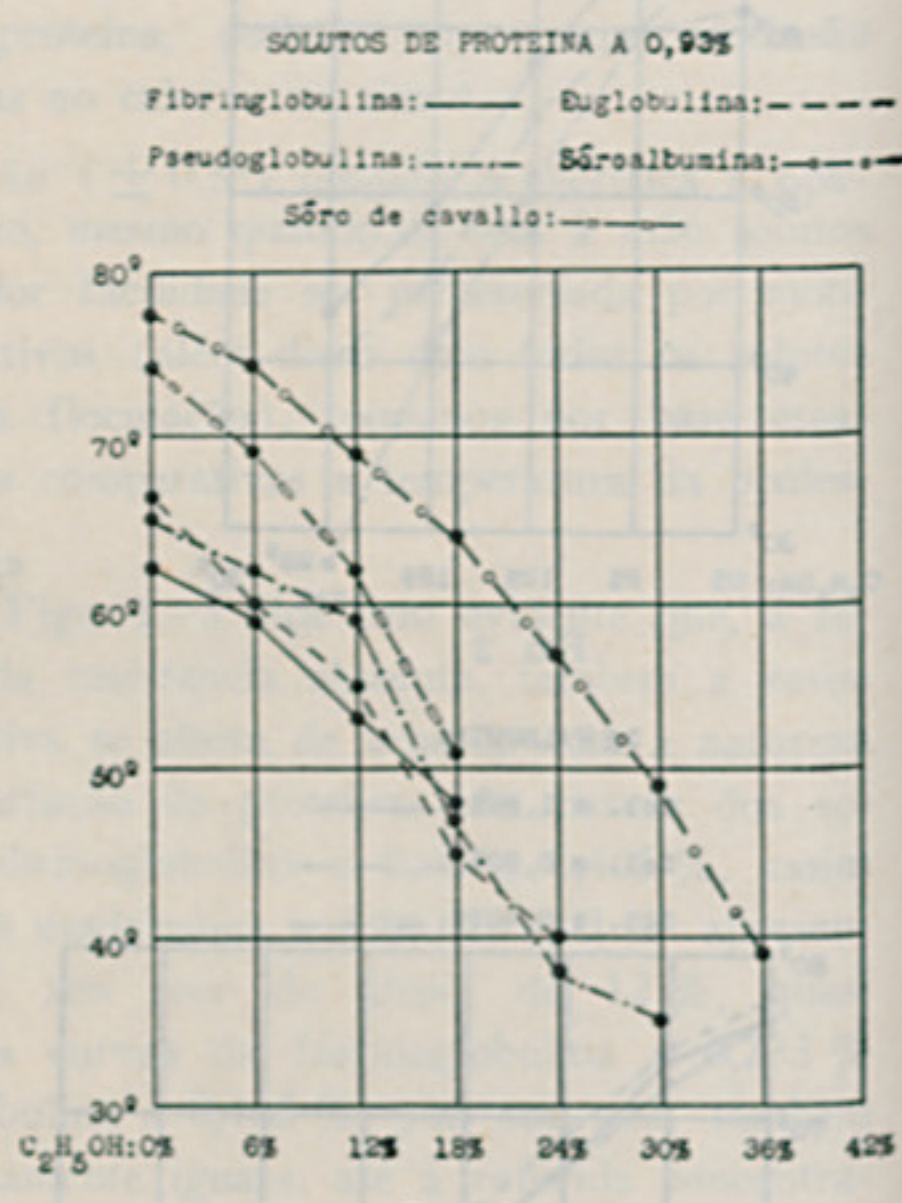


Fig. 6

RESUMO

As experiencias de coagulação pelo calor feitas com fibrinoglobulina, euglobulina, pseudoglobulina, seralbumina e soro de cavallo, neutros, contendo alcool, esclareceram o seguinte:

1. O alcool abaixa a temperatura de coagulação.

2. A resistencia ao alcool, tanto absoluta, como relativa, do soro de cavallo e de suas fracções varia, em geral, de accordo com a especie e concentração da proteina e com a quantidade de alcool.

3. As acções especificas exercidas pelo alcool sobre as differentes proteinas referem-se á floculação, viscosidade e capacidade de coagulação pelo calor.

4. Fere a attenção o facto de possuir o soro grande estabilidade em relação á fibrinoglobulina. Uma tentativa de explicar este facto, tomando-se por base as experiencias com "soro artificial", residiria na hypothese de que a dispersão na fibrinoglobulina no soro é mais fina do que em seus solutos puros.

5. A pseudoglobulina em solutos mais diluidos e com um teor de alcool minimo de 18 % apresenta o maximo de turvação abaixo da temperatura de fervura.

6. Ficou demonstrado que a desnaturação pelo calor das fracções albuminosas estaveis (da pseudoglobulina e da seralbumina) é provavelmente um processo reversivel.

Em face do material das experiencias, as theorias relativas á coagulação pelo calor, porque generalizadoras, afiguram-se insufficientes para explicar este phenomeno. Nestas condições, ressalta a necessidade de uma nova theoria: esta liga a desnaturação das fracções labeis á deshydratação e a das fracções estaveis, a um augmento da hydratação, com uma reacção quasi neutra.

ZUSAMMENFASSUNG

Die an neutralem, alkoholhaltigem Fibringlobulin, Euglobulin, Pseudoglobulin, Serumalbumin und Pferdeserum durchgeführten Hitzgerinnungsversuche ergaben das Folgende:

1. Der Alkohol setzt die Gerinnungstemperatur herab.

2. So die absolute, wie die relative Alkohol-Wiederstandsfähigkeit des Pferdeserums und seiner Fraktionen sind im allgemeinen nach der Art und Konzentration des Proteins und der Menge des Alkohols verschieden.

3. Die vom Alkohol auf die einzelnen Eiweisskörper verübten artspezifischen Wirkungen beziehen sich auf die Flockenbildung, Viskosität und Hitzgerinnungsfähigkeit.

4. Es wird darauf hingewiesen, dass das Serum dem Fibringlobulin gegenüber eine erhöhte Stabilität besitzt. Diese Tatsache wird — gestützt auf mit "künstlichen Sera" durchgeführte Versuche — durch die Annahme, dass die Dispersität des Fibringlobulins im Serum feiner ist als in seinen reinen Lösungen, zu erklären versucht.

5. Es wird gezeigt, dass das Pseudoglobulin in verdünnteren Lösungen und bei einem Mindest-Alkoholgehalt von 18 % seine stärkste Trübung unterhalb der Siedehitze aufweist.

6. Es wird wahrscheinlich gemacht, dass die Hitzedenaturierung der stabilen Eiweissfraktionen (des Pseudoglobulins und Serumalbumins) ein reversibiler Prozess ist.

Auf Hand des Versuchsmaterials werden die Theorien der Hitzegerinnung erörtert und die Auffassung geäussert, dass dieselbe mit einer allgemeingültigen Theorie nicht erklärt werden kann. Es wird eine neue Theorie aufgestellt, welche das Denaturieren der labilen Fraktionen auf Dehydratation, das der Stabilen auf Hydratationssteigerung zurückführt (bei einer nahezu neutralen Reaktion).

BIBLIOGRAPHIA

1. *Klobusitzky, D. von* — J. Phys. Chem. XXXVI:3189.1932 *et* Mem. Inst. Butantan VI:295.1931.
2. *Spiro, K.* — Beitr. chem. Physiol. IV:300.1904.
3. *Loeb, J.* — Die Eiweisskörper u. die Theorie der koll. Ersch., J. Springer, Berlin. 1924.
4. *Schorr, C.* — Biochem. Zschr. XLVII:269.1912.
5. *Teorell, T.* — Biochem. Zschr. CCXXIX:1.1930.
6. *Klobusitzky, D. von* — Biochem. Zschr. CCXXIII:120.1930; Koll. Beih. XXXII: 382.1931 *et* Mem. Inst. Butantan VI:276.1931.
7. *Hardy, W. B.* — J. Physiol. XXIV:158.1899.
8. *Pauli, W. et Handovsky, H.* — Beystr. chem. Physiol. XI:425.1908.
9. *Sörensen, S. P. L.* — C. R. Trav. Labor. Carlsberg XV:9.1925.
10. *Weber, H. H. et Versmold, H.* — Biochem. Zschr. CCXXXIV:62.1932.
11. *Freund, E. et Lustig, B.* — Biochem. Zschr. CLXVII:355.1926.
12. *Versmold, H.* — loc. cit. (10).
13. *Teorell, T.* — loc. cit.
14. *Malengrau, F.* — Arch. intern. Physiol. XVIII:151.1922.
15. *Blix, G.* — Svenska Läkaretidningen (38):1105.1930.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, recebido em fevereiro de 1934 e publicado em alemão *in* Biochemische Zeitschrift. Dado á publicidade em agosto de 1934.).

IMMUNIZAÇÃO COM O VIRUS VACCINICO CULTIVADO NA ALLANTOIDE DO EMBRYÃO DE GALLINHA

POR

R. GODINHO

(com 2 gravuras no texto)

614.521:614.47.

IMMUNIZAÇÃO COM O VIRUS VACCINICO CULTIVADO NA ALLANTOIDE DO EMBRYÃO DE GALLINHA

POR

R. GODINHO

A cultura do virus vaccinico em larga escala, fóra do organismo bovino, tem constituido preoccupação continua dos pesquisadores e visa, não sómente a simplificação do methodo de obter a vaccina activa, senão tambem a sua absoluta pureza do ponto de vista bacteriologico.

Datam as iniciativas neste sentido do começo do seculo actual, quando foram intentadas por Calmette e Guérin (1) (1901); desde então uma serie de notaveis trabalhos a este respeito tem feito sequencia: de um lado appareceram innumeras tentativas de multiplicação do virus em differentes orgãos de animaes sensiveis e, de outro, foi experimentada a sua cultura em meios especiaes de laboratorio, tanto cellulares, como acellulares.

Em continuação aos trabalhos de Calmette e Guérin destacam-se, entre os mais importantes, os de Henseval e Convent (2) (1910) e os de Noguchi (3) em 1915, de cultura do virus vaccinico, com propagação em serie no testiculo do coelho, baseados todos nas verificações feitas por Councilman (4) e outros sobre a localização do virus da variola em differentes visceras e orgãos; as pesquisas de Fornet (5) em 1913; os trabalhos de Edna Harde (6) em 1916, de cultura do virus em meio composto de plasma e cornea ou testiculo de coelhos e cobaias normaes; os resultados obtidos por Levaditi (7) em 1921, com a introducção do virus vaccinico no cerebro do coelho, conseguindo a neuro-vaccina que lhe conserva o nome; as verificações de Cracium e Oppenheimer (8), realizadas no departamento de pathologia da Universidade John Hopkins sobre cultura dos granulos vaccinicos *in vitro* em tecido embryonario; os trabalhos de Nye e Parker (9) em 1929, demonstrando a multiplicação do virus em cultura de tecidos e chegando á conclusão de que elle não póde ser cultivado com o uso de tecido morto ou sob condições anaerobicas; as observações de Maitland e Maitland (10) empregando meio composto de particulas de rim de gallinha suspensas em mistura de sôro do mesmo animal e liquido de Tyrode; as pesquisas de Eagles e McClean (11) em 1929, conseguindo não só a cultura em meio cellular, mas ainda

quatro gerações em subcultura. Ainda os trabalhos de Li e Rivers (12) em 1930, do Hospital do Instituto Rockefeller, de cultura de uma amostra de neurovirus, e os de Rivers e Ward (13) e (14) em 1931 e 1933, com o emprego tambem do embryão de gallinha suspenso em Tyrode como meio de cultura, obtendo quinze passagens successivas do virus com applicação do material da 10ª e 11ª passagem em immunização de crianças, com bom resultado. Apenas a duração da actividade do virus, mantido embora em baixa temperatura, não ultrapassou de um mez.

Nos laboratorios do Butantan tivemos occasião de emprehender tambem varias tentativas orientadas para o mesmo fim.Procurámos em 1931 repetir as experiencias de Maitland e Maitland, semeando em particulas de orgãos de coelho novo o nosso virus filtrado. Obtivemos sensivel multiplicação, demonstrada por provas de vacccinação em coelhos, mas sem melhores resultados nas passagens successivas.

Com J. Travassos tentámos tambem a cultura do virus vaccinico em varios meios preparados com macerado de orgãos de coelho (cerebro e rim) em differentes temperaturas. Não alcançámos, do mesmo modo, melhores resultados. Ainda com o mesmo fito de empregar nas tentativas de cultura do virus o tecido cellular obtido pela technica de Carrel, fomos incumbido de estudar a especialidade no Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, em 1932, e tratar da sua installação no Butantan opportunamente.

No decurso dessas tentativas chegou-nos a publicação de Stevenson e Butler (15) sobre inoculação do virus na allantoide do embryão de gallinha, utilizando-se do methodo descripto por Woodruff e Goodpasture (16). Aquelles auctores, lançando mão do virus vaccinico isento de germes extranhos e obtido com toda precaução das vesiculas de coelhos previamente inoculados com o dermo-virus, conseguiram infectar a membrana chorio-allantoidica de ovos ferteis no 12.º dia de incubação, segundo technica especial, separando quatro dias depois a membrana referida, onde em grande extensão se dá o desenvolvimento da vaccina no seu proprio tecido. A vida do embryão até ahi não soffre prejuizo, uma vez que o material inoculado não contem germes associados ao virus.

Obtido o material livre de contaminação extranha, perfeitamente activo, asseguram que a colheita correspondente a 28 ovos produz 36,0 grs. de polpa sufficiente para immunizar 7.000 pessoas.

Verificações pessoaes

Primeiros ensaios. — Sem demora procurámos repetir as interessantes experiencias descriptas, dispondo, para facilidade das inoculações embryonarias (Fig. 1), do nosso virus filtrado obtido desde 1929 em Butantan (17).

A technica por nós usada, com ligeiras modificações, foi quasi a mesma descripta por Stevenson e Butler, só divergindo na escolha da semente, que da nossa parte foi conseguida com mais facilidade por termos á mão virus puro filtrado suspenso em caldo glycosado. Depois de mais quatro dias de incubação dos ovos a allantoide destacada do embryão vivo foi tratada então como a polpa commum. Semeado o material em varios meios de laboratorio, este mostrou-se esteril e, verificada a actividade do virus por varios methodos, o resultado foi plenamente satisfactorio. A actividade da vaccina assim obtida era igual á da polpa commum fornecida pelo vitello.

Usando o mesmo material como semente em inoculação no vitello No. 26, pesando 111 kilos, no dia 24-XI-1933, o desenvolvimento das pustulas foi perfeitamente normal, produzindo 80,0 gms. de polpa (Fig. 2). Ha a assignalar ainda que a pustulação se fez sem reacção geral ou local e sem infiltração no tecido cellular subdermico, como acontece nas inoculações de polpas contaminadas communs. Varios coelhos inoculados com o mesmo virus tiveram identica forma de pustulação normal e, trinta dias depois, reinoculados com a vaccina commum, mostraram-se completamente immunes.

Observações experimentaes relativas ao virus vaccinico cultivado na allantoide do embryão de gallinha

I — Vitello (Photo 1)

No. do animal	*Data da vaccinação*	*Resultado*	*Quantidade de polpa obtida*	*Doseamento do virus. Methodo de Gins.*
Vitello No. 26	24-XI-933	Positivo. Evolução normal da vaccina. Colheita em 28-XI-933	80 gms.	Dil. 1/10.000 ++++ » 1/50.000 ++++

II — Coelhos

A. Valor immunizante do virus em relação á lympha commum.

Animal	*Virus usado*	*Data da inoculação*	*Resultado*	*Virus usado*	*Data da inoculação*	*Resultado*
Coelho No. 302	Virus de cultura no embryão de gallinha	6-XI-933	++++ Pustulação normal	Vaccina commum	6-XII-933	Negativo
Coelho No. 303	»	»	»	»	»	»
Coelho No. 304	Dil. 1/1000	12-XI-933	»	»	13-XII-933	»
Coelho No. 9	»	»	»	»	»	»
Coelho No. 10	Dil. 1/10.000	12-I-934	»	»	12-II-934	»
Coelho No. 11	Dil. 1/10.000	»	»	»	12-II-934	»

B. Immunização com a vaccina commum e ulterior inoculação com o virus de cultura no embryão de gallinha.

Animal	*Virus usado*	*Data da inoculação*	*Resultado*	*Virus usado*	*Data da inoculação*	*Resultado*
Coelho No. 39	Polpa vaccinica No. 4.788	15-XII-933	++++	Virus de cultura no embryão de gallinha	16-I-934	Negativo
Coelho No. 28	»	»	++++	»	»	»
Coelho No. 45	»	»	++++	»	»	»

Passagens successivas do virus de embryão a embryão — Embora posta fóra de duvida esta parte importante da questão pelos citados A.A. que, segundo recente publicação (18), já tinham obtido setenta e cinco passagens em serie, sem prejuizo para a integridade do virus, tratámos de repetir-lhes a pesquisa, possuindo no momento virus já na 14.ª passagem. Os resultados da verificação da actividade do ovo-virus pelo methodo de Gins revelaram sensivel decrescimo desta em relação ás primeiras e ás demais passagens.

O exame comparativo, que fizemos com a vaccina commum, com o virus puro filtrado e com o ovo-virus, demonstrou que a relativa acceleração, naturalmente observada, na reacção ocular, na qual se baseia o methodo de Gins, parece ser devida á interferencia da flora de associação que, por um processo irritativo, prepara o terreno. Desde as primeiras 24 horas em seguida á escarificação da cornea do animal de experiencia essa irritação parece preparar o terreno para a ceratite vaccinica. Esta, por sua vez, se evidencia, francamente, depois do 4.º dia nos casos de grande riqueza de virus.

Com o virus puro filtrado, o processo de formação da ceratite é mais tardio, iniciando-se sempre depois do 5.º ou do 6.º dia. O mesmo se observa quanto á formação da pustula nos individuos vaccinados com o virus puro, cujo cyclo evolutivo é diverso do da vaccina commum.

Com o ovo-virus obtivemos este mesmo desenvolvimento tardio, tanto da pustulação, como da reacção ocular nas cobaias. Apenas nas primeiras passagens do virus de embryão a embryão foi mais precoce e intensa a reacção: este phenomeno seria devido á provavel existencia de formas filtraveis de certos germes existentes em associação com o virus filtrado, formas essas que perdurariam nas primeiras culturas do ovo-virus. Este assumpto constituirá objecto de uma investigação especial, já por nós iniciada.

Immunização humana. — Restava-nos tambem o estudo desta ultima parte como finalidade das interessantes pesquisas sobre o novo methodo de cultura do virus, que parece fadado a resultados mais animadores do que todos os demais até aqui tentados para substituir o classico systema de inoculação bovina e obtenção da polpa, afinal, isenta de contaminação extranha.

Embora não existindo duvida acerca da innocuidade da vaccina assim obtida, verificada a sua não pathogenicidade, por todos os meios de laboratorio e convencidos de que os seus resultados seriam perfeitamente identicos aos que temos obtido com o emprego do virus puro filtrado, ainda não tinhamos, todavia, feito a sua applicação humana, quando tivemos conhecimento, pela publicação já citada *in* "Science", dos excellentes resultados obtidos com a sua applicação *in anima nobile*, com todas as provas de immunidade cruzada e feita comparativamente com a vaccina commum, com tal methodo, as vantagens foram consideradas bem patentes, conforme se deprehende do seguinte trecho do alludido trabalho:

> "The lesions developing from the virus cultivated on the chick embryo were slightly milder in their appearance. The different stages of the lesion were delayed about one day, as compared with those appearing from the regular calf vaccine. There was less induration of the surrounding subcutaneous tissues, and the involvement of the adjacent lymph nodes was not quite so extensive. In the pustular stage the lesions from the chick strain of vaccine did not

contain as large an amount of pus. The crusts were thinner and more flaky and when separated did not leave so marked a depression as those from the calf strain of virus. On the whole the lesions from the chick strain of vaccine were less painful and caused less discomfort.

The lesions produced by the vaccine virus carried through seventy-five passages on the chick membrance were definitely milder throughout the first eight days of their course, but passed through the successive stages in a typical manner. They then rapidly increased in severity to reach their height on the tenth to the twelfth day when their appearance was quite comparable to the lesions produced by the regular calf strain of virus.

The scars left by all the vaccinations are quite comparable as to size, all averaging about 1 to 1.5 cm in diameter. They are all slightly depressed below the surrounding surface. Those produced by the calf strain of virus are slightly deeper. There is evidently less scar tissue formation in the lesions produced by the chick strain of vaccine, as they feel thinner and are less pitted and wrinkled."

Estas vantagens coincidem perfeitamente com os resultados do emprego por nós feito do virus puro filtrado e, em 1930, referidas do seguinte modo (19):

"Applicação do virus filtrado na pratica

Emprego do virus puro como semente e na pratica — Para a verificação da actividade do virus puro, filtrado e dos resultados da sua utilização como semente, servimo-nos de um vitello, vaccinando-o, em uma zona do ventre, com o virus filtrado e, em outra zona, com a suspensão do virus não filtrado. As duas zonas, de cerca de 10 cm^2 cada uma, foram escarificadas, e os virus, na dose de 1 cc., foram esfregados na respectiva zona, estando o operador com luva de borracha.

Em ambas as regiões as pustulas se desenvolveram: com o virus não filtrado, notou-se reacção local mais intensa, ao passo que com o virus filtrado, não se observou reacção inflammatoria e as pustulas, embora menores, se mostraram mais typicas.

Outro vitello foi vaccinado igualmente com o virus filtrado, conservado em condições favoraveis (abaixo de 0°C.) durante 2 meses. A pustulação mostrou-se bem caracteristica, não se observando reacção inflammatoria.

Ainda outro vitello foi vaccinado exclusivamente com o virus puro e filtrado, já para uso industrial da vaccina, com excellente resultado de desenvolvimento das pustulas e rendimento da polpa.

Deante destes resultados experimentaes e da applicação do virus no vitello, tratámos primeiro de verificar a immunidade conferida pelo virus filtrado em relação á lympha commum e vice-versa, em experiencias cruzadas, em coelhos, e vitellos, para em seguida iniciarmos o emprego do nosso virus filtrado, puro, na vaccinação anti-variolica.

Essa immunidade provocada pelo virus filtrado em relação á polpa vaccinica commum ficou bem demonstrada, tanto sob o ponto de vista experimental, por meio das citadas observações em coelhos e vitellos, como sob o ponto de vista pratico, em resultado da vaccinação de pessoas, tendo igualmente sido verificado que a vaccina commum confere immunidade em relação ao virus filtrado.

Para a applicação pratica, o virus filtrado é distribuido em empolas de 0,5 cc., de modo a se tornar facil sua utilização. Essa quantidade é sufficiente para a vaccinação de, pelo menos 5 pessoas, porquanto as empolas contêm geralmente um excesso de producto.

Antes de se proceder á vaccinação, é aconselhavel fazer-se uma applicação previa de ether sobre a região a ser escarificada e isto para se reduzirem as probabilidades de infecções secundarias. Em seguida se deposita uma pequena gotta do liquido contido na empola em dois pontos sufficientemente separados (região deltoidiana de preferencia ou outro qualquer ponto que se escolha). Faz-se então a escarificação do tegumento segundo os methodos usuaes, tendo-se sempre o cuidado de evitar o apparecimento de sangue.

Resultados clinicos — Até agora praticamos com o virus filtrado 33 vaccinações em pessoas, adultos e creanças, residentes em Butantan e proximidades.

Quanto á evolução das pustulas, não se observa a reacção local, muitas vezes intensa, como commummente. As pustulas são bem formadas e cercadas por uma ligeira areola pouco avermelhada.

Pelas vaccinações já praticadas, verifica-se um resultado de 100% de casos positivos em primo-vaccinados; em 19 revaccinados, 7 tiveram a vaccina propriamente dita, 11 tiveram reacção de immunidade e em 1 o resultado é desconhecido.

Para confirmação experimental da immunidade conferida pelo virus vaccinico puro e filtrado, praticamos, como vimos, algum tempo depois, a inoculação da vaccina commum em 5 creanças que haviam sido primo-vaccinadas com o filtrado e em todas ellas observá-

mos reacção de immunidade typica, o mesmo acontecendo tanto no coelho como no vitello anteriormente vaccinados com o virus puro, filtrado.

Devemos assignalar ainda que todos os individuos por este meio vaccinados apresentam um processo especial de cicatriz das pustulas, que não deixa senão uma imperceptivel mancha com tendencia franca ao completo apagamento."

Deste modo começámos, sem receio, o emprego humano da vaccina de cultura no ovo e os resultados até agora são identicos aos obtidos por Stevenson e Butler e as vantagens semelhantes as do emprego do virus filtrado que vimos praticando desde 1929.

III — Observações clinicas

No.	*Data*	*Nome*	*Idade*	*Primo-vaccinado*	*Revaccinado*	Resultado	
						Primo-vaccina	*Reacção de immunidade*
1	30-XI-33	M. M. O.	4	Sim		Sim	
2	»	L. T.	4	»		»	
3	»	A. T.	0.7	»		»	
4	3-I-34	N. C. S.	2		Sim		Sim
5	5-I-34	A. N. S.	2		»		»
6	»	S. S.	8	»		»	
7	»	R. S.	6	»		»	
8	»	S. S.	4	»		»	
9	»	L. M. S.	2,9		»		»
10	6-I-34	J. M. G.	5,6	»			»
11	»	F. R. G.	4	»			
12	»	W. R. G.	1.6	»	»	»	
13	9-I-34	M. D. G.	4		»	»	
14	»	A. D. G.	2	»	»	»	
15	»	O. G. M.	2	»	»	»	
16	»	D. C.	1,8	»	»	»	
17	»	B. C.	8		»	»	
18	»	J. C.	6	»	»	»	
19	»	J. C. F.°	4	»	»	»	
20	»	D. R. B.	1.3	»	»	»	
21	»	Y. R. B.	3	»	»	»	
22	»	M. L. C.	6	»	»	»	
23	»	J. L. C.	4	»	»	»	
24	»	A. L. C.	1.7	»	»	»	

Resumindo estas considerações em torno das tentativas, feitas por toda parte, sobre cultura artificial do virus vaccinico para a sua obtenção em estado de pureza podemos accentuar que nenhuma dellas alcançou a desejada finalidade de substituir a bovo-vaccina com reaes vantagens.

Embora podendo-se produzir em maior volume, sinão em escala industrial, a *orchi-vaccina* de Noguchi e a *neuro-vaccina* de Levaditi perderam o seu valor pratico por força dos estudos de Duran-Reynals (20); estes estudos evidenciaram que os extractos de orgãos, principalmente de testiculo, exercem effeito nocivo sobre a vaccina, porquanto augmentam as lesões por ella determinadas. Por sua vez, os tristes casos de encephalites post-vaccinicas, surgidos ultimamente, contra-indicam tambem o emprego da *neuro-vaccina,* embora não se acredite em geral seja esta o verdadeiro incitante daquella complicação.

Das demais tentativas de cultura *in vitro,* as baseadas no emprego de meios cellulares foram as que deram melhores esperanças aos pesquisadores e, na bibliographia do assumpto, chegamos a ver, com satisfacção, que Rivers e Ward, já citados, conseguiram quinze passagens em serie e até mesmo resultado satisfactorio na applicação humana; todavia, o virus por elles obtido mostrou-se de fraco poder de preservação da actividade e por isso inefficaz do ponto de vista pratico.

O meio acellular é improprio á manutenção da actividade do virus vaccinico, quaesquer que sejam as condições da sua conservação. Para que perdure a sua integridade, mesmo quando mantido em baixa temperatura, ao abrigo da luz e em meio chimico optimo, é necessaria a presença de cellula viva a elle adaptada. Si para tanto a cultura do tecido, como rotina, não tem dado os resultados previstos por Carrel, é provavel que a nova technica de aproveitamento da membrana chorio-allantoidica do ovo, possibilitando a multiplicação de virus puro e em meio cellular, consiga resolver o problema, porquanto a secular utilização do vitello, por si só, não tem podido fornecer o virus puro, apezar de todos os aperfeiçoamentos introduzidos na technica até o presente.

RESUMO

Muitas têm sido as tentativas, feitas por toda parte, para a cultura artificial do virus vaccinico, mas nenhuma dellas alcançou a desejada finalidade de substituir a bovo-vaccina com reaes vantagens.

A extensa bibliographia do assumpto mostra que os meios cellulares são os que têm dado melhores esperanças aos pesquisadores, porquanto a presença da cellula viva é sempre necessaria á manutenção da actividade do virus vaccinico. Em taes condições, a nova technica de Stevenson e Butler baseia-se na inoculação do virus na allantoide do embryão de gallinha, utilizando o methodo descripto por Woodruff e Goodpasture. Aquelles auctores, lançando mão do virus

vaccinico isento de germes estranhos e obtidos com toda precaução das vesiculas de coelhos previamente inoculados com o dermo-virus, conseguiram infectar a membrana chorio-allantoidica de ovos ferteis no 12º dia de incubação, segundo technica especial, separando quatro dias depois a membrana referida onde em grande extensão se dá o desenvolvimento da vaccina no seu proprio tecido. A vida do embryão até ahi não soffre prejuizo uma vez que o material inoculado não contem germes associados ao virus.

Obtido o material livre de contaminação estranha, perfeitamente activo, asseguram que a colheita correspondente a 28 ovos produz 36,0 gms. de polpa sufficiente para immunizar 7.000 pessoas.

A secção de Virus do Instituto Butantan, ao decidir ensaiar essa nova technica, levava a vantagem sobre os demais laboratorios de já possuir virus vaccinico puro, obtido por previa filtração, conforme publicação feita em 1929, de sorte que facilmente conseguiu repetir as interessantes experiencias de Stevenson e Butler, obtendo, não só passagens successivas do virus de embryão a embryão, como resultados satisfactorios com o seu emprego na immunização experimental e na vaccinação humana, sendo de 24 o numero de casos até agora. As vantagens do novo processo coincidem perfeitamente com os resultados obtidos no Instituto desde 1929, quando foi iniciado o emprego do virus puro, filtrado. E' provavel que a nova technica do aproveitamento da membrana chorio-allantoidica do ovo, possibilitando a multiplicação do virus em meio cellular, consiga resolver o problema do fornecimento directo do virus puro em escala industrial.

ABSTRACT

The Virus Department of the Instituto Butantan has applied with excellent results Stevenson and Butler's technique of inoculation of vaccinia virus into the allantoid of chicken embryo, as originated by Woodruff and Goodpasture. In applying that technique the Instituto Butantan had over the other laboratories the advantage of already possessing the pure vaccinia virus as obtained by filtration since 1929. The application of virus cultivated in successive passages from embryo to embryo has given in both experimental and human immunizations (24 cases) the same good results as obtained with the pure filtered virus and described in Mem. Inst. Butantan V:3-23.1930.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Calmette, A. & Guérin, C.* — Recherches sur la vaccine expérimentale. Essais de culture «in vivo» de l'agent virulent du vaccin — Annales de l'Institut Pasteur XV (1):166.1901.

2. *Henseval, M. & Convent, A.* — Contribution à l'étude expérimentale: l'injection de vaccin dans les testicules — Bull. Acad. Roy. Méd. de Belgique. Série IV.XXIV: 635.1910.

3. *Noguchi, H.* — Pure cultivation «in vivo» of vaccine virus free from bacteria — J. Exper. Med. XXI:539.1915.

4. *Councilman, W. T.; Magrath, G. B. & Brinkerhoff, W. R.* — The pathological anatomy and histology of variola — J. Med. Research XI:12.1904.

5. *Fornet, W.* — Die Reinkultur des Pockenerregers — Berlin. Klin. Wochenschr. I.1913.

6. *Harde, E.* — Some observations on the virus of vaccinia — Annales Inst. Pasteur XXX(7):299.1916.

7. *Levaditi, C.; Harvier, P. & Nicolau, S.* — Affinités neurotropes du virus de la vaccine — C. R. Soc. Biologie LXXXV:425.1921.

8. *Cracium, E. C. & Oppenheimer, E. H.* — The cultivation of the granules of vaccinia virus — J. Exper. Med. XLIII:815:1926.

9. *Robert, N. Nye & Parker, Frederic* — Studies on filterable virus — Amer. J. of Path. V (2):147.1929.

10. *Maitland, H. B. & Maitland, M. C.* — Cultivation of vaccinia virus without tissue culture — Laucet II:596.1928.

11. *Eagles, G. H. & McClean, D.* — Cultivation of vaccina virus — Brit. J. Exper. Path. X:35.1929.

12. *Li, C. P. & Rivers, T. M.* — Cultivation of vaccine virus — J. Exper. Med. LII(4): 465.1930.

13. *Rivers, T.* (with the technical assistance of S. M. Ward) — Cultivation of vaccinia virus from Jennerian prophylaxis in man — J. Exper. Med. LIV(4):453-461.1931.

14. *Rivers, T. M. & Ward, S. M.* — Observations on the cultivation of vaccine virus in fifeless media — J. Exp. Med. LVII(1):51.1933.

15. *Stenvenson, W. D. H. & Butler, G. G.* — Dermal strain of vaccinia virus grown on the chorio-allantoic membrane of chick embryos — The Lancet CCXXV (5735): 228.1933.

16. *Coodpasture, E. W.; Woodruff, Alice & Budding, G. J.* — Vaccinal infection of the chorio-allantoic membrane of the chick embryo — Amer. J. of Path. VIII(3): 271.1932.

17. *Monteiro, J. Lemos & Godinho R.* — A prophylaxia da variola com o emprego do virus vaccinico filtrado e puro — Bol. Soc. Med. Cir. S. Paulo XIV(10-12): 440.1931.

18. ———— Human immunization with a dermal vaccine cultivated on the membranes of chick embryo — Science LXXVIII (2030):484.1933.

19. *Monteiro, J. Lemos & Godinho R.* — Do preparo da lympha vaccinica — Memorias do Instituto Butantan V:3.1930.

20. *Duran-Reynals, F.* — The effects of certains organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus — J. Exper. Med. L(3):327.1929.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, recebido em maio de 1934. Dado á publicidade em agosto de 1934.)



Fig. 1

Eschema de ovo de gallinha, com a zona da allantoide, escolhida para inoculação do virus vaccinico, em corte tangencial.

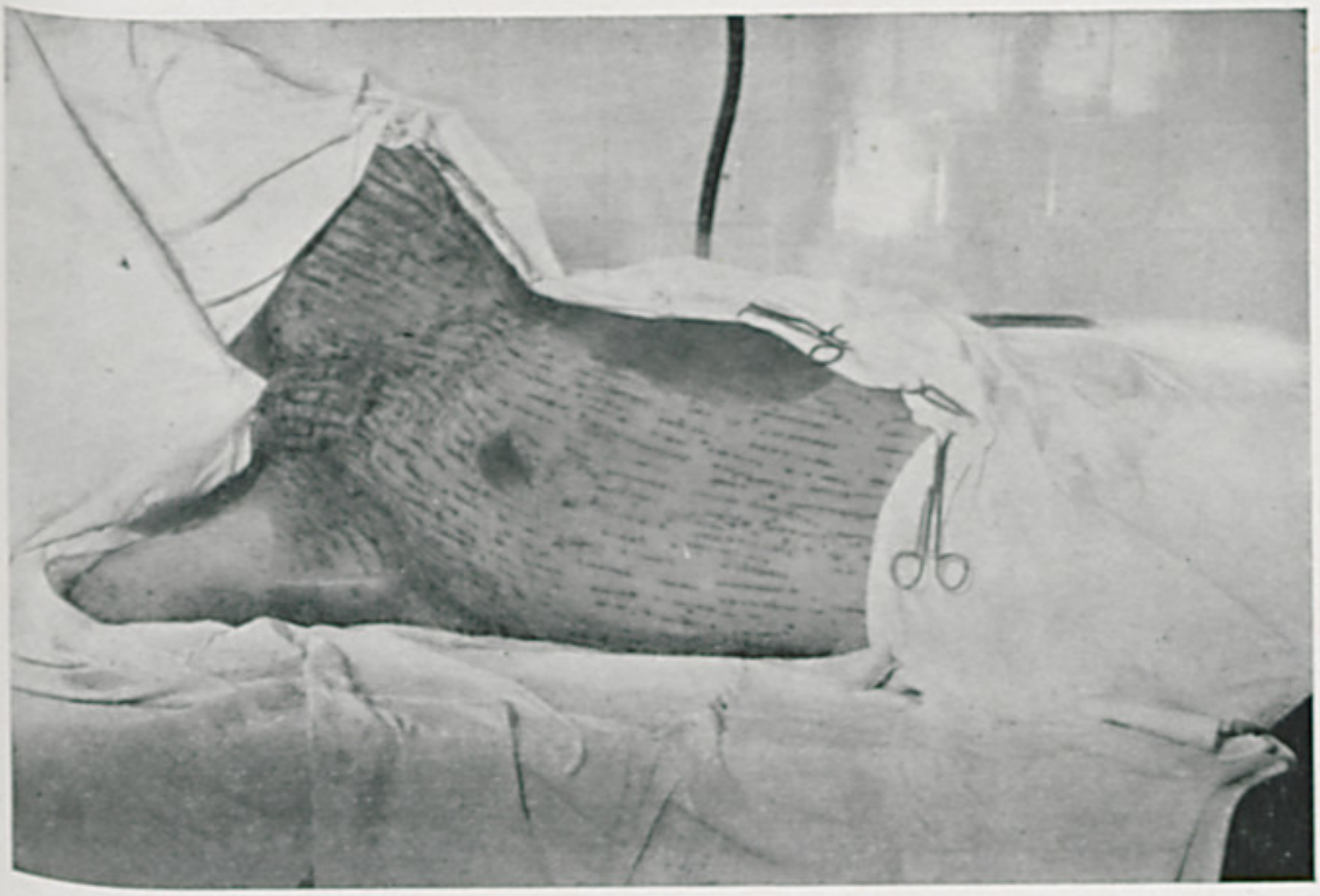


Fig. 2

Vitello No. 26, inoculado com ovo-vaccina e que produziu 80 gs. de polpa.

UMA NOVA ESPECIE DE ESCORPIÃO DO GENERO *BOTHRIURUS* PETERS

POR

ALCIDES PRADO

(*com 2 gravuras no texto*)

595.46:981

UMA NOVA ESPECIE DE ESCORPIÃO DO GENERO *BOTHRIURUS* PETERS

POR

ALCIDES PRADO

Entre os especimes de escorpiões existentes na collecção do Instituto Butantan, um se achava sob a rubrica de *Bothriurus* sp.. Examinado pelo prof. Mello-Leitão, do Museu Nacional do Rio de Janeiro, foi o mesmo confirmado como representante de especie nova.

Consta, pois, este trabalho, da descripção do holotypo, femea, do *Bothriurus mello-leitãoi,* sp. n., nome este dado em homenagem áquelle distincto arachnologo brasileiro.

Bothriurus mello-leitãoi, sp. n.

♀ — Cephalothorace pardo, ligeiramente marmorado, em negro. Tergitos da mesma côr, com uma faixa pardo-amarellada, mediana. Esternitos pardo-amarellados. Cauda uniformemente pardo-escura; vesicula pardo-avermelhada, com a ponta pardo-escura. Palpos pardo-avermelhados, levemente marmorados, em negro. Patas pardo-amarelladas, com manchas reticuladas, negras.

Cephalothorace: liso, brilhante, apenas com uma fileira estreita de granulos ao longo da borda posterior. Comoro ocular sem sulco mediano.

Tergitos I a VI, finamente granulosos, com uma camada de grossos granulos na sua parte posterior; tergito VII com granulos grossos mais ou menos disseminados.

Esternitos I a IV lisos; esternito V, com quilhas longitudinaes reduzidas.

Cauda: segmentos I a III com as cristas mediano-dorsaes e latero-dorsaes completas; segmentos IV e V, com as primeiras bem marcadas e as segundas ausentes; espaços entre as cristas escavados e finamente granulosos; face ventral do segmento I, com quilhas longitudinaes nitidas; segmentos II a IV lisos; segmento V, granuloso, caracteristico (fig. 1): uma fila de granulações algum tanto curva para cada lado, na porção posterior, que se dirige para a linha mediana, formando uma area terminal bem visivel; outra fila mediana de gra-

nulos se eleva a partir dessa area e se prolonga até á porção anterior; granulações esparsas dos lados; vesicula lisa e chata na parte dorsal, granulosa e arredondada na ventral; sulco liso para cada um dos lados.

Palpos: femur com minusculas quilhas granulosas no lado inferior; tibias quasi lisas e ligeiramente escavadas no lado inferior; mão, cerca do dobro da largura da tibia; dêdo movel pouco menor do que a mão, com uma crista granulosa flanqueada por cinco granulos maiores.

Patas: metatarsos III e IV, com duas filas inferiores, cada uma com dois espinhos na metade apicilar dos respectivos articulos; fileira mediana de pequeninas cerdas por toda extensão desses articulos; metatarso II, apenas com dois espinhos inferiores; metatarso I, sem espinhos inferiores.

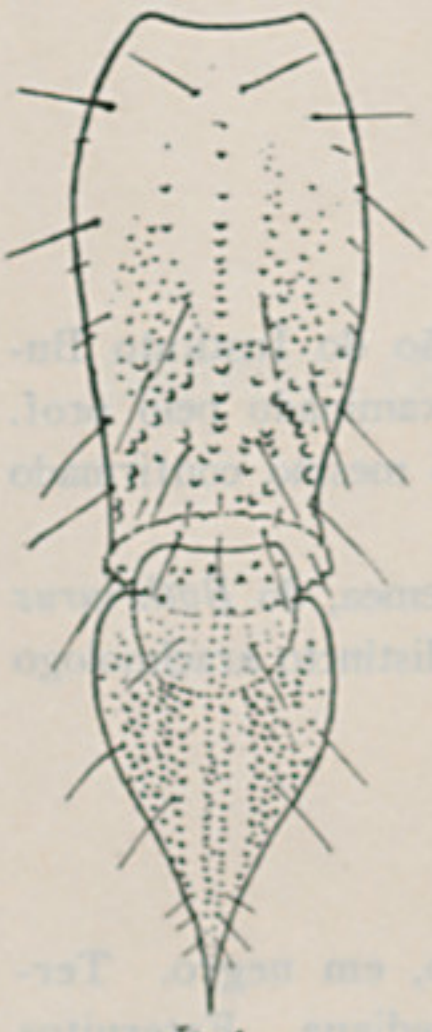


Fig. 1

Operculo genital: com duas placas triangulares, cujas bordas parallelas se juxtapõem na linha mediana.

Orgãos pectineos pilosos; pente (fig. 2), com 10 dentes.

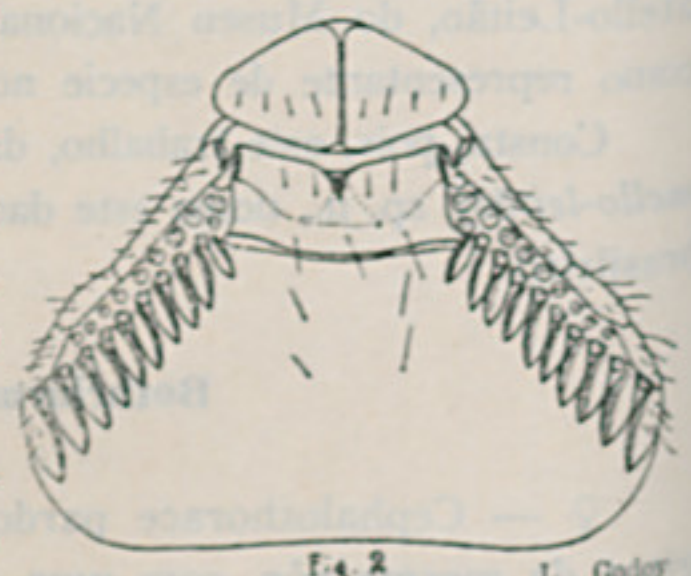


Fig. 2 L. Godoy

Medidas: comprimento total: 35 mm.; tronco 16 mm.; cauda 19 mm.. Mão 3 mm.5 x 2; dêdo movel 3 mm.

Habitat: Corumbatahy, Estado de S. Paulo, Brasil.

Colleccionado por Sylvio Burian.

Holotypo, femea, em vidro sob No. 93, na collecção do Instituto Butantan, S. Paulo.

Esta especie é affim de *Bothriurus signatus* Pocock, 1893, da qual se distingue pelo numero de dentes pectineos, como tambem pela disposição das granulações ventraes no segmento caudal V, alem das pequenas diversidades no colorido geral.

ABSTRACT

Bothriurus mello-leitãoi is described as a new species of scorpion (*Bothriuridae*), differing from *B. signatus* Pocock in the number of pectineal teeth, in the arrangement of the granules under ventral segment V and in colouration.

(Trabalho da Secção de Zoologia Medica do Instituto Butantan, apresentado em julho de de 1934. Dado á publicidade em agosto de 1934).

NOTAS SOBRE CHROMATISMO DE OPHIDIOS

POR

AFRANIO DO AMARAL

(*com 4 gravuras*)

591.157:598.121.81

NOTAS SOBRE CHROMATISMO DE OPHIDIOS

III. Um caso de xanthismo e um novo de albinismo, observados no Brasil

POR

AFRANIO DO AMARAL

Nos primeiros trabalhos sobre anomalia de chromatismo em serpentes eu me occupei de casos de albinismo, respectivamente (1, 2, 3), em uma "Boicorá" (*Pseudoboa trigemina*), em quatro "Cascaveis" (*Crotalus t. terrificus*) e em uma "Dorme-dorme" (*Sibynomorphus turgidus*).

A primeira Nota da presente serie (4) versou sobre a predominancia do pigmento vermelho e a completa ausencia de xanthina em um exemplar da referida "Boicorá" (*Pseudoboa trigemina*), recebido vivo da localidade Monte Azul, S. Paulo.

A actual Nota diz respeito a dois novos casos de anomalia chromatica, o 1.º dos quaes, porventura mais raro, consiste na predominancia da xanthina que substitue a melanina por todo o corpo do exemplar correspondente.

Este caso era o seguinte:

1. Exemplar ♂ de *Sibynomorphus turgidus* (Cope), No. 8648, na collecção do Instituto Butantan, recebido vivo de Bebedouro, S. Paulo e portador dos seguintes principaes caracteres de pholidose: supralabiaes 8/8; dorsaes 15; ventraes 162; anal 1; subcaudaes 58 pares; exemplar jovem, com o comprimento total de 306 mm. — 62 mm. de cauda.

No seu colorido falta completamente qualquer indicio de melanina, de sorte que as manchas cephalicas, dorsaes e ventraes, normalmente pardo-escuras, appareciam nelle substituidas por zonas incolores, separadas por faixas transversaes ou semi-aneis brancos; o olho era, igualmente, incolor.

Outro ponto curioso deste raro caso (Fig. 1 da estampa) de anomalia chromatica reside no facto de o exemplar incriminado ter sido capturado no mesmo local e data que um outro quasi do seu tamanho, e, portanto, apparentemente seu irmão, mas de chromatismo normal, o qual corresponde á Fig. 2 da estampa.

Este exemplar é uma ♀, No. 8649, na collecção do Instituto Butantan, possuidora da seguinte pholidose: supralabiaes 7/7; dorsaes 15; ventraes 166; anal 1; subcaudaes 49 pares; exemplar jovem, com o comprimento total de 295 mm. — 50 mm. de cauda.

O 2.º caso era representado por um albino, cujos caracteres são os seguintes:

2. Exemplar ♀ de *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius), No. 8638, na collecção do Instituto Butantan, recebido vivo de Marilia, S. Paulo e portador dos seguintes principaes caracteres de pholidose: supralabiaes 14/14; dorsaes 27; ventraes 179; anal 1; subcaudaes 21; exemplar tambem jovem, com o comprimento total de 498 mm. — 38 mm. de cauda.

A' semelhança do que occorreu no caso acima descripto, o colorido do presente exemplar caracteriza-se pela falta completa de qualquer signal de melanina, cujas zonas de concentração macular, occorrentes na cabeça e, sobretudo, no dorso dos individuos normaes, são occupadas apenas pela xanthina, margeada internamente de erythrina, o que empresta ao dorso do individuo, quando vivo, um aspecto roseo-sulfuraceo, de grande effeito á luz directa, dado o contraste das tarjas brancas dos losangos ou rhombos ali existentes; olho apigmentado.

Como si fora propositado para augmentar o excepcional interesse desta observação de um facto já de si extremamente raro, ou para provar o valor do elemento coincidencia nos calculos estatisticos, esse exemplar de anomalia chromatica (Fig. 3 da estampa) foi, como o anterior, capturado no mesmo local e data que um outro quasi do seu tamanho, e, portanto, apparentemente seu irmão, mas de chromatismo normal, o qual se acha representado na Fig. 4 da estampa. Este exemplar é um ♂, No. 8639, na collecção do Instituto Butantan, possuidor da seguinte pholidose: supralabiaes 13/14; dorsaes 29; ventraes 169; anal 1; subcaudaes 30; exemplar jovem, com o comprimento total de 558 mm. — 55 mm. de cauda.

Esta curiosa anomalia parece provar que, nos exemplares de colorido typico, as manchas escuras, cephalicas, dorsaes ou ventraes, são de facto resultantes da invasão da melanina e de sua concentração nos primitivos depositos de xanthina no derma dos exemplares.

ABSTRACT

Two cases of pure xanthism in snakes are described, showing complete absence of melanin. These specimens, belonging both to the collection of Institute Butantan, are respectively: a young ♂ of the Dipsadin *Sibynomorphus turgidus* (Cope), and a young ♀ of the Crotalid *Crotalus terrificus terrificus* (Laurentius).

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Albinismo em cobra coral *in* Rev. Mus. Paulista XV:1-9. 2 tabs. 1927.
2. *Amaral, A. do* — Da occorrencia de albinismo em Cascavel, *Crotalus terrificus* (Laur.) *in loc. cit.*:53-57. 4 figs. 1927.
3. *Amaral, A. do* — Albinismo em Dorme-dorme (*Sibynomorphus turgidus*) *in loc. cit.* :59-62. 2 figs. 1927.
4. *Amaral, A. do* — Nota sobre o chromatismo de ophidios — I. Primeiro caso de erythrismo em serpente, observado no Brasil *in* Mem. Inst. Butantan VII:75-79. 1 tab. 1932.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, apresentado em agosto de 1934. Dado á publicidade em dezembro de 1934).

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII. 1933-1934.



1



2

3



4

ESTUDOS SOBRE OPHIDIOS NEOTROPICOS

POR

AFRANIO DO AMARAL

598.12:591.986

ESTUDOS SOBRE OPHIDIOS NEOTROPICOS

XXX. Novo genero e especie de Colubrideo na fauna da Colombia

POR

AFRANIO DO AMARAL

Na Nota anterior (1) relatei observações systematicas por mim feitas em duas collecções de ophidios colhidos na Colombia, inclusive 3 especies novas, alem de 1 genero e 6 especies até então desconhecidos para aquelle país.

Nessa Nota eu previa que, apesar de já ter elevado, o numero de especies até então ali registadas viria a augmentar consideravelmente com o estudo de material mais abundante e de collecções mais intensivas. Esta previsão acaba de confirmar-se ao simples exame de um pequeno lote de serpentes conservadas, que me foi remettido para estudo por meu prezado correspondente, Rev.º Irmão Daniel, do Collegio Departamental de San José, de Jericó.

Esse lote, representado por 7 exemplares de especies differentes de colubrideos, comprehende um que corresponde a genero e especie provavelmente novos para a sciencia e que, por isso, vão aqui descriptos:

Mastigodryas, g. n.

Descripção — Physionomia de *Eudryas* FITZINGER e *Masticophis* BAIRD & GIRARD. Corpo quasi attenuado; cauda antes longa; cabeça algo alongada e elevada; escamas dorsaes, lisas, sem fossetas apicilares, em 17 filas, reduzidas a 15 pela perda de 2 filas lateraes; anal dividida; subcaudaes em 2 filas. Escutellação cephalica e tamanho do olho semelhantes aos de *Eudryas*. Dentes maxillares 19, subeguaes, typo nitidamente syncranteriano; dentes mandibulares 21, ligeiramente mais longos adiante, de typo escaphiodonte.

Este genero é affim de *Eudryas* FITZINGER e *Masticophis* BAIRD & GIRARD. Distingue-se de *Masticophis,* que foi revisto por Ortenburger (*in* Occ. P. Mus. Zool. Univ. Michigan No. 139, 1923): pelo typo nitidamente syncranteriano dos dentes maxillares; pela relativa curteza da cauda; pela ausencia de fossetas api-

cilares nas escamas dorsaes. Separa-se, igualmente, de *Eudryas,* que foi, ha pouco, objecto de discussão por parte de Stuart (*in* Occ. P. Mus. Zool. Univ. Michigan. No. 236, 1932), pela maneira de reducção do numero de escamas dorsaes e que consiste na queda da 4.ª fila lateral; pela ausencia de fossetas apicilares nas mesmas. Em trabalho recente (*in* Occ. P. Mus. Zool. Univ. Michigan. No. 284, 1934), Stuart considerou typica de *Masticophis* a queda dessa 4.ª fila na reducção de 17 para 15 filas dorsaes em serpentes desse grupo; todavia, preferiu motivos de ordem geographica e caracteres penianos para ligar a sua nova especie *ortenburgeri* ao genero *Coluber,* acreditando (talvez um tanto apressadamente, em virtude da inexistencia de observações sobre exemplares vivos desse grupo e da insufficiencia de material conservado nos museus) que ella pudesse representar a forma primitiva de emergencia dos alludidos generos *Masticophis* e *Coluber.*

Mastigodryas danieli, sp. n.

Olho grande, cerca de metade do comprimento do focinho. Rostral bem mais larga do que alta, apenas visivel de cima; internasaes quasi tão longas quanto as prefrontaes; frontal cerca de 1 vez e meia tão longa quanto larga; parietaes alongadas, algo mais longas do que sua distancia das internasaes; nasal subdividida; frenal 1 vez e meia tão longa quanto alta; 1 preocular, extendida á superficie exterior da cabeça, mas não contigua á frontal; 2 postoculares; 2 + 2 temporaes; 9 supralabiaes (4.ª, 5.ª e 6.ª contiguas á orbita); 5/6 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores, que são 1/3 mais curtas do que as posteriores, sendo estas divergentes e separadas por escamas para trás. Escamas dorsaes 17, sem fossetas apicilares. Ventraes 187. Anal dividida. Subcaudaes 70 pares. Coloração pardo-azulada, mais ou menos uniforme por todo o corpo, apenas mais clara ou acinzentada na face ventral.

Dimensões: comprimento total 895 mm.; cauda 190 mm..

Holotypo: No. 8694, ♀, na collecção do Instituto Butantan, colhido em Medellin, Colombia, e recebido do Rev.º Irmão Daniel, a quem a especie é dedicada.

Os demais 6 exemplares de colubrideos desse lote e enviados da Colombia pelo Rev.º Irmão Daniel, correspondem ás seguintes especies:

a) Colubrinae

Xenodon severus (Linneu): ♂, No. 8688 coll. Inst. Butantan, procedente de Medellin e com 8/9 supralabiaes, 21 dorsaes, 142 ventraes, 2 anaes e 40 p. subcaudaes.

b) Boiginae

1. *Leptodeira annulata annulata* (Linneu): ♀. No. 8690 coll. Inst. Butantan, procedente de Medellin e com 8/8 supralabiaes, 21 dorsaes, 186 ventraes, 2 anaes e 91 p. subcaudaes.

2. *Pseudoboa petola* (Linneu): ♂. No. 8691 coll. Inst. Butantan, procedente de Robledo e com 8/9 supralabiaes, 19 dorsaes, 198 ventraes, 1 anal e 100 p. subcaudaes.

3. *Pseudoboa cloelia* (Daudin): ♂, No. 8692 coll. Inst. Butantan, procedente de La Seja e com 7/7 supralabiaes, 17 dorsaes, 205 ventraes, 1 anal e 74 p. subcaudaes.

4. *Barbourina equatoriana* Amaral: ♂, No. 8688 coll. Inst. Butantan, procedente de Pensilvania e com 7/7 supralabiaes, 19 dorsaes, 212 ventraes, 1 anal e 92 p. subcaudaes.

Este exemplar, jovem como o typo por mim assignalado na collecção do Museu Nacional dos Estados Unidos (2) e de colorido igualmente roseo, delle se distingue pela presença de 1 pequena frenal de cada lado e de maior numero de subcaudaes. A um exame meticuloso deste exemplar e do typo se tem a impressão de se tratar de jovens de *Pseudoboa cloelia* (Daudin), embora desta especie os afaste a presença de menor numero de dentes maxillares e de escamas alargadas na fila vertebral. Todavia, cumpre ter em vista essa possivel identidade, examinando-se, para resolvel-a, series de exemplares de *P. cloelia,* de varias idades e procedentes do Equador e da Colombia, onde não é improvavel que occorra uma raça particular desta especie.

5. *Stenorhina degenhardtii* (Berthold): ♂, No. 8693 coll. Inst. Butantan, procedente de Medellin e com 7/7 supralabiaes; 17 dorsaes, 148 ventraes, 2 anaes e 42 p. subcaudaes.

ABSTRACT

Mastigodryas unicolor is described as representing a new genus and species to be included in the Colombian fauna. *Barbourina equatoriana* is also reported from Colombia in a lot of other common species of snakes.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Estudos sobre ophidios neotropicos. XXIX. Novas notas sobre especies da Colombia *in* Mem. Inst. Butantan VII:103-124. 1932.
2. *Amaral, A. do* — New genus and species of South American snakes contained in the U. S. Nat. Museum *in* J. Washington Acad. Sciences XIV(9):201-202.1924.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medicado Instituto Butantan, apresentado em agosto de 1934. Dado á publicidade em dezembro de 1934).

598.12:591.9

ESTUDOS SOBRE OPHIDIOS NEOTROPICOS

XXXI. Sobre a especie *Bothrops alternata* D. & B., 1854 (Crotalidae). Variações. Redescripção.

POR

AFRANIO DO AMARAL

A serpente crotalidica que entre nós é conhecida pelos nomes de "Urutú", "Cruzeiro" ou "Cruzeira" e, mais para o sul, pelos de "Cotiara" ou "Coatiara", denominando-se tambem "Jararaca rabo-de-porco" em certos pontos do Rio Grande do Sul ou "Jararaca de agosto" perto da Lagoa dos Patos, "Vibora de la cruz" no Uruguay e na Argentina e "Mboi-cuatiá" entre os indigenas no Paraguay, foi pela primeira vez descripta sob o nome de *Bothrops alternatus* e figurada por Duméril e Bibron (1).

Sob esse mesmo nome scientifico foi ella posteriormente assignalada por Guichénaud (2), Jan (3) e Boulenger (4). Jan, que em seu trabalho a figurou com notavel exactidão, já a havia registado anteriormente (5) sob o nome de *Trigonocephalus alternatus.*

Em sua revisão geral dos ophidios do Museu Britannico, Boulenger (6) apresentou uma definição mais completa da especie. Nessa definição Boulenger já havia transferido a especie para o genero *Lachesis,* no que foi mais tarde seguido por Ihering (7), Brazil (8), Houssay (9), Serié (10) e outros auctores mais recentes.

Uma analyse comparativa desses diversos trabalhos revela: 1.º que os caracteres morphologicos nelles attribuidos á especie approximam-se entre si; 2.º que as gravuras publicadas por Duméril e Bibron, Jan, Brazil e Houssay representam o que se poderia considerar como colorido typico, porque este corresponde, não só ao registado e figurado na descripção original, sinão tambem ao encontrado na maior parte dos exemplares recebidos vivos ou dos conservados nos museus.

Todavia, eu já demonstrei (11,12) a occorrencia de alguns casos de colorido atypico nessa especie, entre os quaes inclui os dois que serviram a Magalhães (13) de base á descripção da forma que, tendo considerado nova, chamou de *Lachesis inaequalis*.

I. Invalidez de *Lachesis inaequalis*

Das variações chromaticas offerecidas por *Bothrops alternata* uma das mais interessantes é justamente aquella apresentada pelos 2 exemplares que forneceram elementos á descripção de *Lachesis inaequalis*, de cuja invalidez eu tratei nos referidos trabalhos (11, 12.) Magalhães, tendo provavelmente em vista o curioso chromatismo desses 2 exemplares, repetiu, mais tarde, a descripção de *Lachesis inaequalis* em publicação em separado (14), chamando-a novamente de "*especie nova*" ["Lachesis inaequalis", n. s.]. Tres annos mais tarde, ainda lhe repetiu a descripção (15), continuando a chamal-a de "especie nova" ["Lachesis inaequalis", n. sp. + "Lachesis inaequalis" sp. nov.].

Em vista da invalidação, por mim suggerida, dessa sua especie, Octavio Magalhães encarregou E. da Fonseca Barros de um estudo comparativo entre *inaequalis* e *alternata*. Nesse seu trabalho (16), que concluiu pela separação de *inaequalis* e *alternata*, Barros procurou demonstrar que a mim escasseava razão para as considerar synonymas.

Porisso, sou levado a analysar-lhe as premissas, antes de tentar invalidar-lhe, definitivamente, a alludida conclusão.

A. Inicialmente direi que, em sua publicação original, Magalhães infringira certos preceitos da Systematica e das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica, a saber:

1.º Com effeito, este auctor patricio chamou a Urutú de *Lachesis alternatus*.

Mesmo que a Urutú fosse uma *Lachesis*, seu nome especifico seria *alternata*, porque a palavra *Lachesis* é feminina. Portanto, o certo seria *Lachesis alternata*, de accordo com o art. 14 das Regras Internacionaes.

2.º Igualmente, ao publicar a descripção de *Lachesis inaequalis*, chamou-a repetidamente de especie nova ("n. s.", "n. sp.", e "sp. nov."), respectivamente, em 1920, 1922 e 1925.

Nestas condições, si algum zoologo, conhecedor portanto das regras de nomenclatura, desejasse, certo dia, citar por extenso essa especie de accordo com o art. 22, ficaria em duvida sobre si deveria escrever *Lachesis inaequalis* Magalhães, 1920, *Lachesis inaequalis* Magalhães, 1922, ou *Lachesis inaequalis* Magalhães, 1925. Essa citação dependerá de qualquer dos 3 trabalhos que, por accaso, lhe cahir sob as vistas, conforme vão citados na "Bibliographia" deste artigo.

3.º Ao demais, deixou de designar o typo de *L. inaequalis.*

Manda a praxe internacional que cada auctor, ao descrever uma forma nova qualquer, a faça acompanhar de uma indicação que facilite o exame do typo. Para tal fim, este deve vir acompanhado de um numero fixo, correspondente a uma determinada collecção ou museu.

4.º Em qualquer das tres descripções originaes de *Lachesis inaequalis,* depois de haver dito, na introducção, que "foram enviados daquella villa para o Instituto de Hygiene especimes de uma cobra venenosa cuja classificação foi impossivel", Magalhães se referiu, explicitamente, a um exemplar (♀) como si fôra o typo. Todavia, logo depois, affirmou que elle possuia "ventraes em numero de 168 a 171".

Sendo impossivel a um determinado exemplar possuir mais de um numero de ventraes, fica-se na duvida sobre si essa femea era o "typo", ou si a descripção do "typo" foi baseada em mais de um exemplar ou "cotypos". A resolução desta duvida é impossivel á luz dos 3 referidos trabalhos.

B. De seu lado, Barros, logo no inicio da revisão de *inaequalis,* mostrou serem em numero de 2 os especimes dessa serpente, estudados por O. Magalhães.

1. Em nota ao pé da pagina, accrescentou Barros que o genero *Lachesis* é "considerado por alguns zoologistas como tendo caído em synonimia a favor do genero Bothrops".

Confesso desconhecer quaes são esses zoologos que consideram ter o nome *Bothrops* substituido *Lachesis* em systematica ophiologica. Em trabalho publicado em 1926 (17) e baseado, em parte, nos estudos de Mocquard (18), *subdividi* o primitivo genero *Lachesis, sensu* Boulenger, nos generos *Lachesis, Trimeresurus* e *Bothrops;* neste particular, sinto-me feliz em estar na companhia de Stejneger, Barbour, Schmidt, Ruthven, Noble, Mertens, Müller, Parker e outros herpetologos de igual auctoridade mundial. Ao que me conste, nenhum de nós até hoje se lembrou de synonymizar *Lachesis* com *Bothrops.* Temos dito, por exemplo, e eu aqui repito, que especies como *alternata, atrox, neuwiedii, cotiara* e outras affins não se devem collocar no mesmo genero que *muta.* Com effeito, a especie *muta* deve ficar áparte, no genero *Lachesis* Daudin, 1803 (genero monotypico), enquanto as demais se devem congregar no genero *Bothrops* Wagler, 1824 (typo-*atrox*). O genero *Lachesis* separa-se de *Bothrops* pelos seguintes caracteres fundamentaes:

a) Dentes pterygoideos nunca existentes além da articulação transverso-pterygoidea;

b) Escamas granulosas sobre a cabeça e tuberculares sobre o dorso;

c) Escudos ausentes perto da extremidade da cauda, onde são substituidos por 5 filas de escamas, cujas 3 medianas são estreitas, longas e espinhosas.

[Nesta altura devo confessar que não sei bem como seguir a ordem chronologica das minhas citações, em virtude de, entre as provaveis datas de publicação do trabalho de Barros (1930 e 1931) e a de sua distribuição (fim de 1933), haver medeado a "Semana de Laboratorio", realizada em janeiro de 1932 sob os auspicios da Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo e de ter eu, em uma de suas reuniões, tido ensejo de communicar uma nota sobre variações de colorido em serpentes. Nessa occasião, coube-me a grata tarefa de mostrar aos collegas presentes, inclusive a Octavio Magalhães, auctor de *Lachesis inaequalis,* dois exemplares de *Bothrops alternata* portadores de variações chromaticas semelhantes ás descriptas naquella sua especie. A anomalia chromatica desses dois exemplares, por mim referidos em trabalhos anteriores (11, 12), tem-se apresentado em outros exemplares, posteriormente recebidos pelo Instituto Butantan, os quaes se acham, como aquelles, á disposição dos interessados, para exame e verificação].

2. Em seguida, Barros estranhou que, para passar *inaequalis* para a synonyma de *alternata,* eu me houvesse limitado a comparar os caracteres da primeira com os da segunda, em relação ao tamanho e forma, pholidose e marcas da cabeça e do corpo. Apenas isto. Nada mais.

Devo dizer, de um lado, que, quando preparei os originaes do meu citado trabalho (11), tinha apenas em mão um exemplar (Instituto Butantan, No. 3009, colhido em Bagé, Rio Grande do Sul) de *alternata* portador de alongamento e fusão dos ocellos lateraes. Cumpre-me accentuar, de outro lado, que, naquella occasião, Magalhães só havia publicado (?) *a primeira e a segunda descripções, aliás excellentes, de sua especie nova,* nenhuma das quaes fizera acompanhar de gravuras. Porisso, naquella occasião preferi, por prudencia, considerar *inaequalis* como "a local color race of *B. alternata*". Actualmente, depois de ter examinado as gravuras annexas á *terceira descripção da especie nova* de Magalhães e reproduzidas em sua quasi totalidade na revisão de Barros, eu não consideraria *inaequalis* como representante de "uma raça chromatica local", sinão apenas como mera "variação individual de colorido" de *B. alternata.*

3. Para demonstrar a "relativa raridade da especie" criticada, Barros allegou que ella "parece, até, confinar-se ao Rio Grande" e que "em Bello Horizonte, na secção antiophidica do Instituto Ezequiel Dias, em 13 annos (1918-1931) de trabalhos dessa secção, jamais se recebeu exemplar algum similhante".

Conforme veremos adiante, houve, no caso, confusão entre raridade de uma anomalia superficial e raridade de especie.

4. A proposito, Barros, para justificar tal "raridade da especie", apresentou um quadro dos exemplares de Urutú recebidos pela secção antiophidica daquelle Instituto desde 1919 até maio de 1931, os quaes eram em numero de 1366.

Tratando-se indiscutivelmente de uma anomalia chromatica, não é de admirar que, em tal numero, não tivessem surgido exemplares outros semelhantes a *inaequalis*. Simples questão de coincidencia, ou então motivo de ordem estatistica.

No Instituto Butantan, entre 1919 e maio de 1931, entraram 4.749 exemplares de Urutú e apenas 2 (Nos. 3009 e 6196, ambos procedentes de Bagé, Rio Grande do Sul) apresentavam o listado dorsal de *inaequalis*, o que dá a media de 1 anomalo para cerca de 2.374 exemplares. Já entre 1.º de junho de 1931 e 31 de dezembro de 1932 não entrou um só exemplar de *alternata* com essa anomalia, num total de 1.576 individuos recebidos. Pelo contrario, entre 1.º de janeiro e 31 de dezembro de 1933, entraram em Butantan nada menos de 3 exemplares (No. 7865, procedente de S. Paulo e Nos. 7866 e 8083, ambos procedentes do Paraná) com essa mesma anomalia, num total de apenas 838 especimes de Urutú, sendo que esses 3 exemplares entraram todos no periodo decorrido de 21 de abril a 20 de outubro daquelle anno (6 meses). Finalmente, desde 1906 até 30 de junho de 1934, o Instituto Butantan recebeu 10.864 exemplares de *B. alternata* e, ao que me conste, entre elles só appareceram os alludidos 5 exemplares de marcas lineares (1 de S. Paulo, 2 do Paraná e 2 do Rio Grande do Sul), o que dá a media de 1 para 2.173.

5. Analysemos agora, na integra, o quadro comparativo, apresentado por Barros, sobre os "caracteres differenciaes" de *inaequalis* e de *alternata*:

	inaequalis	*alternata*
a)	"Sub-caudaes duplas. A segunda supra-labial não forma a borda anterior da fossa lacrimal."	"Sub-caudaes duplas. A segunda supra-labial não forma a borda anterior da fossa lacrimal."

Commentario: Não ha, portanto, differença.

	inaequalis	*alternata*
b)	"Comprimento maximo: 740 millimetros; Cauda: 9 centimetros; Comprimento minimo: 640 millimetros; Talhe maximo: 7 centimetros; Talhe minimo: 4,5 centimetros."	"Comprimento maximo: 1160 millimetros; Cauda 9 centimetros. Talhe maximo: 15 centimetros."

Commentario: Este dado não tem valor como está apresentado, pois em relação a *inaequalis* as medidas foram baseadas apenas em 2 exemplares... Quem tem experiencia de repteis sabe quanto variam as mensurações de accordo com o sexo e o numero dos exemplares constitutivos das series examinadas.

Quanto ao comprimento de *alternata,* Boulenger (6) lhe assignala 1.190-mm.; Gliesch (19), 1.690 mm.; o Instituto Butantan, não podendo conservar todos os numerosos exemplares grandes que chegam, guardou apenas 1 (No. 3184), com 1.450 mm..

	inaequalis	*alternata*
c)	"Corpo achatado e delgado, Cabeça achatada e afilada, coberta de escamas fortemente imbrincadas e carenadas."	"Corpo cylindrico e grosso, cabeça achatada e afilada, coberta de escamas fortemente imbricadas e carenadas."

COMMENTARIO: As gravuras de *inaequalis* publicadas por Magalhães e por Barros, representam exemplar mal conservado, cuja forma do corpo, por isso mesmo, seria difficil de averiguar. Aliás o corpo de *alternata* nunca foi cylindrico e sim achatado (sub-triangular); quanto á grossura, depende ella do estado de saude, idade, sexo e possivel prenhez do exemplar examinado. Os caracteres da cabeça revelam-se iguaes, ao confronto do proprio quadro citado. Por signal que a Estampa 10, publicada por Magalhães (15) e a Fig. 1, apresentada por Barros (16), mostram uma *inaequalis* relativamente mais grossa do que a *alternata* ao seu lado...

	inaequalis	*alternata*
d)	"Focinho arredondado. Rostral rectangular ou triangular. Canthal saliente, mais longa que chata, escavada no sentido longitudinal. Internasaes em contacto, escavadas longitudinalmente."	"Focinho obtusamente afilado. Rostral rectangular, uma vez e um terço mais alta do que larga. Canthal saliente, em angulo diedro de aresta convexa, com o plano interno fortemente escavado no sentido longitudinal. Internasaes em contacto, escavadas longitudinalmente."

COMMENTARIO: A pequena differença, porventura existente neste ponto, está ligada seguramente á má preservação de *inaequalis,* conforme se pode verificar por qualquer das photographias e pelo desenho da cabeça, publicados por Magalhães e por Barros. Essas estampas reproduzem uma cabeça nitidamente deshydratada, o que, só por si, bastaria para exigir prudencia da parte de qualquer especialista, ao basear em tal exemplar a descripção de uma especie nova

	inaequalis	*alternata*
e)	"Supra-oculares mais compridas do que largas, escavadas no sentido longitudinal e inclinadas para fóra. O comprimento das supra-oculares é cerca do dobro da largura. 11 (onze) series de escamas pequenas, carenadas, entre as supra-oculares."	"Supra-oculares muito mais compridas do que largas, excavadas no sestido longitudinal. O comprimento das supra-oculares é cerca do dobro da largura. 10 a 13 (dez a treze) series longitudinaes de escamas pequenas, imbricadas, fortemente carenadas entre as supra-oculares."

Commentario: Não ha, pois, differença neste particular. A insignificante inclinação, porventura notada nas supraoculares de *inaequalis*, poderia provir da deshydratação do typo; a comparação no numero de escamas inter-supraoculares é improcedente, porque, do lado de *inaequalis*, esse numero só poderia ter sido fornecido por 2 exemplares, ao passo que, do lado de *alternata* foi elle copiado, embora Barros não o declare, da descripção offerecida por Boulenger, que, por sua vez, é baseada, não somente no exame de 9 exemplares existentes na collecção do Museu Britannico, mas ainda nas informações tiradas dos diversos trabalhos incuidos na bibliographia relativa á especie e anteriores a 1896.

	inaequalis	*alternata*
f)	"Nasal dividida, 2 (duas) oculares anteriores, sendo a superior mais larga e achatada, ás vezes escavada, tomentosa, attingindo o cantho. 2 (duas) oculares posteriores, sendo a superior maior."	"Nasal dividida. 2 (duas) oculares anteriores, sendo a superior mais larga e achatada, ás vezes escavada, tomentosa, attingindo o cantho. 2 ou 3 (duas ou trez) oculares posteriores."

Commentario: Ha, portanto, perfeita coincidencia entre a nasal e as preoculares nas duas especies. A oscillação das postoculares está, mais uma vez, ligada tão somente a uma questão biometrica: serie menor em *inaequalis*, serie maior em *alternata*.

	inaequalis	*alternata*
g)	"3 ou (*) (trez ou quatro) infraoculares, separadas das supralabiaes por uma ou duas series de pequenas escamas lisas. Temporaes carenadas."	"1 (uma) ou duas (duas) infraoculares, separadas das supralabiaes por duas series de escamas lisas. Temporaes carenadas."

(*) Na impressão do trabalho de Barros, foi omittido o algarismo 4.

COMMENTARIO: Ha novamente completa coincidencia nas temporaes. A differença, assignalada no numero de infra-oculares e das series de escamas intermediarias a estas e ás supralabiaes, está ligada igualmente a uma questão biometrica: é que Barros se limitou a copiar Boulenger, ao invés de examinar uma serie mais extensa de exemplares de *alternata*. Si o tivesse feito, haveria verificado que as infra-oculares variam de 1 a 4, tendo sob si uma ou duas series de escamas lisas, sobrepostas ás supralabiaes. Nestas condições, os dados de *inaequalis* continuam a confundir-se com os de *alternata*.

	inaequalis	*alternata*
h)	"9 (nove) supra-labiaes, brancas, baixas, lisas em geral. A terceira e quarta são mais compridas que largas (o dobro), e a terceira mais saliente e de superficie mais irregular. A 6.ª, e mais raramente a 7.ª, a contar do rosto, tem uma mancha linear muito fina, negra, commummente de baixo para cima e de traz para diante. Fossa lacrimal separada das supra-labiaes por uma serie de pequenas escamas lisas."	"8 (oito) a 9 (nove) supra-labiaes, baixas, ora lisas, ora de superficie ligeiramente accidentada; são amarello-esbranquiçadas até a 5.ª, sendo, em geral, a sexta em parte amarello-esbranquiçada e em parte castanha, côr que permanece para as restantes (setima, oitava e nona). A terceira é mais alta que todas as demais e apresenta, frequentemente, pequenas manchas castanho-escuras, de tamanho e disposição variaveis. A terceira e quarta são mais compridas que largas (cerca do dobro), e a terceira é mais saliente, mais alta e de superficie mais irregular. Fossa lacrimal separada das supra-labiaes por uma serie de pequenas escamas lisas."

COMMENTARIO: Morphologicamente, portanto, ha entre as duas apreciavel coincidencia ainda neste ponto. A mancha negra listada sobre a 6.ª ou 7.ª supralabial de *inaequalis* representa apenas a extremidade da lista castanho-negra postloral (extendida até as supralabiaes posteriores), normalmente encontradiça em *alternata*, em cujos exemplares mal conservados pode desfazer-se parcialmente com o tempo, reduzindo-se á citada mancha. Quanto ao mais, si differença existe, é de ordem biometrica, a que o auctor não attendeu; ou então de ordem logica, por não ter elle alinhado com regularidade, conforme convinha, de lado a lado os termos da comparação.

inaequalis	*alternata*
i) "Escamas dorsaes fortemente carenadas, em series de 27 (vinte e sete) longitudinaes.	"Escamas dorsaes fortemente carenadas, em series de 29-35 (vinte e nove a trinta e cinco) longitudinaes.
Sub-caudaes 45 (quarenta e cinco) em series duplas.	Sub-caudaes 34-51 (trinta e quatro a cincoenta e um) em series duplas.
Ventraes em numero de 167-171 (cento e sessenta e sete a cento e setenta e um) inteiras.	Ventraes em numero de 167-181 (cento e sessenta e sete a cento e oitenta e um) inteiras.
Anal inteira."	Anal inteira."

Commentario: Aqui, como ali, os dados numericos sobre a pholidose de *alternata* são copiados de Boulenger.

Conforme veremos no capitulo seguinte, a variação da pholidose de *alternata* é mais ampla do que a registada no Catalogo do Museu Britannico. Apenas direi, por agora, que o numero de 27 escamas dorsaes é excepcional em femeas de *alternata;* o numero de 45 pares de subcaudaes é de 1 mais alto do que o limite maximo por mim encontrado em 1 serie de femeas dessa especie; a variação de 167 a 171 ventraes, embora possa occorrer entre 2 ♀ ♀ de Urutú, é antes commum e até normal a ♂ ♂ desta especie. Nestas condições, eu seria levado ás seguintes supposições a proposito de *inaequalis*:

*) poderia ter havido engano no registo de sexo dos dois exemplares que serviram de base á descripção de Magalhães;

**) caso se verifique, por meio de conveniente dissecção da cauda, serem de facto ♀ ♀ esses 2 exemplares, poderiam ter sido incluidas, pelo auctor, escamas para-anaes na contagem dos escudos sub-caudaes.

Infelizmente não pude verificar estes 2 pontos, por não ter recebido os exemplares de *inaequalis,* que solicitei para exame.

6. De referencia ao colorido de *inaequalis,* não me parece necessario reproduzir a longa descripção de Barros, porque baseada em exemplares indiscutivelmente anomalos neste particular. Basta que se compare essa descripção do colorido, attribuida a *inaequalis,* com qualquer dos 5 exemplares de *alternata* tambem anomalos ora conservados na collecção do Instituto Butantan, Nos. 3009, 6195, 7865, 7866 e 8083, para verificar-se a quasi perfeita coincidencia desses dados chromaticos. Devo repetir que estes exemplares se acham á disposição dos interessados para qualquer exame critico.

Aliás, bastaria a simples inclusão da descripção completa do colorido do abdome de *inaequalis,* que não se distingue do de *alternata,* a julgar até pela Fig. 1 da Estampa IX do trabalho de Magalhães; bastaria tambem a existencia da "mancha em forma de fita, com cerca de 2 millimetros de largura, e que se estende pela linha mediana, desde as placas gorjaes até o meio do terço anterior

do corpo da cobra onde se confunde com a estampa do resto do abdomen", conforme palavras textuaes de Barros na descripção do colorido de *inaequalis*, mancha essa typica da especie *alternata;* bastaria, finalmente, a presença, em *inaequalis*, daquellas "faixas escuras que podemos encontrar, de cada lado do sulco mental, desde as infralabiaes até mais ou menos ás gorjaes" e ás quaes Barros só se referiu "accessoriamente", apesar de serem ellas caracteristicas de *alternata*, pois nenhuma outra crotalidea, existente entre nós, as possue; bastaria a presença simultanea desses tres elementos chromaticos na face ventral da serpente para qualquer ophiologo experiente estabelecer a diagnose de *alternata*, caso se tivessem perdido os innumeros caracteres morphologicos acima assignalados e que são igualmente sufficientes á synonymização das 2 especies.

Conclusão — Os 2 exemplares em que se baseou a descripção de *Lachesis inaequalis* Magalhães não se podem distinguir de *Bothrops alternata* Dm. & Bibr..

II. **Variações em** *B. alternata*

a. *Variações chromaticas*

Quando se examina uma serie extensa de exemplares de *Bothrops alternata*, fica-se surpreso ante as innumeras variações que seu colorido apresenta, seja na cabeça, seja no dorso.

1. *Colorido cephalico* — Houssay (9) já teve occasião de figurar 4 dessas variações em exemplares occorrentes na Argentina. Estas variações, todavia, não são proprias áquelle país e, portanto, não teriam valor subespecifico; occorrem em especimes de qualquer procedencia e representam mera anomalia ou variação individual.

Conforme se vê da inclusa Estampa I (Figs. 1 a 10), essas variações apparecem indifferentemente em qualquer das marcas claras, tarjadas de negro, cephalo-nuchaes da Urutú. Consistem, ora na reducção, bipartição ou apagamento de qualquer das marcas transversaes, ora na fusão ou separação, alongamento ou encurtamento ou mesmo no desapparecimento quasi completo das marcas longitudinaes. Como não obedecem a um typo determinado, nem guardam entre si nenhuma relação fixa, não se enquadram em qualquer descripção definitiva.

2. *Colorido dorsal* — (Estampa II) O colorido dorsal de *Bothrops alternata* caracteriza-se facilmente, nos exemplares normaes, pela disposição e forma dos 3 grupos de manchas ou marcas que o compõem: grupo para-vertebral; grupo lateral; grupo para-ventral. Em certos exemplares, todavia, podem-se notar variações mais ou menos profundas em qualquer desses grupos de per si, ou em todos em conjuncto.

O grupo para-vertebral normalmente se compõe de 2 pequenas manchas arredondadas, castanho-escuras, tarjadas de negro, dispostas em par ao longo

da linha medio-dorsal, e cada elemento juxtaposto ao lado dessa linha. Como variação, essas manchas se podem apresentar alongadas no sentido longitudinal ou no sentido transversal, ou, então, fundidas em maculas castanho-anegradas sobre a região vertebral ou mesmo inteiramente apagadas.

O grupo para-ventral que representa a projecção lateral das manchas encontradas ao longo do ventre, é normalmente formado por concentrações de pigmento melanico a envolverem pequenas zonas pardas sobre as 2 primeiras series de escamas dorsaes, coincidindo, ora com cada extremidade, ora com o intervallo dos ocellos lateraes. Como variação, essas manchas podem-se alongar ou encurtar ao sentido vertical, ou então extender-se indelevelmente no sentido longitudinal, de sorte a simularem, no ultimo caso, uma estria intercisa sobre a 1.ª fila de escamas dorsaes.

As manchas lateraes propriamente ditas formam normalmente uma serie de ocellos reniformes mais ou menos regulares ao longo de cada flanco. Como anomalia, esses ocellos podem-se agrupar nos seguintes typos, além daquelle já por mim assignalado anteriormente (11:tab.XII-fig.73);

a) ocellos reduzidos, seja na altura, seja no comprimento e, portanto, bem distinctos e separados entre si (Est. II — No. 7737 — coll. Inst. Butantan);

b) ocellos com a orla para-vertebral achatada ou rectilinea, de sorte a ficarem separados dos do lado opposto por uma especie de estria clara medio-dorsal (Est. II — No. 8000 — coll. Inst. Butantan);

c) ocellos alongados verticalmente e fundidos com os oppostos através da linha mediana (Est. II — No. 8381 — coll. Inst. Butantan);

d) ocellos bem delimitados, completamente circulares por força da fusão de suas extremidades; desse modo, o colorido do fundo do dorso fica concentrado em u'a mancha clara, tarjada de negro, a representar o centro do ocello (Est. II — No. 7672 — coll. Inst. Butantan);

e) ocellos cujas extremidades estão, pelo contrario, destacadas do corpo; apparecem como 3 manchas, 1 superior, semi-lunar, e 2 inferiores, sub-arredondadas, a envolverem uma pequena mancha supplementar, tambem parda, tarjada de negro (Est. II — No. 8425 — coll. Inst. Butantan);

f) ocellos virtualmente completos ou quasi circulares, com o centro relativamente muito claro; a este typo corresponde o maior apagamento das manchas para-vertebraes e para-ventraes acima assignaladas (Est. II — No. 7673 — coll. Inst. Butantan);

g) finalmente, ocellos fundidos entre si ao longo de cada flanco e a simularem estrias, ora mais ou menos completas sob a forma de extensas linhas, ora relativameste incompletas, sinuosas ou onduladas pela persistencia das extremidades livres de seus elementos componentes (Est. II — No. 8083 — coll. Inst. Butantan). A este ultimo typo correspondem, além dos 2 exemplares de *inaequalis*, os referidos especimes Nos. 3009, 6195, 7865, 7866 e 8083 da collecção do Instituto Butantan.

b. *Variações morphologicas*

Depois de ter assignalado as mutações chromaticas por mim até agora observadas em *Bothrops alternata,* devo examinar, á luz da biometria, as variações morphologicas que nella tenho encontrado, afim de lhes verificar o valor em relação ao sexo e ao individuo.

Posso desde logo accentuar que essas variações se mostram mais extensas quanto ao numero de escamas dorsaes, e de escudos ventraes e subcaudaes e menos nitidas quanto as demais placas e escamas. Apenas entre as ultimas direi que, na serie de exemplares por mim examinada e maior do que a utilizada por Boulenger, as supralabiaes variavam de 8 a 9 (excepcionalmente 10); as escamas inter-supraoculares oscillavam entre 9 (excepcionalmente 8) e 13 series; as infra-oculares, entre 1 e 4, apresentando-se separadas das supralabiaes por 1 ou 2 series de escamas.

De referencia ás escamas dorsaes e aos escudos ventraes e subcaudaes, sua discriminação por sexo e por exemplares encontra-se no annexo Quadro I, com a correspondente distribuição geographica, de accordo com os exemplares actualmente conservados no Instituto Butantan.

A observação attenta desse Quadro I, particularizada aos individuos de cada sexo dentro da mesma distribuição geographica, dá margem ás seguintes indicações:

1a. as variações da pholidose são mais accentuadas entre os individuos de sexo opposto na mesma localidade do que entre os do mesmo sexo em localidades diversas;

2a. não existe, por conseguinte, relação, pelo menos apparente, entre a distribuição geographica e as variações da pholidose nos exemplares, do mesmo sexo, de *Bothrops alternata.*

Por esse motivo, resolvi completar a lista de exemplares de procedencia conhecida, constante do Quadro I, com alguns outros, retirados do cobril do Instituto Butantan e, portanto, já sem procedencia. Estes acham-se arrolados no seguinte Quadro II.

O exame conjuncto desse Quadro II com o Quadro I fornece mais estas indicações:

1a. as escamas dorsaes variam de 27 a 31 (excepcionalmente 32 ou 33) nos ♂♂ e de 29 a 33 (excepcionalmente 27 a 35) nas ♀♀;

2a. os escudos ventraes variam de 165 a 177 (excepcionalmente 161 a 183) nos ♂♂ e de 170 a 183 (excepcionalmente 164 a 185) nas ♀♀;

3a. os pares de escudos subcaudaes variam de 40 a 49 (excepcionalmente 38 a 50) nos ♂♂ e de 33 a 40 (excepcionalmente 31 a 44) nas ♀♀.

Analysando-se agora biometricamente, em conjuncto, os exemplares de cada sexo (Quadro III e Graphicos), chega-se ás seguintes conclusões:

QUADRO I

EXEMPLARES DE *B. ALTERNATA* NA COLLECÇÃO DO INSTITUTO BUTANTAN

(com procedencia conhecida)

Procedencia	No.	Sexo	E. dorsaes	Ventraes	Subcaudaes
Est. do Rio de Janeiro (Carmo da Cachoeira)	8016	♀	33	178	35
Est. de Minas Geraes (Alfenas)	8385	♂	30	175	45
» (Lambary)	8542	»	29	179	44
» (Tres Pontas)	8543	»	29	177	46
» (Barbacena)	8544	»	30	181	45
» (Campanha)	8546	»	27	171	46
» (Vicente Carvalhaes)	8547	»	29	165	45
» (Tres Pontas)	8616	»	27	179	42
» (Campanha)	8720	»	29	170	41
» (Pedro Leopoldo)	631	♀	31	174	33
» (Campanha)	7966	»	33	173	39
» (Vicente Carvalhaes)	8078	»	33	177	40
» (Campanha)	8381	»	33	174	33
» »	8382	»	31	175	38
» (Poços de Caldas)	8389	»	33	176	34
» (Nogueira)	8392	»	33	179	35
» (Barbacena)	8545	»	31	177	33
» (Fama)	8675	»	31	177	37
» (Tres Pontas)	8682	»	31	179	35
» (Caxambú)	8721	»	31	173	33
» (Fama)	8723	»	31	168	36
» (Alfenas)	8728	»	32	173	32
» »	8729	»	31	175	34
» »	8730	»	30	172	36
Est. de Matto Grosso (Terenos)	8540	♂	29	180	45
» »	8623	»	32	177	43
» »	8677	»	29	177	45
» (Campo Grande)	8680	»	31	174	47
» (Terenos)	8622	♀	31	185	39
Estado de São Paulo (Santa Adelaide)	5324	♂	29	173	47
» (Carambehy)	7865	»	27	168	46
» (Cons.º Martim Francisco)	7967	»	31	166	44
» (Monte Azul)	7991	»	33	172	44
» (Desembargador Furtado)	8004	»	29	169	43
» (Macuco)	8009	»	29	167	45
» (Leme	8010	»	29	175	46
» (Cosmopolis)	8089	»	31	168	44

Procedencia		No.	Sexo	E. dorsaes	Ventraes	Subcaudaes
Estado de São Paulo	(Victorino)	8092	♂	30	170	46
»	(Itapolis)	8387	»	30	168	43
»	(Cordeiro)	8388	»	33	169	43
»	(Eng.º Hermillo)	8395	»	31	172	42
»	(Araras)	8398	»	33	167	45
»	(Vicente Carvalhaes)	8415	»	31	174	44
»	(Villa Americana)	8421	»	31	167	47
»	(Ibitirama)	8427	»	29	174	45
»	(Butantan)	3184	♀	33	180	39
»	(Cosmopolis)	7673	»	31	176	cortada
»	(Casa Branca)	7988	»	31	174	44
»	(Eng.º Hermillo)	7992	»	31	170	35
»	(Mogy Mirim)	7993	»	27	171	39
»	(Cosmopolis)	8003	»	31	173	39
»	(Macuco)	8008	»	31	178	38
»	(Andrades)	8014	»	35	178	39
»	(Tatuhy)	8017	»	31	179	39
»	(Bariry)	8018	»	33	170	33
»	(Cosmopolis)	8072	»	32	172	35
»	(Mococa)	8081	»	32	175	37
»	(Cesario)	8090	»	33	176	38
»	(Collina)	8093	»	35	179	39
»	(Alberto Moreira)	8095	»	31	172	39
»	(Lobo)	8384	»	32	176	38
»	(Icanga)	8390	»	32	177	17 +
»	»	8391	»	33	179	37
»	(Ibitirama)	8396	»	32	174	23 +
»	(Palmar)	8405	»	33	178	37
»	(Martinho Prado)	8409	»	33	184	36
»	(Vicente Carvalhaes)	8412	»	31	173	41
»	(Martinho Prado)	8414	»	33	181	38
»	(Araras)	8416	»	33	170	35
»	(Eng.º Coelho)	8422	»	33	164	34
»	(Villa Americana)	8423	»	35	172	39
»	(Andes)	8424	»	33	182	39
»	(Terra Roxa)	8425	»	31	176	37
»	(Remanso)	8426	»	33	172	34
Estado do Paraná	(Joaquim Murtinho)	5794	♂	29	172	40
»	(Ponta Grossa)	7866	»	27	169	44
»	(Fernandes Pinheiro)	7965	»	29	165	43
»	(Balsa Nova)	8013	»	27	171	44
»	(Pirahy)	8075	»	27	169	41
»	»	8079	»	29	172	47
»	(Araucaria)	8380	»	29	172	46

Procedencia		No.	Sexo	E. dorsaes	Ventraes	Subcaudaes
Estado do Paraná	(Balsa Nova)	8383	♂	27	170	43
»	(Araucaria)	8386	»	31	173	42
»	(Campo Lar.° da Piedade)	8397	»	29	172	45
»	(Balsa Nova)	8399	»	27	166	46
»	(Entre Rios)	8514	»	29	164	41
»	(Araucaria)	8539	»	29	171	47
»	»	8549	»	29	168	44
»	(Balsa Nova)	8554	»	27	169	42
»	(Araucaria)	8555	»	27	172	45
»	»	8557	»	27	166	43
»	(Lapa)	8615	»	29	175	45
»	(Balsa Nova)	8617	»	29	169	42
»	(Curitiba)	8618	»	29	161	41
»	(Entre Rios)	8620	»	28	172	41
»	»	8621	»	29	174	46
»	(Rio da Varzea)	8624	»	27	170	39 +
»	»	8625	»	29	163	43
»	(Araucaria)	8627	»	27	166	43
»	(Palmeira)	8629	»	29	167	45
»	(Porto Amazonas)	8631	»	27	169	43
»	»	8632	»	29	165	42
»	(S. José dos Pinheiros)	8633	»	29	170	42
»	(Palmas)	9634	»	29	167	45
»	(Ponta Grossa)	3165	♀	29	178	35
»	(Entre Rios)	5241	»	29	171	31
»	(Curitiba)	7672	»	29	174	34
»	(Balsa Nova)	7989	»	29	170	37
»	(Carambehy)	8006	»	31	177	39
»	(Balsa Nova)	8012	»	32	173	35
»	(Araucaria)	8015	»	29	170	34
»	(União da Victoria)	8076	»	32	177	36
»	»	8077	»	31	172	36
»	(Entre Rios)	8083	»	29	174	33
»	»	8084	»	31	173	36
»	(Ponta Grossa)	8393	»	31	170	39
»	(Araucaria)	8406	»	29	175	36
»	»	8407	»	31	174	40
»	(Ponta Grossa)	8408	»	29	173	35
»	(Balsa Nova)	8410	»	29	179	34
»	»	8411	»	29	172	34
»	(Araucaria)	8417	»	29	176	39
»	(Carambehy)	8537	»	31	175	36
»	(Curitiba)	8538	»	29	170	37
»	(Araucaria)	8541	»	30	171	34

Procedencia		No.	Sexo	E. dorsaes	Ventraes	Subcaudaes
Estado do Paraná	(Araucaria)	8548	♀	30	173	33
»	»	8550	»	29	171	36
»	»	8551	»	31	173	35
»	»	8552	»	29	179	35
»	»	8556	»	29	175	42
»	»	8558	»	27	183	34
»	(Porto Amazonas)	8559	»	33	172	35
»	(Araucaria)	8628	»	30	177	18 +
»	(Curitiba)	8630	»	29	176	34
Est. de Sta. Catharina	(Tres Barras)	8074	♂	27	168	42
»	»	8073	♀	29	181	34
»	(Taunay)	8394	»	31	174	32 +
Est. do Rio G. do Sul	(Pelotas)	656	♂	29	172	48
»	(Alegrete)	664	»	29	168	44
»	(Bagé)	3009	»	27	173	48
»	(Sertão)	6195	»	29	168	38
»	(S. Leopoldo)	6900	»	29	173	47
»	(Uruguayana)	7986	»	27	167	46
»	(Saican)	8094	»	31	169	49
»	(Uruguayana)	8553	»	31	173	43
»	(Capella)	8619	»	31	183	50
»	(Restinga Secca)	8678	»	30	173	46
»	»	8679	»	29	166	44
»	(S. Simão)	8681	»	30	176	41
»	(Capella)	8722	»	32	168	49
»	»	8725	»	29	173	47
Est. do Rio G. do Sul	(Uruguayana)	7987	♀	33	179	36
»	(Saican)	8080	»	33	176	33
»	(Tigre)	8082	»	32	185	39
»	(Canôas)	8091	»	31	171	39
»	(Rosario)	8400	»	33	174	40
»	»	8413	»	33	176	40
»	(Alegrete)	8560	»	31	180	40
»	(Capella)	8561	»	33	175	39
»	(Saican)	8626	»	31	177	39
»	(Itaqui)	8669	»	31	178	37
»	(Rosario)	8676	»	31	182	38
»	(S. Simão)	8724	»	33	180	39
»	(João Arreguy)	8726	»	35	184	37
»	(S. Simão)	8727	»	33	173	40
Republica do Uruguay	(Melo)	8671	♂	29	170	48
»	»	8670	♀	33	175	39
»	»	8672	»	30	171	38
»	»	8673	»	35	175	40
»	»	8674	»	33	173	35

QUADRO II

EXEMPLARES DE *B. ALTERNATA* NA COLLEÇÃO DO INSTITUTO BUTANTAN

(sem procedencia conhecida)

Procedencia	No.	Sexo	Ventraes	E. dorsaes	Subcaudaes
Cobril do Instituto Butantan	2085	♂	29	169	47
»	5790	»	33	178	46
»	7737	»	29	174	40
»	7968	»	31	164	43
»	7969	»	29	163	43
»	7970	»	27	172	43
»	7972	»	27	168	32+n
»	7973	»	29	168	45
»	7974	»	31	178	43
»	7975	»	29	168	39
»	7976	»	29	173	47
»	7977	»	29	165	40
»	7978	»	31	173	46
»	7979	»	29	170	44
»	7983	»	29	167	33
»	7984	»	31	177	49
»	7985	»	31	174	45
»	7996	»	29	176	46
»	8000	»	29	177	45
»	8002	»	29	165	46
»	2565	♀	35	178	40
»	2956	»	35	176	38
»	3305	»	31	178	38
»	4512	»	31	178	42
»	7960	»	33	169	37
»	7961	»	33	178	38
»	7962	»	35	174	36
»	7963	»	31	173	41
»	7964	»	33	183	39
»	7971	»	31	176	36
»	7980	»	33	174	39
»	7981	»	31	173	37
»	7982	»	31	176	37
»	7990	»	29	175	33
»	7994	»	31	181	33
»	7995	»	31	174	38
»	7997	»	33	178	34
»	7998	»	33	176	35
»	7999	»	33	180	39
»	8001	»	35	173	33

Alem dos exemplares acima, haviam sido anteriormente examinados alguns outros, procedentes da Argentina e do Paraguay. As variações de sua pholidose e de seu colorido, no entanto, não trouxeram elemento algum novo a ajuntar-se ás conclusões deste trabalho.

QUADRO III

VERIFICAÇÕES BIOMETRICAS SOBRE A PHOLIDOSE DE EXEMPLARES DE *BOTHROPS ALTERNATA*

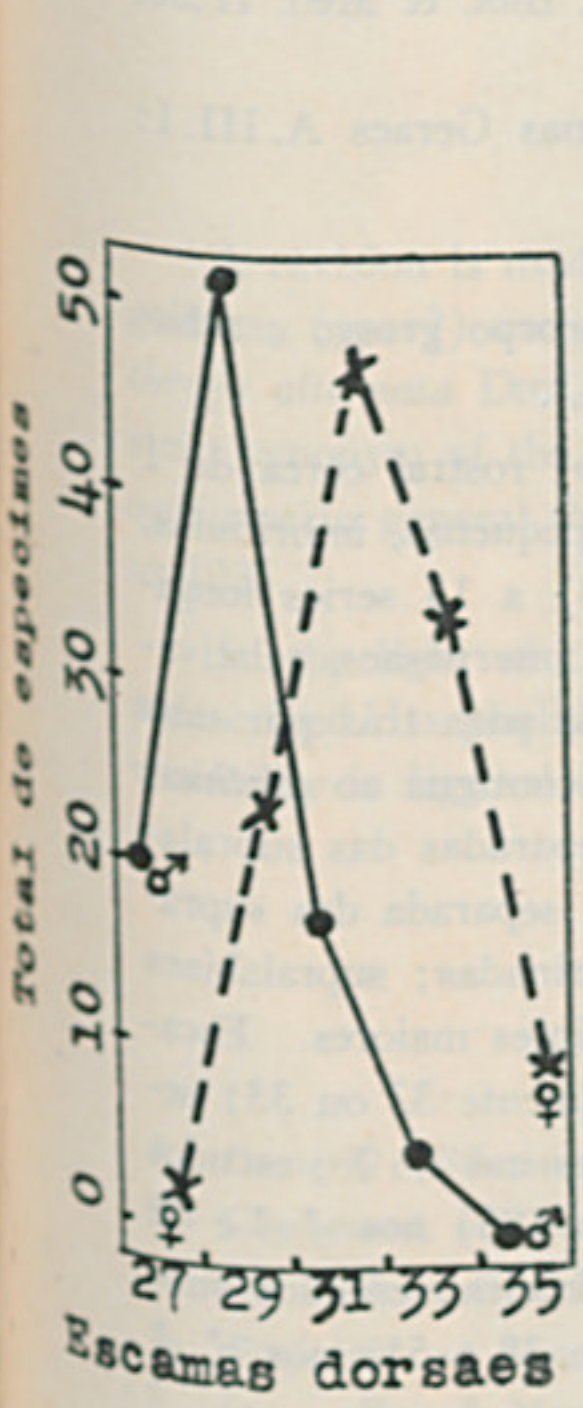
(Total — 210 exemplares)

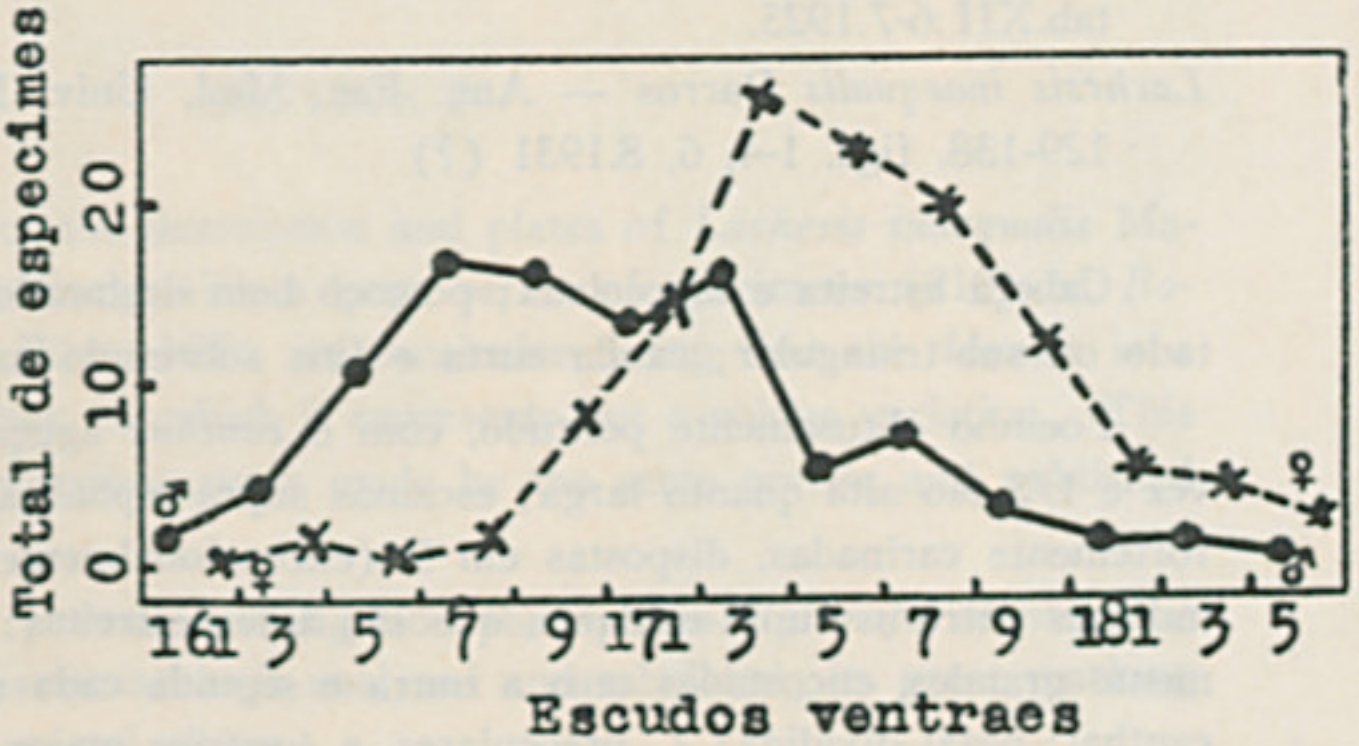
Escamas dorsaes			*Escudos ventraes*			*Escudos subcaudaes*		
	Total de exemplares ♂♂	Total de exemplares ♀♀		Total de exemplares ♂♂	Total de exemplares ♀♀		Total de exemplares ♂♂	Total de exemplares ♀♀
27 . . .	19	2	161. . .	1	0	31 . . .	0	1
28 . . .	1	0	162. . .	0	0	32 . . .	0	1
29 . . .	47	18	163. . .	2	0	33 . . .	0	11
30 . . .	6	5	164. . .	2	1	34 . . .	0	13
31 . . .	15	39	165. . .	5	0	35 . . .	0	14
32 . . .	2	9	166. . .	5	0	36 . . .	0	12
33 . . .	4	34	167. . .	7	0	37 . . .	0	12
34 . . .	0	0	168. . .	10	1	38 . . .	1	11
35 . . .	0	9	169. . .	9	1	39 . . .	1	23
	—	—	170. . .	7	7	40 . . .	3	8
	94	116	171. . .	3	6	41 . . .	6	2
			172. . .	10	8	42 . . .	8	2
			173. . .	10	14	43 . . .	16	0
			174. . .	6	12	44 . . .	11	1
			175. . .	3	10	45 . . .	16	0
			176. . .	2	13	46 . . .	14	0
			177. . .	5	9	47 . . .	9	0
			178. . .	2	11	48 . . .	3	0
			179. . .	2	8	49 . . .	3	0
			180. . .	1	4	50 . . .	1	0
			181. . .	1	3	x . . .	2	5
			182. . .	0	2		—	—
			183. . .	1	2		94	116
			184. . .	0	2			
			185. . .	0	2			
				—	—			
				94	116			

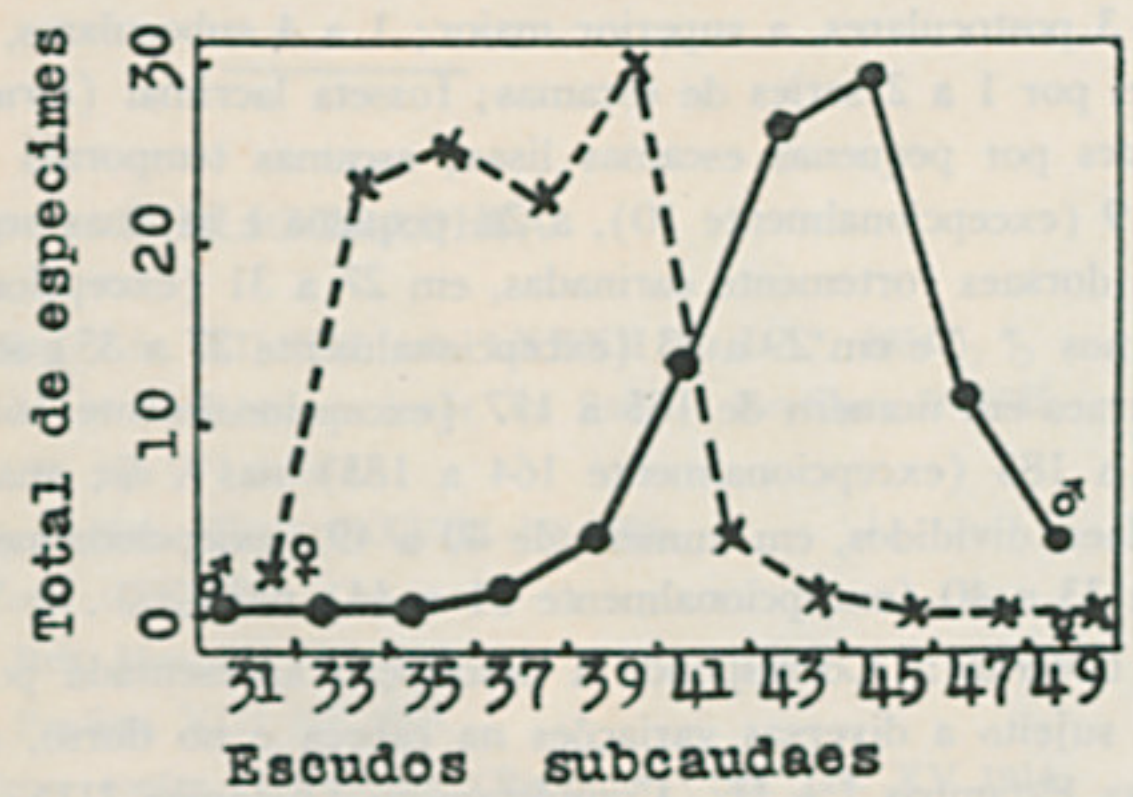
1a. as escamas dorsaes apresentam maior tendencia a ser em numero de 27 ou 29 entre os ♂ ♂ e de 31 ou 33 entre as ♀ ♀ ;

2a. os escudos ventraes apresentam maior tendencia a variar entre 168 e 173 nos ♂ ♂ e entre 173 e 178 nas ♀ ♀ ;

3a. os escudos subcaudaes tendem mais a variar entre 42 e 47 nos ♂ ♂ e entre 33 e 40 nas ♀ ♀ . Taes tendencias surgem nitidas nos Graphicos seguintes:







Redescripção de *Bothrops alternata* D. & B., 1854

Estampa III

Bothrops alternatus Duméril et Bibron — Erp. Gén. VII:1512. tab. LXXXII: 1.1854.

Lachesis alternatus Boulenger — Cat. Sn. Brit. Mus. III:541.1896.

Lachesis alternatus Ihering — Rev. Mus. Paulista VIII:357.1910.

Lachesis alternatus Brazil — La Défense contre l'Ophidisme (Butantan) :95. tab. XV. 1914.

Lachesis alternatus Houssay — N. e. serp. ven. Rep. Argentina, etc. :18.figs. 8 e 9 (A. Flaiban, Buenos Aires) 1918.

Lachesis inaequalis Magalhães — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XVIII(1) :153. tabs. VII-XII. 1925.

Bothrops alternata Amaral — Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. II :55. tab.XII :6-7.1925.

Lachesis inaequalis Barros — Ann. Fac. Med. Univ. Minas Geraes A. III. I: 129-138. figs. 1-4, 6, 8.1931 (?)

Cabeça estreita e lanceolada; pescoço bem destacado; corpo grosso e achatado ou sub-triangular; cauda curta e fina sobretudo na ♀.

Focinho obtusamente pontudo, com o *canthus* aguçado; rostral cerca de 1 vez e 1/3 tão alta quanto larga; escamas supra-cephalicas pequenas, imbricadas, fortemente carinadas, dispostas em 9 (excepcionalmente 8) a 13 series longitudinaes entre as supra-oculares, que são antes estreitas; 2 internasaes, relativamente grandes, encostadas uma a outra e seguida cada uma para trás por uma canthal; nasal dividida; 2 preoculares, a superior maior e contigua ao *canthus;* 2 a 3 postoculares, a superior maior; 1 a 4 suboculares, separadas das supralabiaes por 1 a 2 series de escamas; fosseta lacrimal (*lorus*) separada das supralabiaes por pequenas escamas lisas; escamas temporaes carinadas; supralabiaes 8 a 9 (excepcionalmente 10), a 2a. pequena e as duas seguintes maiores. Escamas dorsaes fortemente carinadas, em 27 a 31 (excepcionalmente 32 ou 33) series nos ♂ ♂ e em 29 a 33 (excepcionalmente 27 a 35) series nas ♀ ♀ ; escudos ventraes em numero de 165 a 177 (excepcionalmente 161 a 183) nos ♂ ♂ e de 170 a 183 (excepcionalmente 164 a 185) nas ♀ ♀; anal inteira; escudos subcaudaes, divididos, em numero de 40 a 49 (exiepcionalmente 38 a 51) nos ♂ ♂ e de 33 a 40 (excepcionalmente 31 a 44) nas ♀ ♀ .

Colorido: Corresponde á descripção apresentada por Boulenger (6), mas está sujeito a diversas variações na cabeça e no dorso, segundo se vê nas annexas Estampas I e II. Completam-no (Estampa III): 1 linha negra extendida geralmente por sobre a 3a. a 4a. a 5a. supralabiaes e margeada inferiormente por uma zona esbranquiçada que inclue o *lorus* e geralmente as supralabiaes collocadas nos 2/3 anteriores da abertura buccal; 3a. supralabial pintada de negro; 1 linha clara a margear ás vezes o *canthus* e a supraocular e a extender-se quasi sempre desde o angulo postero-superior de orbita até atrás do angulo da bocca, sob a forma de uma faixa tarjada de escuro dos dois lados; região infralabial e gular claras, salpicadas de pardo escuro, com u'a mancha alongada, parda, tarjada de escuro, desde cada lado da symphysal e entre as infralabiaes e as mentaes numa extensão correspondente á metade da abertura buccal; na parte an-

terior do abdome uma lista estreita escura ao longo da linha mediana, desde as ultimas gutturaes até atrás da chamada região cervical, onde se confunde com o systema de manchas ventraes.

Comprimento maximo — 1.690 mm.; cauda — 130 mm. (♀).

Distribuição geographica: região centro-meridional do Brasil, Uruguay, Paraguay e Argentina.

ABSTRACT

A revision is made of the description and plates of *Lachesis inaequalis* Magalhães, (year?) comparatively with a large series of specimens (210) of *Bothrops alternata* Dm. & Bibr., 1854, its conclusion being that the former is a strict synonym of the latter, of which it represents but a colour variation. This confirms in general the previous study made by the same reviser and published in 1925.

In the light of the present investigation the species *Bothrops alternata* is redescribed. Its pholidosis variation is analysed and tabulated; its great marking variability is figured in several plates.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Duméril* e *Bibron* — Erp. Gén. VII:1512. tab. LXXXII bis:L-1.ª. 1854.
2. *Guichenaud, in Castelnan* — Anim. nouv. Amér. du Sud — Reptiles: 76.1855.
3. *Jan* — Icon. Gén. XLVII. tab. VI:1.1875.
4. *Boulenger* — Ann. Mag. Nat. Hist. (5)XVIII:438.1886.
5. *Jan* — Rev. & Mag. Zool. :155.1859.
6. *Boulenger* — Cat. Sn. Brit. Mus. III:541.1896.
7. *Ihering* — Rev. Mus. Paulista VIII:357.1910.
8. *Brazil, V.* — La Défense contre l'Ophidisme (Butantan) :95. tab. XV.1914.
9. *Houssay, B. A.* — N. e. serp. ven. Rep. Argentina, etc. :18. figs. 8 e 9 (A. Flaiban, Buenos Aires) 1918.
10. *Serié, P.* — An. Soc. Cient. Argentina XCII:171.1921.
11. *Amaral, A. do* — Contr. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. II:54-55. tab. XII: 6-7.1925.
12. *Amaral, A. do* — Mem. Inst. Butantan VII:84. fig. 7.1932.
13. *Magalhães, O.* — (A Folha Medica?).

Nota: A separata está datada de 20-V-1922 e traz como capa um *fac-simile* de «A Folha Medica — Anno I — 16 de Março de 1920 — No. 3». Nessa revista, todavia, não foi publicado o trabalho original de Magalhães!

14. *Magalhães, O.* — Idem, Bello Horizonte 20-V-1922 (Canton & Bayer, Rio).

15. *Magalhães, O.* — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XVIII(1):153-154, 158-160. tabs. VII-XII.1925.

16. *Barros, E. da Fonseca* — Ann. Fac. Med. Univ. Minas Geraes A.III.I:129-138. figs. 1-4, 6, 8. (1931?).

Nota: Esse volume dos Annaes foi distribuido em dezembro de 1933. A separata, que tem paginação differente, traz a indicação dos «Annaes de 1930» e está datada de 9 de junho de 1931.

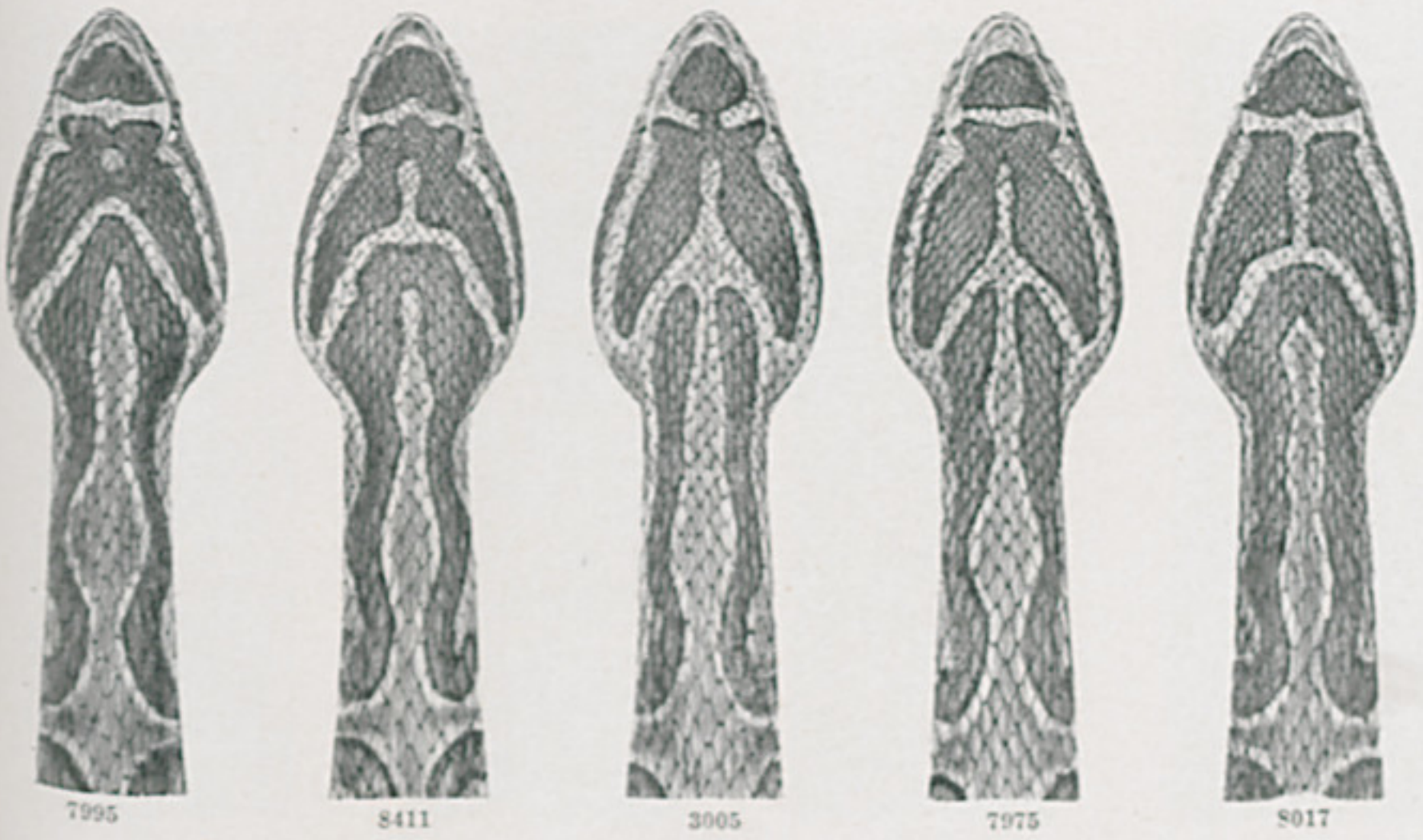
17. *Amaral, A do* — Rev. Mus. Paulista XIV:34-40.1926.

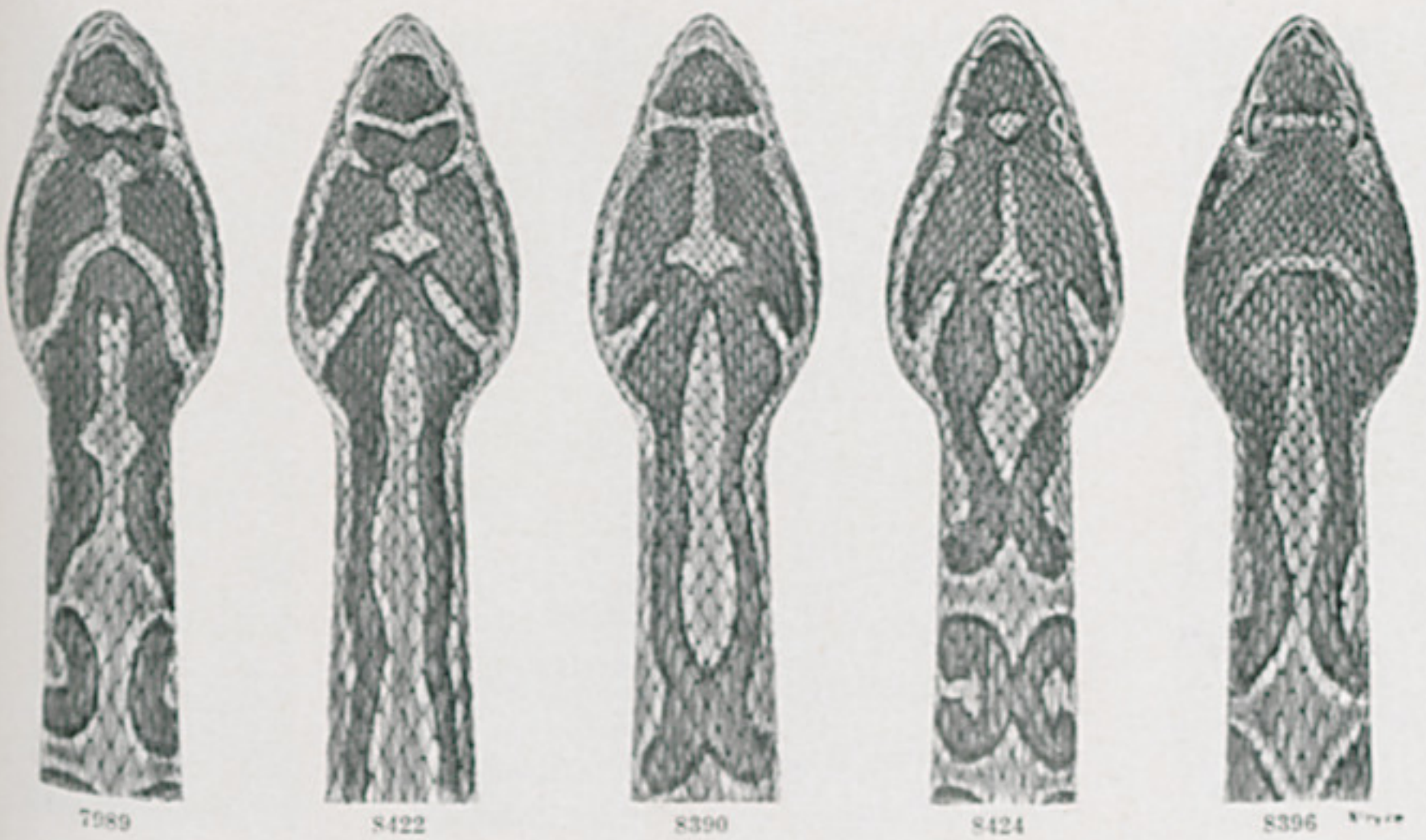
18. *Mocquard* — Bull. Mus. Hist. Nat. Paris :115-117.1905, *et* Miss. Scient. aux Mexique :951.1909.

19. *Gliesch, R. von* — Alm. Agric. Brasil. (separata):16.1925.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1934 e dado á publicidade em dezembro de 1934).

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII. 1933-1934.

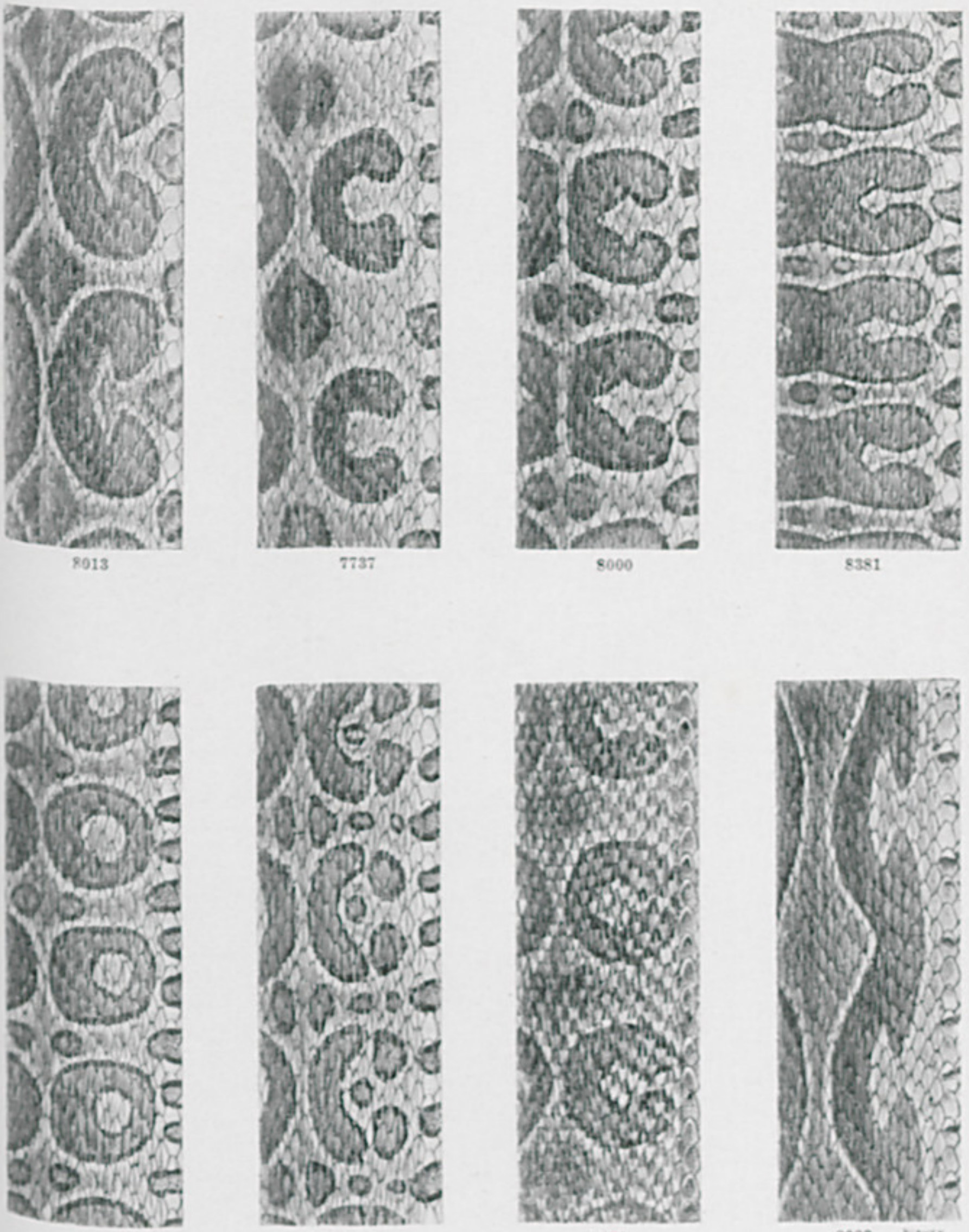




Estampa I

Os Nos. que apparecem sob as gravuras, correspondem a exemplares da collecção do Instituto Butantan

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII. 1933-1934.



8013 7737 8000 8381

7672 8425 7673 8083

Estampa II

Os Nos. que apparecem sob as gravuras, correspondem a exemplares da collecção do Instituto Butantan

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII. 1933-1934.



Estampa III

COLLECTA HERPETOLOGICA NO NORDESTE DO BRASIL

POR

AFRANIO DO AMARAL

598.181

COLLECTA HERPETOLOGICA NO NORDESTE DO BRASIL

POR

AFRANIO DO AMARAL

Relativamente pouco se conhece sobre o caracter da fauna herpetologica do extenso e arido districto nordestino do Brasil. Essa relativa ignorancia é devida a que, para fins de collecta systematica, o Nordeste tinha, até agora, sido apenas percorrido: 1.º, pelos grandes naturalistas Spix e Martius, em sua conhecida expedição scientifica, realizada, em parte, através da Bahia, Pernambuco e Piauhy (Mappa 1), no anno de 1818; 2.º, por Ernesto Garbe, o conhecido e saudoso naturalista viajante do Museu Paulista, que fez ali, no primeiro quartel do seculo presente, diversas incursões, capturando interessante material, representado especialmente por Lacertilios, de cujas formas novas para a sciencia eu já me occupei, em grande parte, em trabalho anterior (1), tendo, agora, em elaboração o catalogo geral de todos os exemplares colligidos; 3.º, por algumas pessoas residentes na zona e que occasionalmente enviavam exemplares para os museus europeus e para o Instituto Butantan.

Esta situação, no entanto, está em via de ser completamente modificada por força da creação da "Commissão Technica de Piscicultura do Nordeste do Brasil" sob a direcção do eminente zoologo, dr. Rodolpho von Ihering, que, com seus auxiliares e companheiros, está a colher ali abundante material para levantamento do Catalogo da Fauna Nordestina. Conforme indica o Mappa 2 (modificação de outro da C. T. P. N. B.), o districto que vem sendo percorrido pela Commissão, occupa uma vasta area que, de uma maneira geral, se poderia caracterizar pela relativa aridez, o que deve contribuir, naturalmente, para a concentração de formas zoologicas especiaes e, provavelmente, não encontradiças em outros pontos do territorio brasileiro.

Até o fim de 1933, o material herpetologico colligido pela Commissão e a mim remettido para identificação e ulterior accessão ás collecções do Instituto Butantan, era representado por 12 exemplares de Ophidios e 65 de Lacertilios.

OPHIDIOS

Fam. COLUBRIDAE
Subfam. COLUBRINAE (series aglypha)

Lygophis lineatus (L., 1758)

Especie por mim registada (2) para as zonas septentrional, central e occidental do Brasil. Representada na collecta da C. T. P. N. B. por 3 exemplares:

No. 8702. Adulto ♂, sem cabeça e com o ventre mutilado, procedente de S. Gonçalo, perto de Macahyba, Estado do Rio Grande do Norte.

V. 155 + n. A. 2. Sbc. 66 p. +n.

No. 8703. Adulto ♂, procedente da mesma localidade.

Spl. 8. V. 164. A. 2. Sbc. 71p..

No. 8704. Adulto ♂, sem cabeça, procedente de perto do Açude Cruzeta, Estado do Rio Grande do Norte.

V. 165 + n. A. 2. Sbc. 78 p..

Colorido de todos, como no typo.

Leimadophis poecilogyrus (WIED, 1825)

Esta especie, por mim considerada communissima em todo o Brasil, está representada por 3 exemplares, que correspondem a uma das raças em que eu a vou proximamente subdividir.

No. 8705. Semi-adulto ♂, procedente de Umbuzeiro, Estado da Parahyba.

V.151. A.2. Sbc. 49p..

No. 8706. Jovem ♀, procedente da mesma localidade.

V. 148. A.2 Sbc. 50 p..

No. 8707. Jovem ♂, procedente da mesma localidade.

V. 145. A. 2. Sbc. 49 p..

Colorido nos 3 exemplares typico da raça a ser por mim descripta.

Liophis occipitalis (JAN, 1863)

Especie já por mim dada como occorrente na zona oriental até a meridional e occidental do Brasil.

No. 8708. Adulto ♀, procedente de Areia, Estado da Parahyba, onde a especie é conhecida pelo nome do "Cobra Jericoá."

V.168. A.2. Sbc. 72p..
Colorido typico.

Lioheterophis, g. n.

Dentes maxillares 17, os 15 anteriores augmentando de tamanho para trás, diastema largo, os 2 posteriores muito grandes e collocados sob uma vertical baixada da placa temporal anterior; dentes mandibulares subeguaes. Cabeça ligeiramente mais larga do que o pescoço; olho moderado, com pupilla redonda. Corpo cylindrico; escamas dorsaes lisas, sem fossetas apicilares, em 21 filas ao meio do corpo; ventraes arredondadas lateralmente. Cauda media (1/6 do comprimento total); subcaudaes em 2 filas.

Lioheterophis iheringi, sp. n.

Rostral mais larga do que alta, bem visivel de cima; internasaes mais curtas do que as prefrontaes; frontal cerca de 1 ½ vez tão longa quanto larga e tão longa quanto sua distancia da ponta do focinho e quanto as parietaes; nasal dividida; frenal tão longa quanto alta; preocular extendida á superficie supracephalica, mas separada da frontal; postoculares 2; temporaes 1 + 2; supralabiaes 8, a 4.ª e a 5.ª contiguas á orbita; mentaes anteriores tão longas quanto e mais largas do que as posteriores e contiguas a 5/6 infralabiaes. Escamas dorsaes em 21 filas, com a forma 23-*21*-20-19-17-15. Ventraes 151; anal dividida; subcaudaes 50 pares.

Coloração — dorso pardo-plumbeo com estreitas estrias negras transversaes, ligeiramente obliquas para baixo e para trás, interrompidas por uma faixa clara, mas apagada, longitudinal, começando depois do meio do corpo e desapparecendo sobre a região anal; cabeça negro-plumbea, em cima, com labios e garganta claros sem manchas; face ventral esbranquiçada, com numerosas manchas transversaes cinzentas, sobretudo nitidas nos 3/5 medios do comprimento.

Typo: No. 8362, ♀, colhida viva, em Campina Grande, Estado da Parahyba, conservada em perfeito estado.

Comprimento total — 360 mm.; cauda 65mm..

Especie dedicada ao dr. Rodolpho von Ihering.

Nota: Em trabalho recente (Occ. P. Mus. Zool. Univ. Michigan No. 251.1932), Dunn achou indicado subdividir os generos *Leimadophis* e *Liophis*, por mim reconhecidos na fauna ophidica neotropica (Mem. Inst. Butantan IV:

127-271.1929), em 5 outros generos, que assim se distinguiriam:

A. Dentição maxillar diacranteriana, com presas posteriores

I. Hemipenis simples, de ponta calycular e livre
Escamas sem fossetas apicilares . . . . . *Rhadinaea*

II. Hemipenis bifido, de ponta calycular e livre
1. Escamas com 1 fosseta apicilar . . . . . *Dromicus*
2. Escamas com 2 fossetas apicilares . . . . *Alsophis*

III. Hemipenis bifido, de ponta acalycular e capitada
Escamas com 2 fossetas apicilares . . . . . *Leimadophis*

AA. Dentição maxillar syncranteriana, sem presas posteriores.
Hemipenis bifido, de ponta acalycular e capitada
Escamas sem fossetas apicilares . . . . . *Liophis*

Caso se acceitasse como definitiva esta subdivisão, o novo genero *Lioheterophis*, por possuir dentição maxillar de typo diacranteriano e não apresentar fossetas apicilares nas escamas dorsaes, deveria ficar ligado a *Rhadinaea*. Isto, naturalmente, si, conseguindo-se outros exemplares, inclusive ♂♂, de *L. iheringi* (cujo holotypo é ♀), se verificasse que a estructura do hemipenis é semelhante á supra-assignalada para *Rhadinaea*: simples e de ponta calycular e livre. Mesmo assim, essa ligação não me pareceria de modo algum justificada, porque o genero *Lioheterophis* Amaral, representado pelo typo *iheringi*, differe consideravelmente de *Rhadinaea* Cope, typo *vermimaculaticeps*, pelos seguintes caracteres fundamentaes: 1.º physionomia; 2.º caracteres exteriores; 3.º chorologia, pois *R. vermimaculaticeps* occorre no centro-sul da America Central, enquanto *L. iheringi* procede do extremo nordeste do Brasil; 4.º e principalmente, proporção da cauda em relação ao total do corpo, que é approximadamente de 1:5,6, em *Lioheterophis iheringi* contra 1:2,8 em *Rhadinaea vermimaculaticeps*.

Subfam. **Boiginae** (series opisthoglypha)

Pseudoboa trigemina (D. & B., 1854)

Especie abundantissima no Brasil.

No. 8709. Adulto ♂, procedente de Umbuzeiro, Estado da Parahyba.
V.185. A.1. Sbc. 73 p..

No. 8710. Jovem ♂, procedente de Garanhuns, Estado de Pernambuco.
V.179. A.1. Sbc. 66 p..

No. 8711. Jovem ♂, sem cabeça, procedente de Umbuzeiro, Estado da Parahyba.
V.187 + n. A.1. Sbc. *60* p..
Colorido dos 3 exemplares como no typo.

Chlorosoma nattereri (STEIND., 1870)

Especie já assignalada no nordeste.
No. 8712, Adulto ♀, procedente de Umbuzeiro, Estado da Parahyba.
Spl. 7. V.215. A. 2. Sbc. 105p..
Por seu colorido e pela proporção da cauda, este exemplar talvez corresponda a uma das raças em que a especie deve ser subdividida.

LACERTILIOS

Fam. GECKONIDAE

Hemidactylus mabouia (JONNÈS, 1818)

No. 352. Adulto desta "Lagartixa", capturado em Jatobá, Estado de Pernambuco.

Gymnodactylus conspicuus AMARAL, 1932

Nos. 353 e 354. Dois exemplares, procedentes de Santa Luzia, Estado da Parahyba, desta "Lagartixa", a confirmarem a descripção, por mim apresentada em 1932 (3), sendo que o typo e paratypos procediam todos de Villa Nova, Estado da Bahia.

Fam. IGUANIDAE

Iguana iguana (L., 1758)

No. 355. Adulto procedente de Joazeirinho, Estado da Parahyba. Nome vulgar no Nordeste: "Tejibú" (Tejubú), que, em tupi, significa "lagarto verde". Outro nome, tambem tupi, applicado a este lagarto é o de "Senembú" (Sinimbú), que significa "o lustroso" (ou que emitte brilho). A proposito, diz Gabriel Soares de Souza (*in* Roteiro do Brasil, cap. CXIV): "No mato se criam outros lagartos, a que os indios chamam *senembús,* que tambem são muito grandes, mas não tamanhos como os jacarés; estes remetem á gente, e criam-se nos troncos das arvores; cuja carne é muito boa e saborosa".

Tropidurus torquatus torquatus (WIED, 1820)

Nos. 356 a 380. Uma serie de 25 exemplares deste "Papa-vento" ou "Calango", em varias idades e de ambos os sexos, colhidos em Curraes Novos e perto de Acary, Estado do Rio Grande do Norte; Caruarú, Estado de Pernambuco; Moageiro de Baixo, Umbuzeiro e Proximidade do Açude Puxinanan, perto de Campina Grande, Estado da Parahyba.

Um dos exemplares ♀ apresentava 6 ovos sub-ellipticos.

Tapinurus scutipunctatus AMARAL, 1932

Nos. 381 a 390. Uma serie de 10 exemplares procedentes de Umbuzeiro e da proximidade do Açude Puxinanan, perto de Campina Grande, Estado da Parahyba, com excepção de Nos. 388, 389 e 390, que procedem de Brejo de Areia, no mesmo Estado.

Esta serie ratifica cabalmente a descripção dessa especie por mim publicada em 1932 (4) e baseada em 8 exemplares de ambos os sexos, todos procedentes de Villa Nova, Estado da Bahia.

Nota: O meu prezado collega, prof. Robert Mertens, do Senckenbergisches Museum, de Frankfurt, a/M, teve a gentileza de escrever-me recentemente, lembrando a possibilidade de esta especie ser synonyma de *Tropidurus semitaeniatus* (Spix). A descripção de Spix (5) deixa muito a desejar e a referencia a ella feita por Boulenger (6) é muito superficial, de sorte que, sem examinar comparativamente os typos, nada posso decidir a proposito desse caso. E' bem verdade que o typo de *semitaeniatus* provém igualmente da Bahia, o que torna provavel a identidade das 2 especies, conforme pensa Mertens. Todavia, a forma em apreço se distingue nitidamente das especies validas de *Tropidurus*, pela physionomia, chateza do corpo e presença de escamas dorsaes absolutamente lisas; nestas condições, provada que seja a identidade de *scutipunctatus* e de *semitaeniatus*, o nome *Tropidurus* deve ficar restricto ás especies caracterizadas facilmente por escamas dorsaes mais ou menos carinadas, validando-se o presente nome generico *Tapinurus* em relação a *semitaeniatus*, que logo se distingue por suas escamas dorsaes lisas

Fam. TEIIDAE

Ameiva ameiva ameiva (L., 1758)

Nos. 391 a 396. Uma serie de 6 exemplares deste lagarto colhidos em Pesqueira, Estado de Pernambuco; Moajeiro de Baixo e Umbuzeiro, Estado da Parahyba; e S. Gonçalo, perto de Macahyba, Estado do Rio Grande do Norte.

Nome vulgar: "Jacaré-pinima", que, em tupi, significa "lagarto manchado". A proposito desta especie explica Gabriel Soares de Souza: "Pelos matos se criam outros lagartos pequenos pintados como os de Hespanha, a que os indios chamam *jacarépinima,* os quaes criam por entre pedras, e em tocas de arvores, com os quaes tem as cobras grandes brigas".

Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus (L., 1758)

Nos. 397 a 412. Uma serie de 16 exemplares de ambos os sexos deste "Calango", procedentes de Umbuzeiro e Joazeirinho, no Estado da Parahyba e da vizinhança do Açude dos Tambores, em Pesqueira, Estado de Pernambuco.

O No. 405, ♀ em bom estado de preservação, apresenta um colorido roseo-abobora no intersticio das escamas da dupla prega gular.

Gymnophthalmus multiscutatus Amaral, 1932

Nos. 413 e 414. Dois exemplares, procedentes de Umbuzeiro, Estado da Parahyba. Esses exemplares, que se acham em excellente estado de preservação, confirmam a descripção, por mim publicada (7) da especie em apreço e suggerem as seguintes modificações naquella definição original, que fôra baseada em um exemplar mal conservado, ora reexaminado sob o microscopio: o holotypo e os dois presentes exemplares apresentam 7, em logar de 5, supralabiaes e infralabiaes; 16, em logar de 15, filas de escamas ao redor do meio do corpo (12 dorsaes e 4 ventraes); 5, em logar de 6, poros femoraes; no colorido do dorso, se notam 12, em vez de 10, estrias longitudinaes; a garganta é punctuada de negro; e na cauda a face dorsal é rosea, lineolada de pardo escuro.

Fam. AMPHISBAENIDAE

Amphisbaena alba L., 1758

No. 415. Um exemplar typico desta "Cobra de duas cabeças", procedente de Areia, Estado da Parahyba.

Amphisbaena pretrei D. & B., 1839

No. 416. Um exemplar, adulto, desta especie relativamente rara, occorrente no Brasil septentrional. Foi colhido entre raizes de "Macambira", perto de Pocinhos, zona de cariry, Estado da Parahyba; apresenta 236 aneis sobre o

corpo e 24 sobre a cauda, estando cada anel do corpo dividido em 14 segmentos dorsaes e 16 ventraes. Occipitaes 2; a esquerda maior, subdividida e quasi tão grande quanto qualquer das 2 frontaes.

ABSTRACT

A list is given of 12 snakes and 65 lizards collected in N. E. Brazil (States of Pernambuco, Parahyba and Rio Grande do Norte) by the Commissão Technica de Piscicultura. Of the snakes one specimen corresponds to a form new to science and which has been named *Lioheterophis iheringi*, g. n., sp. n. (Colubridae, Colubrinae); *Lioheterophis* is close to *Liophis*, sensu Dunn, and *Rhadinaea* Cope. Of the lizards various specimens served to confirm the description, respectively, of the following forms: species *Gymnodactylus conspicuus* Amaral and *Gymnophthalmus multiscutatus* Amaral and genus *Tapinurus* Amaral as published in 1932; in regard to the species *G. multiscutatus* a few little changes have been made in its definition as suggested by two specimens included in the present collection.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Estudos sobre Lacertilios Neotropicos. I. Novos generos e especies de de lagartos do Brasil — Mem. Inst. Butantan VII:51-74. 55 figs. 1932.
2. *Amaral, A. do* — Contribuição ao conhecimento dos Ophidios do Brasil. IV. Lista Remissiva dos Ophidios do Brasil — Mem. Inst. Butantan IV:87.1929.
3. *Amaral, A. do* — Estudos sobre Lacertilios Neotropicos. I. Novos generos e especies de lagartos do Brasil — *loc. cit.* :57-58. figs. 9-10.
4. *Amaral, A. do* — Estudos sobre Lacertilios Neotropicos. I. Novos generos e especies de lagartos do Brasil — *loc. cit.* :65-66. figs. 22-25.
5. *Spix* — Species novae lacert. brasil. :13. tab. XVI:1.1825.
6. *Boulenger* — Cat. Liz. Brit. Mus. II:178.1885.
7. *Amaral, A. do* — Estudos sobre Lacertillos Neotropicos. I. Novos generos e espécies de lagartos do Brasil — *loc. cit.* :73-74. figs. 51-55.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em agosto de 1934 e dado á publicidade em dezembro de 1934.)

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII. 1933-1934.



Mappa 1


Zonas aridas e chuvosas
do Nordeste
MARANHÃO
CEARÁ
RIO G. DO NORTE
PARAHYBA
PERNAMBUCO
ALAGOAS
BAHIA
FORTALEZA
NATAL
MACEIÓ
ARACAJU
BAHIA
Chuvas
Mais de 1 metro
0,60 a 1 metro
0,40 a 0,60
Menos de 0,40
Legenda

Mappa 2

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS RELAÇÕES IMMUNOLOGICAS ENTRE O "TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO" E DEMAIS FEBRES EXANTHEMATICAS QUE OCCORREM NA AMERICA DO SUL

POR

J. LEMOS MONTEIRO

614.526.80

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS RELAÇÕES IMMUNOLOGICAS ENTRE O "TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO" E DEMAIS FEBRES EXANTHEMATICAS QUE OCCORREM NA AMERICA DO SUL

POR

J. LEMOS MONTEIRO

O estudo das relações immunologicas entre as varias Rickettsioses apresenta, não somente um interesse meramente scientifico, como tambem grande importancia sanitaria e pratica, em virtude dos elementos que pode fornecer para a filiação das varias modalidades clinicas em determinados grupos e, portanto, para a orientação das medidas efficientes de prophylaxia a serem tomadas nos differentes paises.

Em trabalhos anteriores, estudando, com Amaral (1 e 2), a historia natural e classificação das Rickettsioses em geral, mostrámos a importancia da prova de immunidade cruzada, que contribue para dividil-as em quatro grandes grupos, constituido cada um por um certo numero de infecções mais ou menos affins. Estas, por sua vez, se distinguiriam entre si por outros caracteres e elementos de natureza experimental, epidemiologica e clinica.

Pela prova de immunidade cruzada, praticada por Parker e Davis (3, 4 e 5), Dyer (6) e por nós (7 e 8), ficou estabelecida a posição do "Typho exanthematico de S. Paulo" (Rickettsiose neotropica, typo de S. Paulo) no grupo III, segundo a classificação proposta (1 e 2), ao lado da Febre maculosa das Montanhas Rochosas, typo oeste (Rickettsiose nearctica, typo oeste) e das outras modalidades: Rickettsiose nearctica, typo leste e Rickettsiose botonnosa, typo mediterraneo.

Na impossibilidade de se praticar a prova de immunidade cruzada para a filiação de determinada febre exanthematica a um dos grupos propostos, podem-se pesquisar as relações immunologicas por meio da verificação do poder protector do soro de convalescente contra o virus de uma determinada Rickettsiose, a cujo grupo se deseja saber si se liga o virus que determinou o caso clinico do qual proveiu o soro.

Por esta prova, de protecção com soro de convalescentes, iniciámos tambem o estudo das relações immunologicas entre a Rickettsiose de S. Paulo e as modalidades que occorrem sob forma, quer endemica, quer epidemica, em outros paises sul-americanos (Argentina, Chile e Bolivia). Os nossos resultados já foram, em parte, resumidos (9 e 10) em notas apresentadas á Sociedade de Biologia de S. Paulo e são agora expostos por extenso.

O estudo das relações entre as varias Rickettsioses que interessam ao nosso continente deverá, em todo caso, ser continuado e completado por outros methodos, como, p. ex., a prova de immunização cruzada, comportamento experimental comparativo dos virus respectivos, histologia pathologica, aspecto clinico, epidemiologia, etc..

Os soros de convalescentes que pudemos estudar devemol-os á gentileza do Dr. S. Mazza, chefe da "Misión de estudios de patologia regional" da Argentina e eram provenientes: 2, de casos endemicos, occorridos em Tinogasta, na provincia de Catamarca, na Republica Argentina; 5, de casos da recente epidemia no Chile, fornecidos pelo prof. E. Onetto, do Instituto Bacteriologico, da capital chilena; 1, recebido mais recentemente, de um caso occorrido na Bolivia (La Paz). Todos os casos foram confirmados clinicamente, apresentando reacção de Weil-Felix positiva.

Prova de protecção

Technica. — A uma quantidade fixa de soro a examinar (0,5 cc.), juntámos e misturámos doses varias (0,1 cc., 0,25 cc. e 0,5 cc.) de virus (sangue desfibrinado de cobaia infectada, colhido no 2º ou 3º dia de reacção febril); depois de um contacto de 1/2 hora na temperatura do laboratorio, a mistura era inoculada, por via peritoneal, em cobaia. Para cada dose de virus, eram tomados (desde que o permittia a quantidade do soro) dois tubos e, portanto, inoculadas duas cobaias. Cobaias testemunhas eram inoculadas com as respectivas doses de virus somente, ou virus de mistura com soro normal na mesma proporção que o soro convalescente examinado.

Resultados das experiencias

I. *Soros provenientes da Argentina*

1. *Soro No. 30.323.* — Oriundo, segundo informações do dr. Mazza, de um doente de Tinogasta, capital do departamento do mesmo nome, na provincia de Catamarca, que limita com o Chile. O doente apresentou "estupor e confusão mental, com febre alta durante 7 dias e erupção morbiliforme" e, ao ser o caso notificado, em 18.X.933, a reacção de Weil-Felix, praticada por aquelle

collega, mostrou-se positiva com o *Proteus* X19 ao titulo de 1/25.000; o titulo da reacção attingiu 1/6.400 com o soro colhido a 1.XI.933 e que nos foi remettido.

A reacção de Weil-Felix, que praticámos em 14.XI.933 deu o seguinte resultado (leitura após 24 horas de permanencia dos tubos na temperatura do laboratorio, tendo ficado 2 horas em banho-maria a 37°): com o *Proteus* OX19: diluição a 1/2.560 (++) e a 1/5.120 (+); com o *Proteus* 0X2: a 1/40 (++), e a 1/80 (+); com o *Proteus* OXK: a 1/160 (++); com o *Proteus* OXL: 1/1.280 (++).

Prova de protecção. — Os resultados da prova de protecção deste soro relativamente ao virus de S. Paulo (sangue desfibrinado da cobaia 1377), praticada em 23.XI.933, constam do Quadro I.

QUADRO - I

SORO Nº 30.252 (PROVENIENTE DA ARGENTINA). PROVA DE PROTECÇÃO RELATIVAMENTE AO "TYPHO EXANTH. DE S. PAULO" (VIRUS DA COBAIA N. 1377), PRATICADA EM 23-XI-933.

Soro	Virus	Cobaia	Resultado das inoculações	Testemunhas: Virus de S. Paulo	Testemunhas: Cobaia	Resultado das inoculações
0,5	0,1	1381	†	0,1	1383	
0,5	0,1	1382		0,25	1386	
0,5	0,25	1384	†	0,5	1389	†
0,5	0,25	1385				
0,5	0,5	1387	†			
0,5	0,5	1388	†			

Verifica-se por esses resultados que nenhuma acção protectora foi exercida pelo soro relativamente á infecção da cobaia pelo virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" (Rickettsiose neotropica): todas as cobaias inoculadas com as misturas soro-virus, mesmo as inoculadas com as menores doses do ultimo, tiveram infecção caracteristica da mesma forma que as cobaias testemunhas, inoculadas com virus somente.

Com este soro praticámos tambem a prova de protecção relativamente ao

virus da Febre maculosa das Montanhas Rochosas (Rickettsiose nearctica). Os resultados das inoculações figuram no Quadro II.

Como seria de esperar, dadas as relações immunologicas já estabelecidas entre as Rickettsioses nearctica e neotropica, os resultados da prova de protecção desse soro relativamente á primeira, foram tambem negativos: as cobaias, inoculadas com as misturas soro-virus, comportaram-se como as testemunhas injectadas com virus somente.

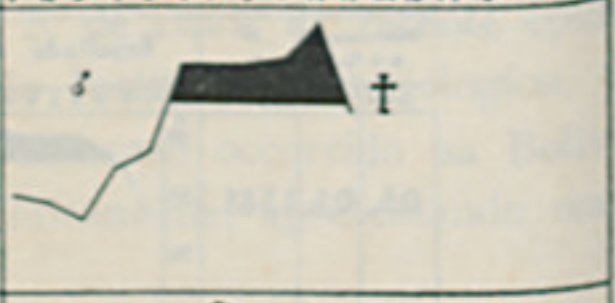
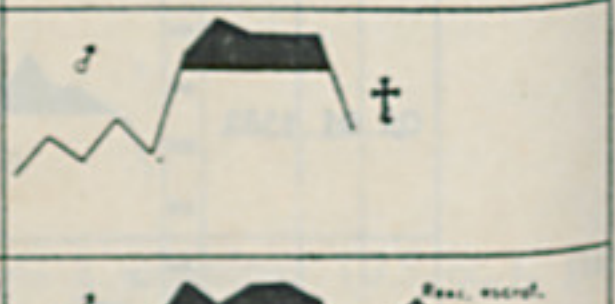
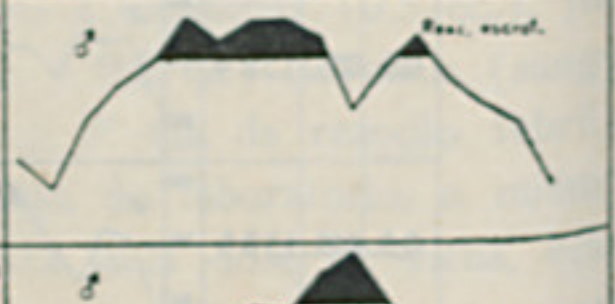
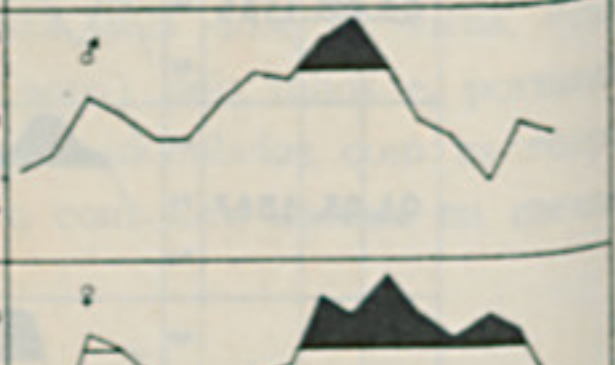
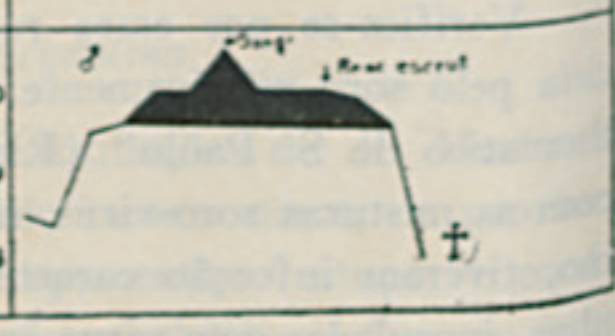
2. *Soro No. 30.452.* — Oriundo, em duas porções, (a segunda sob No. 30.850) de outro caso, tambem occorrido em Tinogasta e colhido em 24-XII-933.

A reacção de Weil-Felix, que praticámos em 6.II.934, apresentou o seguinte resultado: com o *Proteus* OX19, diluição a 1/2560 (++) e a 1/5120 (+); com o *Proteus* OX2, a 1/40 (++++) e a 1/80 (+); com o *Proteus* OXK, a 1/40 (+++) e a 1/80 (+); com o *Proteus* OXL, a 1/1280 (+++) e a 1/2560 (++).

Prova de protecção. — Os resultados desta prova relativamente ao virus de S. Paulo (sangue desfibrinado da cobaia 1490), praticada em 6.II.934, são consignados no quadro III.

QUADRO - II

SORO Nº 30.232 (PROVENIENTE DA ARGENTINA). PROVA DE PROTECÇÃO RELATIVAMENTE Á "FEBRE MAC. DAS MONT. ROCHOSAS" (VIRUS DA COBAIA Nº 1378), PRATICADA EM 23-XI-933.

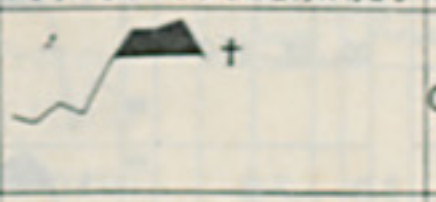
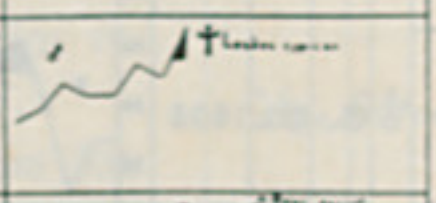
Mistura soro-virus da F. maculosa Mont. Roch.		Nº da Cobaia	Resultado das inoculações
Soro	Virus		Dias 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
0,5 c.c.	0,1 c.c.	1391	
0,5 c.c.	0,25 c.c.	1393	
0,5 c.c.	0,5 c.c.	1395	
Testemunha	0,1 c.c.	1392	
Testemunha	0,25 c.c.	1394	
Testemunha	0,5 c.c.	1396	

Verifica-se que o segundo soro estudado, proveniente de convalescente de outro caso occorrido na Argentina, tambem não apresentou qualquer acção protectora relativamente á infecção experimental pelo virus de S. Paulo.

De uma das cobaias inoculadas com mistura soro-virus (cobaia 1503), o virus foi mantido em novas passagens successivas, sempre com infecção caracteristica (cobaias Nos. 1527, 1546, 1561, 1571, etc.). O mesmo se obteve com uma das testemunhas (cobaia N.º 1508), sendo feitas passagens successivas para as cobaias Nos. 1523, 1537, 1553, etc.. Somente uma das cobaias testemunhas, inoculadas com 0,5 cc. de virus (cobaia No. 1509), não reagiu de modo typico, não sendo obtida passagem. Este resultado, porém, não modifica a conclusão geral, pois as outras duas testemunhas, inoculadas com menor proporção de virus, reagiram de modo caracteristico, sendo obtidas novas passagens.

QUADRO - III

SORO N 30 452 (PROVENIENTE DA ARGENTINA) PROVA DE PROTECÇÃO RELATIVAMENTE AO TYPHO EXANTH. DE S. PAULO (VIRUS DA COBAIA N 1490), PRATICADA EM 6-II-934

Materiaes empregados no S. Paulo		Nº da	Resultado das inoculações	Materiaes empregados no S. Paulo		Nº da	Resultado das inoculações
Soro	Virus	Cobaia	Dias 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17	Soro	Virus	Cobaia	Dias 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
0,5..	01..	1501		0,5..	0,5..	1505	
0,5..	01..	1502		0,5..	0,5..	1506	
Testem.	01..	1507		Testem.	0,5..	1509	
0,5..	025..	1503					
0,5..	025..	1504					
Testem.	025..	1508					

II. *Soros provenientes do Chile*

Em numero de 5, foram os soros colhidos em 22 e 25.XI.933 de doentes no 5º dia, mais ou menos, da convalescença. A reacção de Weil-Felix, praticada na occasião, mostrou-se positiva, tendo-nos sido communicados os seguintes resultados:

Com o *Proteus* X19: soro No. 1, (titulo de 1/1600); soro No. 2 (1/6400); soro No. 3 (1/25.600); soro No. 4 (1/3200); soro No. 5 (1/12.800).

Prova de protecção. — Os resultados desta prova, praticada em 15.III.934. relativamente ao virus de S. Paulo (sangue desfibrinado da cobaia 1581) são consignados no quadro IV.

Verifica-se que tambem estes soros, de convalescentes da recente epidemia chilena, não manifestaram acção protectora relativamente á infecção experimental pelo virus do "Typho exanthematico de S. Paulo".

Com os soros Nos. 1 e 5 observou-se uma ligeira attenuação do virus, não tendo sido elevada a reacção febril de algumas das cobaias e resistisdo os ani-

QUADRO-IV

SOROS Nos 1, 2, 3, 4 E 5 (PROVENIENTES DO CHILE). PROVA DE PROTECÇÃO RELATIVAMENTE AO "TYPHO EXANTH. DE S. PAULO" (VIRUS DA COBAIA Nº 1581). PRATICADA EM 15-III-934

Mistura para o preparo do Soro			Nº da Cobaia	Resultado das inoculações
Num.	Dose	Virus		
1	Q5..	Q1..	1595	
	Q5..	Q25..	1596	
	Q5..	Q5..	1597	
2	Q5..	Q1..	1598	
	Q5..	Q25..	1599	
	Q5..	Q5..	1600	
3	Q5..	Q1..	1601	
	Q5..	Q25..	1602	
	Q5..	Q5..	1603	
4	Q5..	Q1..	1604	
	Q5..	Q25..	1605	
	Q5..	Q5..	1606	
5	Q5..	Q1..	1607	
	Q5..	Q25..	1608	
	Q5..	Q5..	1609	
		Q1..	1610	
		Q25..	1611	
		Q5..	1612	

maes á infecção. Mesmo com estes soros, a reacção mostrou-se typica com uma das cobaias das 3 inoculadas. Este ultimo comportamento caracteristico da infecção foi verificado nas inoculadas com misturas dos outros soros virus, assim

como nas testemunhas, para as quaes o virus foi misturado com soro normal de cavallo.

III. *Soro proveniente da Bolivia*

Oriundo de um caso de "Typhus petechial" occorrido na Bolivia (La Paz) e tambem remettido pelo dr. S. Mazza, sob No. 31.010. Segundo informação recebida, a primeira reacção de Weil-Felix, praticada por Mazza, mostrou-se positiva para o *Proteus* X19 até o titulo de 1/1600. Confirmámos este resultado, obtendo os seguintes titulos: com o *Proteus* OX19, diluição a 1/2560 (++++); com o *Proteus* OX2, diluição a 1/160 (+++); com o *Proteus* OXK, diluição a 1/80 (+) e com o *Proteus* OXL, diluição a 1/2560 (++). Com os *Proteus* OX19 e OXL não foram feitas diluições maiores.

QUADRO - V

SORO Nº 32010 (PROVENIENTE DA BOLIVIA). PROVA DE PROTECÇÃO RELATIVAMENTE AO "TYPHO EXANTH. DE S. PAULO" (VIRUS DA COBAIA Nº 1879), PRATICADA EM 11-VII-934.

Mistura soro e virus de S. Paulo		Nº da Cobaia	Resultado das inoculações	
Soro	Virus		Dias	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
0,5 cc.	0,1 cc.	1895	C. 40 / 39 / 38	♀ † inf. intercur.
0,5 cc.	0,25 cc.	1896	40 / 39 / 38	♀ †
0,5 cc.	0,5 cc.	1897	40 / 39 / 38	♂ †
Testem.	0,1 cc.	1892	40 / 39 / 38	♀ †
Testem.	0,25 cc.	1893	40 / 39 / 38	♀ †
Testem.	0,5 cc.	1894	40 / 39 / 38	♂ †

Prova de protecção. — Os resultados desta prova, que praticámos em 11-VII-934, relativamente ao virus de S. Paulo (sangue desfibrinado da cobaia 1879), estão registados no Quadro V.

Verifica-se, da mesma forma, que o soro estudado, de mistura com o virus, não protegeu a cobaia relativamente á infecção experimental pelo "Typho exanthematico de S. Paulo".

DISCUSSÃO E RESUMO

Tendo-se em conta: 1º, o que já se sabe sobre as Rickettsioses ou febres exanthematicas (typho exanthematico, febre petechial, etc.) que occorrem nas regiões de onde provieram os soros que estudámos (Argenti-

na, Chile, Bolivia) quanto ao aspecto das infecções, principalmente o epidemiologico; 2º, os resultados das provas de protecção de soro convalescente relativamente ao virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" (Rickettsiose neotropica), pode-se, com certa segurança, estabelecer a filiação das mesmas aos differentes grupos que constituem as Rickettsioses, segundo a classificação que adoptamos (1 e 2).

Vimos que dos differentes soros estudados, de casos occorridos na Argentina (Tinogasta), da forma endemica, muito provavelmente; no Chile, da forma epidemica, e na Bolivia, num total de 8 soros de convalescentes, nenhum mostrou qualquer valor protector, segundo a technica descripta, relativamente á infecção experimental da cobaia pelo virus da Rickettsiose que occorre em S. Paulo (Brasil).

O facto indica que entre aquellas infecções e a ultima não existem estreitas relações immunologicas, o que, em todo caso, deverá ser confirmado, por outras provas, principalmente pelas de immunização cruzada.

Assim sendo, com a resalva do valor relativo da simples prova de protecção com soro de convalescente, podemos dizer que as febres exanthematicas que occorrem, quer sob forma endemica, quer epidemica, na Argentina, no Chile e na Bolivia, de cujos doentes provieram os soros que estudámos, não se filiam ao grupo em que se inclue o "Typho exanthematico de S. Paulo" (Rickettsiose neotropica), isto é, ao grupo III da classificação citada, ao qual pertence tambem a Febre maculosa das Montanhas Rochosas (Rickettsiose nearctica), do continente norte-americano.

Não consideramos impossivel a existencia ou o apparecimento naquelles paises da Rickettsiose neotropica ou de modalidades affins, dada a disseminação continental dos Ixodideos incriminados como seus transmissores.

Quanto, porém, ás infecções occorrentes naquelles paises e cujos casos forneceram os soros por nós estudados, ellas se filiariam ao grupo IV da citada classificação, onde se incluem o Typho exanthematico classico (Rickettsiose epidemica ou *major*) e o Typho americano (Rickettsiose endemica ou *minor*), ás quaes, com muita probabilidade, se identificariam.

CONCLUSÕES

I. Soros de convalescentes oriundos de casos de "Typho exanthematico" ou "Febre petechial" occorridos, sob forma endemica ou epidemica, em outros paises sul-americanos (Argentina, Chile, Bolivia), não manifestaram qualquer poder protector relativamente á infecção experimental pelo virus do "Typho exanthematico de S. Paulo" (Rickettsiose neotropica), que occorre no Brasil (grupo III da classificação de Amaral e Monteiro).

II. Os casos de onde provieram os soros estudados filiar-se-iam, muito provavelmente, ao grupo IV da mesma classificação, no qual se incluem o Typho exanthematico classico ou europeu (Rickettsiose epidemica) e o Typho americano ou endemico (Rickettsiose endemica).

ABSTRACT

Testing the protective power of a few samples of sera secured from convalescents of typhus or petechial fever in Argentina, Chili and Bolivia, against the experimental S. Paulo spotted fever has yielded results that seem further to justify the separation of these diseases into 2 different groups. One of these groups should include the petechial fever besides the European or epidemic typhus and the American or endemic typhus; the other should include the S. Paulo spotted fever besides the known types of Rocky Mountain spotted fever.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Ensaio de classificação das Rickettsioses á luz dos nossos actuaes conhecimentos. Memorias do Inst. Butantan VII:343.1932.
2. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Histoire naturelle et classification des Rickettsioses. Position systématique du «Typhus exanthématique de S. Paulo». Rev. Sud-Amér. de Méd. et Chir. IV(11):781.1933.
3. *Parker, R. R. & Davis, G. E.* — Protective Value of Convalescent Sera of São Paulo Exanthematic Typhus Against Virus of Rocky Mountain Spotted Fever. Publ. Health Rep. XLVIII(19):501.1933.
4. *Parker, R. R. & Davis, G. E.* — Further Studies on the Relationship of the Viruses of Rocky Mountain Spotted Fever and S. Paulo Exanthematic Typhus. Publ. Health Rep. XIVIII(21):839.1933.
5. *Davis, G. E. & Parker, R. R.* — Additional Studies on the Relationship of the Viruses of Rocky Mountain Spotted Fever and S. Paulo Exanthematic Typhus. Publ. Health Rep.
6. *Dyer, R. E.* — Relationship Between Rocky Mountain Spotted Fever and exanthematic Typhus of S. Paulo. Publ. Health Rep. XLVIII(20):521.1933.
7. *Monteiro, J. Lemos* — O «Typho exanthematico de S. Paulo» e suas relações com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, á luz das provas de immunidade cruzada. Brasil-Medico XLVII(25):437.1933; Bull. Soc. Med. e Cir. S. Paulo XVII(1-2-3-4):55.1933.
8. *Monteiro, J. Lemos* — Vaccina contra o «Typho exanthematico de S. Paulo». Novas correlações entre esta infecção e a Febre maculosa das Montanhas Rochosas. Memorias do Inst. Butantan VIII: .1933.

9. *Monteiro, J. Lemos* — Étude comparative du «Typhus exanthématique de São Paulo» (Rickettsiose néotropique) et du «Typhus exanthématique» d'autres lieux, basée sur l'épreuve de protection par le sérum de convalescent. C. R. Soc. Biol. CXV(12):1360.1934.

10. *Monteiro, J. Lemos* — Étude comparative entre le «Typhus exanthématique de São Paulo» (Rickettsiose néotropique) et le «Typhus exanthématique du Chili» (Rickettsiose épidémique) par l'épreuve de protection avec des sérums de convalescents. C. R. Soc. Biol. CXVI(26):1131.1934.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado em outubro de 1934. Dado á publicidade em dezembro de 1934).

O "TYPHO EXANTHEMATICO DE S. PAULO" E SUAS RELAÇÕES COM A FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS, Á LUZ DAS PROVAS DE IMMUNIDADE CRUZADA

POR

J. LEMOS MONTEIRO

614.526

O "TYPHO EXANTHEMATICO DE S. PAULO" E SUAS RELAÇÕES COM A FEBRE MACULOSA DAS MONTANHAS ROCHOSAS, Á LUZ DAS PROVAS DE IMMUNIDADE CRUZADA

POR

J. LEMOS MONTEIRO

Um dos problemas de pathologia humana que mais têm preoccupado, nestes ultimos tempos, a attenção dos experimentadores, muito especialmente em S. Paulo, é o da modalidade da febre exanthematica que surgiu na capital do nosso Estado e que foi denominada de "typho exanthematico de S. Paulo".

Da nossa parte, como de outros companheiros de trabalho em Butantan e alguns collegas de S. Paulo, não têm sido poupados esforços e mesmo sacrificios para sua elucidação sob o ponto de vista experimental, etiologico, epidemiologico, clinico e anatomo-pathologico.

Os resultados deste esforço perseverante, condensados já numa série de numerosos trabalhos publicados, necessitavam, porém, para nos levar a conclusões mais seguras, da collaboração dos experimentadores de outros paises, onde as differentes formas affins de rickettsioses são tambem estudadas e com as quaes fossem feitos certos estudos comparativos. Neste proposito, desejamos, desde logo, salientar esta collaboração que nos foi prestada pelos illustres experimentadores norte-americanos, R. E. Dyer, do National Institute of Health, de Washington e R. R. Parker, do Rocky Mountain Spotted Fever Laboratory de Hamilton, ambos do U. S. Public Health Service.

A elles enviámos, por via aerea, soros de animaes (macacos, cobaias e coelhos) immunizados, para que fossem realizadas as provas de protecção, assim como exemplares de carrapatos (*Amblyomma cajennense*), infectados com o nosso virus, para que pudessem, por sua vez, isolal-o, por simples picada ou inoculação, naquelles laboratorios norte-americanos.

Tanto Dyer como Parker, por communicação epistolar que nos fizeram, conseguiram o virus, infectando cobaias com os carrapatos que enviámos, trazendo assim nova confirmação aos resultados de transmissão experimental realizados em Butantan.

Por sua vez, retribuindo a remessa do nosso material, Parker enviou-nos, gentilmente, um lote de *Dermacentor andersoni* infectados com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, para que tambem pudessemos realizar aqui os estudos experimentaes comparativos que tanto nos interessavam (*).

Pusemos parte desse precioso material á disposição de collegas que, entre nós, se interessam mais directamente pelo assumpto, e iniciámos, como fazem Dyer e Parker nos Estados Unidos, nossos estudos pelo isolamento, dos carrapatos enviados, do virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Nesta nota desejamos, apenas, consignar os primeiros resultados de algumas experiencias já feitas de immunização cruzada e o fazemos desde logo, em virtude do seu interesse e importancia para a elucidação do problema do nosso "typhus" e teceremos sobre elles alguns commentarios.

Isolamento do virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas

Os carrapatos (*Dermacentor andersoni*) foram divididos em lotes de 5 e 6 exemplares. Um lote (com 5 exemplares) foi posto a sugar numa cobaia, permanecendo durante 4 dias; no fim deste tempo, 4 exemplares estavam ainda seguros, sendo retirados. Destes, 1 foi conservado para inoculação após maior prazo, 2 foram emulsionados e inoculados em 2 cobaias e 1 foi fixado para inclusão e cortes. Outro lote (com 5 exemplares) foi collocado na estufa durante 24 horas, em seguida emulsionado (sempre depois de convenientemente lavado) e inoculado em 2 cobaias.

Os resultados destas experiencias não serão agora tratados com maiores minucias, assim como as feitas com os outros lotes. Apenas relataremos os que interessam ao fim desta ligeira nota e que são os seguintes: *Cobaia* 1056. — Inoculada em 9. V. 33 com 1 cc. de emulsão (em 2,5 cc. de agua physiologica) de 2 *Dermacentor andersoni* infectados após se terem alimentado durante 4 dias na cobaia 1049. Foi a seguinte a evolução da infecção: após incubação de 3 dias, reacção febril durante 3 dias (40°,0; 39°,8; 40°,4.) Com esta ultima temperatura, 6 dias após a inoculação, foi sangrada e o sangue, emulsão testicular e emulsão de cerebro inoculados em outras cobaias normaes, assim como em 3 cobaias immunizadas, em differentes periodos, contra o "typho exanthematico de S. Paulo", correspondentes á 1.ª série de provas.

As cobaias normaes inoculadas com o material infectante para passagens do virus e como testemunhas tiveram, em geral, infecção caracteristica ou atypica, porém devidamente comprovada.

(*) Devemos aqui agradecer tambem ao dr. R. R. Parker a remessa de 3 tubos com vaccina contra a febre maculosa, que tem occasionado victimas entre os homens de laboratorio, para que nos immunizassemos e aos nossos auxiliares immediatos.

Registemos, resumidamente, apenas os protocollos das cobaias que nos serviram para o isolamento do virus da febre maculosa e que, por sua vez, o forneceram para as provas de immunização cruzada que relataremos em seguida.

Cobaia 1072 (*testemunha*). — De pequeno porte, pesando cerca de 200 gms., foi, apesar disto, inoculada com 1 cc. de sangue da cobaia 1056. Não apresentou reacção acima de 38°,6. no 4.° dia e no 5.° amanheceu mal, prestes a morrer, sendo sacrificada. Pela necropsia, exames feitos e prova de passagem, observou-se uma evolução atypica da infecção, facto que, portanto, se verifica com o virus da febre maculosa, em certas condições ligadas a uma menor resistencia ou estado de carencia do animal. A infecção se confirma, entre outros dados, pelo augmento do baço, exsudato peritoneal (encontrado nestas formas atypicas), presença, em numero consideravel, de Rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal, e pela passagem do virus para outra cobaia, que teve evolução typica da infecção, como se vê pelo protocollo seguinte.

Cobaia 1087. — Inoculada com emulsão de testiculo e baço da cobaia 1072. A evolução foi a seguinte: 38°,5, temperatura no dia da inoculação; 39° 1; 40°0; 39°8; 40°0; 40°0 com reacção escrotal e phenomenos hemorrhagicos; 38° 5; amanheceu morta em 27.V.33.

Para as outras series das provas de immunização cruzada, o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas usado foi obtido do modo que expomos a seguir:

Cobaia 1084 — Inoculada com 1 cc. de emulsão (em 2 cc. de agua physiologica após lavagem conveniente) de 1 *Dermacentor andersoni* infectado e que, 10 dias antes, se havia alimentado na cobaia 1049. (Uma outra cobaia, No. 1085, foi inoculada com o restante da emulsão e teve tambem infecção typica. com a seguinte evolução: 38°4, dia da inoculação; 39°0; 38°9; 40°0; 39°8; 39° 8; 40° 5, com reacção escrotal intensa, com phenomenos hemorrhagicos; 39° 0; amanheceu morta em 27.V.33, sendo feita passagem do virus para outra cobaia). A cobaia 1084, que interessa agora, teve a seguinte evolução thermica: 1.° dia, 38°4 (inoculação); 2.°, 39°0; 3.°, 38°8; 4.°, 39°0; 5.°, 40°0, quando foi sangrada e sacrificada. Embora somente no 1.° dia de reacção febril verifica-se, á necropsia, augmento accentuado do baço; nas cellulas mesotheliaes do peritoneo encontram-se raras rickettsias. Orgãos diversos foram fixados. Como a quantidade de sangue obtido não tivesse sido sufficiente para a inoculação das 4 cobaias immunizadas (2.ª série), das 4 vaccinadas com a vaccina preparada com *Amblyomma cajennense* infectados com o nosso virus (3.ª serie), assim como 3 testemunhas, preparámos uma emulsão, em 25 cc. de agua physiologica, constituida de sangue desfibrinado (3 cc.), testiculo (1/2), baço (1/3) e cerebro (¼), da qual foi inoculada a dose de 2 cc. em cada animal. As testemunhas apresentaram infecção caracteristica. Mostremos apenas a evolução de uma dellas:

Cobaia 1093. — Inoculada em 23.V.33 com 2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084. A evolução da infecção foi a seguinte; temperatura no dia da inoculação 38° 3; nos dias seguintes: 38° 0; 39° 6; 40° 0; 40° 5; 40° 0; 39° 6; 39° 5. A cobaia apresentou reacção escrotal. Em 31. V. 33 foi sacrificada, comprovando-se infecção typica, sendo colhido material para exame histologico e feita nova passagem do virus.

Immunização cruzada

Esta prova foi realizada em 3 séries de experiencias, com relação a 7 cobaias immunizadas seguramente com o typho de São Paulo e a 4 cobaias inoculadas com uma vaccina que preparamos com *Amblyomma cajennense* infectados com o nosso virus.

Os primeiros resultados podem ser assim resumidos:

1.ª Série: *Cobaia 914* — Soffreu a 1.ª inoculação do virus de S. Paulo em 25.XI.32 (2 cc. de sangue da cobaia 906); 2.ª inoculação em 5.I.33 (emulsão de cerebro da cobaia 937), não reagindo, mostrando-se immunizada. Em 15.V.33 foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas (2 cc. de sangue da cobaia 1056). Não apresentou reacção alguma, a temperatura não sahindo da media normal (38° 0; 38° 5 e maxima de 38° 8) durante uma observação já de 15 dias.

Cobaia 986 — Foi inoculada com o virus (emulsão de cerebro da cobaia 974) em 23.III.33; apresentou, após 3 dias de incubação, reacção typica, febril, durante 6 dias, resistindo. Foi novamente inoculada com o nosso virus (proveniente de carrapato *Ambly.* Lote IXa, 4a. passagem) em 18.IV.33, mostrando-se immunizada. Em 15.V.33, foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas (2 cc. de sangue da cobaia 1056). Não apresentou reacção alguma, o maximo da temperatura foi de 39° 2, num dia, durante uma observação já de 15 dias.

Cobaia 1022 — Foi inoculada, em 25.IV.33, por via subcutanea, com emulsão de cerca de 20 ovos de 1 *Amblyomma cajennense* infectada. Este carrapato foi alimentado novamente após a infecção por picada em cobaia doente e desovou 30 dias após a primeira alimentação, infectante, e 10 dias após a segunda alimentação. A cobaia teve infecção caracteristica: incubação de 4 dias, reacção febril durante 5 dias (com passagem positiva do sangue) e resistiu. Em 15.V.33 foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas (2 cc. de sangue da cobaia 1056). Da mesma forma nenhuma reacção apresentou, a temperatura maxima foi de 39° 0, mostrando-se immunizada.

2.ª Serie: *Cobaia 988* — Foi inoculada em 27.III.33 com emulsão de 1 *Amblyomma cajennense* ♀ (Lote IX), infectado 11 dias antes. Não apresen-

tou reacção typica, pelo que em 2.V.33 foi inoculada com o nosso virus (emul. de cerebro da cobaia 1024), não reagindo e mostrando-se immunizada. Em 23.V.33 foi inoculada com o virus da febre maculosa (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084), contra o qual tambem se mostrou immunizada, não apresentando até hoje reacção febril (1.VI.33).

Cobaia 989 — Inoculada em 27.III.33 com pequena quantidade de material oriundo da excreção de 1 *Amblyomma cajennense* infectado (Lote VI) 23 dias antes. Não apresentou reacção febril acima de 39°2 e foi inoculada novamente, em 2.V.33, com o virus (emulsão de cerebro da cobaia 1024), não reagindo da mesma forma, mostrando-se immunizada. Em 23.V.33 foi inoculada com o virus da febre maculosa (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084), não apresentando reacção febril e estando, portanto, immune tambem a este virus.

Cobaia 996 — Inoculada em 3.IV.33 com emulsão de 1 *Amblyomma cajennense* ♀ (Lote X) infectada 18 dias antes. Após incubação de 2 dias, apresentou reacção febril caracteristica durante 6 dias, resistindo, porém, á infecção e voltando a temperatura á media normal. Em 2.V.33 foi reinoculada com o virus de passagem (emul. de cerebro da cobaia 1024), não reagindo, o que confirmou a sua immunidade após a primeira infecção com o virus do *Amblyomma*. Em 23.V.33 foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas (2 cc. de emulsão do virus da cobaia 1084), contra o qual tambem se mostrou immunizada, nenhuma reacção apresentando até hoje.

Cobaia 1053 — Inoculada em 2.V.33 com sangue da cobaia 1026 (virus de *Amblyomma*, Lote XIII, da 2.ª passagem). Após incubação de 5 dias, apresentou reacção febril caracteristica (com passagem positiva do sangue) durante 4 dias, resistindo á infecção. Em 23.V.33 foi inoculada com o virus da febre maculosa (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084), não reagindo até esta data, mostrando-se, pois, immunizada.

3.ª Serie: Consta de 4 cobaias que foram vaccinadas, 2 com 1 dose e 2 com 2 doses, com uma vaccina que preparamos, utilizando *Amblyomma cajennense* infectados com o virus do "typho" de São Paulo. Esta vaccina demonstrou possuir valor antigenico, uma só dose immunizando a cobaia contra o nosso virus, o que melhor mostraremos em outro trabalho, onde daremos a technica que empregamos para o seu preparo.

Os resultados desta serie foram os seguintes:

Cobaia 1029 — Tomou a 1.ª dose de 0,5 cc. da vaccina preparada com *Amblyomma* (Lote XIII) em 28.IV.33; a 2.ª dose de 2 cc. em 5.V.33. Não apresentou reacção e 18 dias após foi inoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084). Não apresentou até esta data reacção febril, a temperatura mais elevada foi de 39°0, num dia, podendo ser considerada como immune em relação ao virus inoculado,

maximé si se levar em conta o resultado com as testemunhas que tiveram infecção caracteristica, como se viu com a cobaia 1093, já assignalada.

Cobaia 1031. — Como a 1029, sendo, porém, a 1.ª dose da vaccina de 1 cc. e a 2.ª de 2 cc. Após 18 dias foi inoculada com o virus da febre maculosa (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084). Da mesma forma, não apresentou reacção febril, mostrando-se immune em relação ao virus inoculado.

Cobaia 1041. — Tomou 1 só dose da vaccina em 5.V.33 e 18 dias após foi inoculada com o virus da febre maculosa (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084). Tambem não apresentou, até esta data, reacção febril, resistindo ao virus inoculado.

Cobaia 1042. — Como a 1041, sendo após 18 dias da vaccinação innoculada com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas (2 cc. de emulsão de virus da cobaia 1084). A cobaia não apresentou reacção, porém amanheceu morta em 28.V.33. A necropsia foi somente feita no dia seguinte, não podendo, pois, ser aproveitado material para passagem. Verificou-se, em todo caso, que o baço apresentava tamanho normal, nada indicando ter sido a morte devida ao virus inoculado.

Verifica-se, portanto, que cobaias seguramente immunizadas em relação ao virus do "typho" de S. Paulo, após terem recebido uma ou mais inoculações, mostram-se tambem immunes relativamente ao da febre maculosa das Montanhas Rochosas, injectado posteriormente, decorridos periodos variaveis de tempo, até mesmo após mais de 4 meses da ultima inoculação do primeiro virus. O mesmo se verificou com 4 cobaias vaccinadas contra o nosso virus (vaccina preparada com *Amblyomma cajennense* infectados) e reinoculadas, 18 dias depois, com o da febre maculosa.

DISCUSSÃO

Os resultados acima mostram que os animaes immunes relativamente á febre exanthematica que tem surgido em São Paulo, o são tambem em relação ao virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas, nas condições experimentaes descriptas.

Nos nossos estudos sobre o typho exanthematico de S. Paulo, desenvolvidos com maior minucia em trabalho publicado no tomo VI das "Memorias do Instituto Butantan", mostrámos que, pelos aspectos estudados, a infecção não se parecia filiar ao grupo que tem como typo o typho exanthematico classico, do velho mundo, onde se collocam outras modalidades, entre as quaes o typho endemico (do Mexico, Estados Unidos, etc.). Num quadro indicámos as principaes differenças experimentaes entre estas infecções.

Por outro lado, deixámos sempre accentuado que, relativamente ao comportamento experimental e outros caracteres dos respectivos virus, a nossa infecção apresentava maiores affinidades com a febre maculosa das Montanhas Rochosas.

As provas de immunidade cruzada agora realizadas entre nós e na America do Norte trazem novo contingente a estas affinidades com esse grupo, que tem como typo a febre maculosa das Montanhas Rochosas, ao qual se filiam tambem a forma este desta ultima infecção, a "febre botonosa" e outras.

No nosso trabalho (1) dissemos, relativamente ao typho exanthematico de S. Paulo, que "embora não se possa ainda concluir em definitivo, parecem maiores suas relações com o grupo da febre maculosa das Montanhas Rochosas, constituindo, talvez, uma nova modalidade da infecção" e, "até que novos estudos sejam emprehendidos, os *corpusculos de Mooser*, que melhor se denominariam *Rickettsia mooseri*, deverão considerar-se distinctos da *Rickettsia brasiliensis*, responsavel pelo typho exanthematico de S. Paulo. O mesmo poder-se-á dizer, embora maiores suas affinidades, em relação á *Rickettsia rickettsi* Wolbach, responsavel pela rickettsiose das Montanhas Rochosas, assim como em relação ás outras especies descriptas, pertencentes ao genero creado pelo prof. Rocha Lima e responsaveis por outras rickettsioses".

Entre esses novos estudos, estão agora incluidas as provas de immunização cruzada.

E' assumpto em ordem do dia em sciencia a importancia que esta prova possa ter como elemento decisivo para a distincção de infecções de certos grupos, principalmente quando causadas por "virus". E' o caso do grupo variolico, ligado aos Chlamydozoarios, e do grupo das febres exanthematicas, ligado ás Rickettsias.

Relativamente ás rickettsioses, numa das suas divisões, o grupo do "typhus", apesar de ser positiva, sob certos aspectos, a prova de immunização cruzada entre duas importantes das suas modalidades clinicas, como o typho exanthematico classico ou epidemico e o typho americano ou endemico, a distincção entre ellas é acceita por muitos experimentadores, entre os quaes se colloca, agora, Charles Nicolle. Em estudo a respeito, Nicolle e Laigret (2) focalizam o assumpto de um modo experimental e acham que a prova deve ser feita sob certo criterio quanto á antiguidade da immunidade, concluindo que, por ella, os virus dessas infecções são vizinhos, o que, porém, não demonstra que sejam identicos. Tambem, mais recentemente, o assumpto foi debatido por Ricardo Jorge (3), em communicação ao Comité permanente do Office International d'Hygiène Publique, da Liga das Nações, que diz: "o criterio da immunidade cruzada prova que os dois virus são da mesma familia: um protege contra o outro. Deduzir dahi da sua identidade de natureza absoluta, é muito arriscado: *o cow-pox* protege contra o *small-pox* e reciprocamente, e entretanto as duas modalidades não se confundem".

Portanto, a prova de immunidade cruzada seria util somente para distincção dos dois grupos e não das suas infecções componentes.

Si no caso dos typhos epidemico e endemico este modo de pensar, sobre a relatividade da prova de immunização cruzada, nos parece justificado, visto se possuirem outros elementos (de natureza experimental, epidemiologica e histopathologica) para a distincção das infecções, o mesmo talvez occorra quanto ao grupo da febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Nestas condições e diante dos novos factos experimentaes trazidos pelas provas de immunização cruzada e com as quaes concordam as realizadas por Dyer e Parker, devemos considerar realmente a febre exanthematica que surgiu em S. Paulo (typho exanthematico de S. Paulo) (*1) como uma infecção do grupo da febre maculosa das Montanhas Rochosas, sinão muito proxima á propria infecção typo, na sua forma mais grave (typo oeste), pelo menos, e com mais razão, uma das suas modalidades nosologicas.

Este ultimo modo de ver, sobre ser o nosso "typho" uma variedade do grupo da febre maculosa, parece-nos mais acertado. Desta opinião já nos haviamos manifestado em palestra feita numa das reuniões semanaes no nosso Instituto e está consignado em trabalho que A. do Amaral e nós elaborámos (5) e onde fizemos um estudo geral sobre as differentes febres exanthematicas e procurámos classifical-as convenientemente, de accordo com os estudos ultimamente realizados em diversos paizes.

O "typho de S. Paulo", portanto, pertenceria a esse grupo, em virtude de provas valiosas, entre as quaes, agora, se junta a de immunização cruzada, que o desliga do grupo do "typhus" (*2). Seria, porém, uma variedade nosologica, porque entre elle e a infecção typo existem certos elementos differenciaes que, segundo pensamos, autorizam essa separação parcial.

Como variedade do mesmo grupo, tambem consideramos a forma Este da febre maculosa, que se distinguiria da forma typo, apesar da prova de immunidade cruzada, pelo caracter clinico e experimental mais benigno e por certas lesões histologicas ainda recentemente postas em evidencia por Harris (6).

(*1) Esta designação refere-se á febre exanthematica que surgiu em S. Paulo, em zonas de preferencia de aspecto rural, objecto já de numerosos estudos. Não é improvavel, em todo caso, a existencia, entre nós, de outras modalidades das febres exanthematicas, do grupo do «typhus», a se julgar pelos resultados, que, com F. da Fonseca, já publicamos (4), relativos a um outro virus isolado de ratos da zona urbana da cidade e que, immunologicamente, tambem differe do que agora estudamos e estamos comparando com a febre maculosa.

(*2) Em carta, recebida ha poucos dias, Dyer nos communicou seus primeiros resultados sobre a immunização cruzada com a febre maculosa e com o «typhus» e que concordam, no primeiro caso, com os que assignalamos. Assim se manifestou a respeito: «Guinea-pigs recovered from typhus fever are not immune. A recovered spotted fever monkey has also been found immune to your virus».

Vejamos, rapidamente, a possivel differenciação da variedade de S. Paulo.

Sob o ponto de vista clinico, Piza (7), reconhecendo que mais se approxima da febre maculosa, poude affirmar, embora sem concluir em definitivo, "que o mal que aqui appareceu não se enquadra perfeitamente em nenhuma das febres typho-exanthematicas conhecidas, desde que se leve em conta a molestia experimental, em cobaia, e o aspecto histo-pathologico do material humano".

Experimentalmente, si a pathogenicidade dos virus das duas infecções se mostra igualmente elevada, verifica-se com a nossa uma menor proporção de reacção escrotal e, portanto, uma menor constancia dos phenomenos hemorrhagicos para o lado da bolsa escrotal (*), como já assignalámos (1 e 8), assim como L. Salles Gomes (7).

Histo-pathologicamente, as principaes alterações que caracterizam a infecção de S. Paulo foram evidenciadas por J. Meyer (7) e um estudo comparativo, de natureza experimental, se impõe para melhor elucidação de possiveis elementos differenciaes.

Ainda se poderia considerar o aspecto epidemiologico, baseado na diversidade do transmissor intermediario. Esta diversidade talvez modifique biologicamente o agente infectuoso, embora as especies de Ixodideos possam transmittir experimentalmente ambos os virus. O da febre maculosa das Montanhas Rochosas, segundo nos communicou R. R. Parker, pode ser transmittido pelo *Amblyomma cajennense,* o que é de grande importancia para os Estados Unidos, onde este carrapato tambem existe. Este auctor prometteu-nos verificar si o *Dermacentor andersoni* pode, por sua vez, transmittir o virus da febre de S. Paulo.

Poder-se-ão ainda considerar como elemento de differenciação as reacções sorologicas. Pela reacção de Weil-Felix, praticada com os differentes typos de *Proteus* X, A. Felix (9) considera o typho de S. Paulo uma nova variedade sorologica. Ha, além disso, interesse em se verificarem as relações do *Proteus* XL, de Carvalho Lima (10), que antigenicamente melhor corresponderia ao typho de S. Paulo, com a febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Será, finalmente, necessario estudar immunologicamente as infecções deste grupo, de accordo com o criterio estabelecido por Nicolle e Laigret (2) para as infecções do grupo do "typhus" e tambem realizar a prova de immunização cruzada sob um criterio quantitativo, isto é, quanto ás doses minimas infectantes dos virus respectivos, assim como provas de protecção com os respectivos soros

(*) Em algumas passagens com o virus da febre maculosa, que já praticámos, inoculando-o por via subcutanea, não observámos reacção escrotal, ao contrario do que suppunhamos.

immunes (*) e outras que nos dariam os detalhes e nuanças immunologicos, como a reacção do desvio do complemento (estudo que já iniciámos com J. Travassos) etc., pelos quaes se distinguiriam as infecções componentes de cada grupo da familia exanthematica ou rickettsioses.

RESUMO E CONCLUSÕES

Um estudo feito com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas comparativamente com o virus da febre exanthematica de S. Paulo mostrou a existencia de estreitas relações immunologicas entre os dois, pelas provas de immunização cruzada. Aquelle virus foi conseguido graças á gentileza dos drs. R. E. Dyer, do National Institute of Health e R. R. Parker, do Rocky Mountain Spotted Fever Laboratory, de Hamilton, tendo o ultimo remettido um lote de carrapatos (*Dermacentor andersoni*) infectados, o que tornou possivel o seu isolamento e estudo entre nós.

As provas de immunização cruzada foram feitas numa serie de cobaias immunizadas contra o "typho exanthematico de S. Paulo, e cobaias previamente inoculadas com uma vaccina preparada com carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados com o nosso virus e contra o qual se mostra efficaz preventivamente.

Os resultados obtidos foram discutidos á luz dos modernos conhecimentos sobre as febres exanthematicas, sendo as seguintes as conclusões:

1. Cobaias immunizadas contra a febre exanthematica que surgiu em S. Paulo (typho exanthematico de S. Paulo), mostram-se tambem immunes em relação á febre maculosa das Montanhas Rochosas, não reagindo quando inoculadas com o virus desta ultima, oriundo de *Dermacentor andersoni*, infectados.

2. Cobaias vaccinadas contra o virus de S. Paulo, por meio de uma vaccina preparada com carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados, não reagem

---

(*) A este respeito, Parker, fez alguns ensaios cujos resultados teve a gentileza de nos communicar e que transcrevemos no seguinte trecho de uma das suas cartas: «I am certainly very grateful for your kindness in sending the infected specimens of *Amblyomma cajennense* and the additional sera. These materials arrived today and your letter of the 22nd arrived yesterday.

All the female ticks were alive and two of the males. They are already on guinea pigs for feeding. After discarding the broken, contaminated and otherwise non-usable serum samples from the lot previously sent me, we had six specimens left for test. One was of the rabbit taken 17 days after termination of fever, the other five were all guinea pig sera; one taken 15 days, two taken 2 days, and two taken 1 day after defervescence. You will doubtless be interested to learn that three of these samples gave complete protection. These included the 15 and 17 day sera. The fourth sample gave a very considerable degree of protection, the fifth and sixth, not so much, but very definite protective value was present in both».

quando inoculadas, alguns dias depois, com o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas.

3. Cobaias e macaco immunizados contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas mostram-se immunes em relação ao virus de S. Paulo, enquanto que cobaias immunizadas contra o typho exanthematico (typhus) não o são (resultado obtido e gentilmente communicado por R. E. Dyer).

4. O "typho exanthematico de S. Paulo" pertence ao grupo das febres exanthematicas que têm por typo a febre maculosa das Montanhas Rochosas, do qual constituiria, talvez, uma variedade.

ABSTRACT AND CONCLUSIONS

A comparative study made between the virus of the Rocky Mountain spotted fever and the virus of the "S. Paulo typhus" and based on cross immunity tests shows their close immunological relationship. The virus of the Rocky Mountain spotted fever was obtained through the kindness of dr. R. E. Dyer, of the National Institute of Health and dr. R. R. Parker, of the Rocky Mountain Spotted Fever Laboratory, Hamilton. From the latter was also received a lot of infected ticks (*Dermacentor andersoni*), which made possible the isolation and subsequent study of that virus in S. Paulo.

The cross immunity tests were made on a series of guinea-pigs immunized against the "S. Paulo typhus" and guinea-pigs previously inoculated with a bacterin prepared from ticks (*Amblyomma cajennense*) infected with the S. Paulo virus, against which it proves to be preventively efficacious.

The results of such tests are discussed in the light of our modern knowledge of the exanthematic fevers and seem to warrant the following conclusions:

1. Guinea-pigs immunized against the exanthematic fever that has appeared in S. Paulo (S. Paulo typhus) are found to be immune also in regard to the Rocky Mountain spotted fever since they do not react to an inoculation of the virus of the latter infection obtained from infected *Dermacentor andersoni*.

2. Guinea-pigs immunized against the S. Paulo virus by means of a bacterin prepared with infected ticks (*Amblyomma cajennense*) do not react when inoculated, some days later, with the virus of the Rocky Mountain spotted fever.

3. Guinea-pigs recovered from Rocky Mountain spotted fever are immune to the S. Paulo virus while typhus immune guinea-pigs are not immune; likewise, a recovered spotted fever monkey has been found immune to the S. Paulo virus, both of these observations having just been made by R. E. Dyer, as reported in a personal communication.

4. The "S. Paulo typhus", therefore, belongs in the group of exanthematic fevers whose type infection is the Rocky Mountain spotted fever, of which it may represent but a variety.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos* — Estudo sobre o typho exanthematico de S. Paulo — Mem. Inst. Butantan VI.1931.
2. *Nicolle, Ch. & Laigret, J.* — L'épreuve des immunités croisées dans les differents typhus (avec quelques considerations sur le mauvais emploi que l'on fait quelque fois de cette méthode) — Arch. Inst. Past. Tunis XXI (2) :251.1932.
3. *Jorge, Ricardo* — La famille typo-exanthématique — Off. Intern. d'Hyg. Publ. Bull. Mensuel XXV (2) :289.1933.
4. *Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da* — Sobre um virus isolado de ratos da zona urbana da cidade e suas relações com o do typho exanthematico de S. Paulo — Brasil Medico XLVI (50) :1029.1932.
5. *Amaral, A. do & Monteiro, J. Lemos* — Ensaio de classificação das Rickettsioses á luz de nossos actuaes conhecimentos — Mem. Inst. Butantan VII.1932.
6. *Harris, P. N.* — Histological study of a case of the Eastern type of Rocky Mountain spotted fever — Am. J. Path. IX (1) :91.1933.
7. *Piza, J T.; Meyer, J. R. & Salles Gomes L.* — Typho exanthematico de S. Paulo. 1932.
8. *Monteiro, J. Lemos* — Comportamento experimental do virus — Brasil Medico XVL (48) :1109.1931.
9. *Felix, A.* — The rabbit as experimental animal in the study of the typhus group of viruses — Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene XXVI (4) :365.1933.
10. *Lima, J. Carvalho* — Bacillo Proteus XL e typho exanthematico de S. Paulo. Brasil Medico XLVII (4) :64.1933.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan apresentado á Soc. Med. & Cir. S. Paulo, em I-VI-1933. Dado á publicidade *in* Bol. Soc. Med. & Cir. S. Paulo XVII:55.1933 *et* Brasil Medico XLVII(25):437.1933.)

A REACÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA DETERMINAÇÃO DE FOCOS E NO DIAGNOSTICO RETROSPECTIVO DA FEBRE AMARELLA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E J. TRAVASSOS

614.541:616.076

A REACÇÃO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO NA DETERMINAÇÃO DE FOCOS E NO DIAGNOSTICO RETROSPECTIVO DA FEBRE AMARELLA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E J. TRAVASSOS

Em publicações anteriores (1), descrevémos os resultados dos nossos estudos sobre a possibilidade do diagnostico retrospectivo da febre amarella por meio da reacção de fixação do complemento.

Na presente nota daremos os resultados de reacções praticadas em sôros de individuos suspeitos de febre amarella e provenientes de Santa-Cruz de la Sierra, capital do Departamento de Santa-Cruz na Bolivia. Estes soros nos foram enviados pelo dr. Salvador Mazza, chefe da "Missão de Estudos de Pathologia Regional", da Universidade de Buenos Ayres, que, por parte do governo da Provincia de Salta, Argentina, procedeu ás investigações de comprovação diagnostica *in loco,* estudando clinicamente os casos e colhendo o material necessario aos differentes exames.

A epidemia, em principios de 1932, alastrou-se entre os soldados do regimento boliviano "Colorados", victimando cerca de 60 % dos homens da tropa, propagando-se á população de Santa-Cruz e fazendo varias victimas. O presente foco do Departamento de Santa-Cruz attingiu principalmente a cidade de Santa-Cruz de la Sierra, extendendo-se ás provincias de Valle Grande e Cordillera, sendo de presumir que, antes de fevereiro de 1932 e já ha varios annos, reinasse a febre amarella sob a forma endemica em differentes zonas daquelle Departamento.

Segundo informações de Mazza (2), Santa-Cruz e circunvizinhanças parece já terem sido visitadas pela febre amarella anteriormente. Documentos datando de 1887 e que foram posteriormente publicados na "Revista del Instituto Medico Sucre" (N.° 60, julho 1932), referem a existencia do mal nessa epocha na população das Missões (Misiones), desde Santo Antonio de Parapeti até Muchiri, na provincia de Cordillera.

A doença, até então classificada sob a rubrica de *"ictericia grave de caracter epidemico"*, manifestou-se, segundo a descripção do dr. Mamerto Salas, medico do regimento "Colorados", do modo seguinte:" os doentes apresentavam febre alta de 39° a 40°, mal estar geral, cephaléa intensa, lingua saburrosa, dôr epigastrica com irradiações para o figado, vomitos frequentes em alguns casos e diarréa; em outros, myalgias do thorax e dos membros, pulso accelerado; seguia-se um segundo periodo apyretico com depauperamento accentuado, depressão mental e manifesta intolerancia gastrica. A maioria dos doentes melhorava definitivamente neste periodo, mas outros soffriam de hemorrhagias multiplas e abundantes: epistaxes, estomatorrhagias, hematémeses, melenas e, ainda, lhes apparecia uma sub-ictericia nas conjunctivas e na pelle. Em certos doentes, a urina revelava grande quantidade de albumina".

O material que nos foi enviado pelo dr. Mazza constava de sôros de doentes e de convalescentes e destinava-se ás provas de protecção de *Macacus rhesus* e fixação do complemento. A primeira prova não poude ser realizada neste Instituto por faltar actualmente o material adequado, tendo sido feita somente a prova de fixação do complemento nos 11 soros enviados.

Aquelle illustre collega, concomitantemente, enviou os sôros e material de necropsia ao Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, tendo tambem remettido soros ao dr. Nelson Davis, do laboratorio da Fundação Rockefeller, na Bahia, onde foram realizadas as provas de protecção em camondongos brancos. No Instituto Oswaldo Cruz, o dr. H. Aragão procedeu ás provas de agglutinação para *Leptospira ictero-hemorrhagiae* e os drs. Burle de Figueiredo e Magarinos Torres procederam ás verificações anatomo-pathologicas. Corroboraram as conclusões destes ultimos exames os professores Rocha Lima, do Instituto Biologico de S. Paulo, e Hoffmann, de Havana.

Todos os resultados foram concordes em firmar o diagnostico de febre amarella e é de notar que todas essas pesquisas foram effectuadas por esses diversos investigadores sem que soubessem dos resultados obtidos pelos demais, o que vem realçar o valor dessas differentes provas no diagnostico do mal amarillico.

A prova da reacção de fixação do complemento, por nós realizada, comportou-se egualmente a contento e a accentuamos por ser um meio de diagnostico recentemente estudado e ser esta a primeira vez que é chamada a prestar serviços no diagnostico da infecção e elucidação de um foco. (*)

(*) Recentemente, tivemos conhecimento do resumo, *in* Tropical Diseases Bulletin XXX(1):3.1933, de um trabalho de Soper, Frobisher, Kerr e Davis, onde são consignados os resultados por elles obtidos com as provas de reacção de fixação do complemento comparativamente com a de protecção em macaco *rhesus*, feitas depois de um surto epidemico occorrido em Magé e Santo Aleixo (Estado do Rio de Janeiro). Num total de 300 sôros colhidos na zona endemica obtiveram resultados positivos, com a fixação do complemento

Resumiremos agora a technica empregada, os resultados obtidos e faremos algumas considerações em torno do tempo optimo da sangria dos doentes em evolução do mal. Na nossa 2.ª nota publicada nas Memorias do Instituto do Butantan (1), expusemos a technica que empregámos nos nossos estudos sobre a reacção.

Como os nossos antigeneos, conservados no frigo, datassem de quasi 2 annos, antes de realizarmos as provas definitivas procedémos a um ensaio com soros, mantidos em stock, de antigos doentes de febre amarella, de *Silenus* (*Macacus*) *rhesus* sagrados 1 a 2 meses após a infecção e de individuos normaes, residentes na Bahia (Brasil) e de resultados positivos, anteriormente verificados.

O quadro No. 1 dá os resultados dessas investigações e os resultados anteriormente obtidos com esses mesmos soros, o que nos permittiu affirmar (3) que o antigeno amarillico preparado com figado de *rhesus* infectado conserva estaveis e, talvez, mesmo fortalecidas, suas propriedades fixadoras do complemento por um tempo relativamente longo (verificação após quasi 2 annos), em face de sôros especificos.

O quadro No. 2 reune os resultados obtidos com os 11 soros enviados.

Nesse quadro são assignalados apenas os resultados de: a) reacções por nós praticadas, embora outras tenham sido feitas pelo dr. S. Mazza com antigeno que lhe enviaramos; b) prova de protecção, quando tambem realizada com os referidos soros.

As informações clinicas que completam o quadro nos foram enviadas pelo dr. Mazza e os resultados das provas de protecção para camondongos brancos, realizadas pelo dr. Nelson Davis, foram transcriptas do trabalho do dr. Mazza (2).

---

em 42%, resultados muito approximados ao anteriormente por nós obtido (Mem. Inst. Butantan V:185.1930); isto serve para confirmar ainda a nossa asserção quanto á possivel immunização dos moradores em zonas endemicas, independente de infecção apparente e explicavel talvez pelo mechanismo já suggerido por um de nós (Mem. Inst. Butantan V:112.-1930).

Em 101 soros de pessoas residentes longe da zona de endemicidade, aquelles pesquisadores verificaram somente 3% de resultados positivos, o que concorda com os nossos estudos (0%) realizados com sôros de estrangeiros (japoneses) recem-chegados ao Brasil, podendo a pequena differença ser explicada pela inclusão fortuita de soros de pessoas immunes, anteriormente residentes em zona endemica.

Comparativamente com a prova de protecção em macaco, elles verificaram em regra, confirmando os resultados de nossas pesquisas anteriores, que os soros de reacção positiva davam protecção completa, apenas com uma discordancia de 13% favoravel a esta ultima prova. A prova de protecção, em todo caso, pode tambem falhar, como aconteceu em 1 caso, descripto pelos auctores, em que foi ella praticada com intervallos de meses, mostrando, ora completa protecção, ora ausencia de protecção e ora protecção incompleta.

QUADRO No. 1

SÔROS EXAMINADOS	ANTIGENO N.º 105 A preparado em 25/VII/30								ANTIGENO N.º 109A preparado em 27/4/32			
	Reacções em 30/VII/30 e 26/VIII/30				Reacções em 27/IV/32				Reacções em 27/IV/32			
	Leitura immedita		*Leitura após 24 hs.*		*Leitura immediata*		*Leitura após 24 hs.*		*Leitura immediata*		*Leitura após 24 hs.*	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
P. F. N. convalescente de febre amarella	4	4	4	4	4	4	4	4	—	—	—	—
Rio, caso extr. (27/I/30) não confirmado	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio, caso 91 (14/II/30)	4	3	3	2	4	4	4	3	4	4	3	2
Rio, caso 84 (19/II/30)	4	4	3	3	3	—	1	—	4	4	3	2
Rio, caso 62 (19/II/30)	±	0	0	0	1	2	0	±	2	1	±	0
Rio, caso 102 (4/II/30)	4	3	3	2	—	—	—	—	4	4	3	2
Rio, caso 32 (29/I/30)	4	4	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4
Bahia, caso 46	3	2	2	1	4	4	4	4	4	3	4	3
Bahia, caso 51	4	3	3	2	4	4	4	4	4	4	4	4
Bahia, caso 71	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4
Bahia, caso 92	4	3	3	2	4	4	4	3	4	4	4	4
Bahia, caso 67 ⊞	3	2	2	1	4	3	3	2	4	4	4	3
Rhesus 104 (11/VIII/30)	4	4	4	4	4	4	4	3	—	—	—	—
Rhesus 77 (13/XI/29)	4	4	4	3	4	4	4	4	—	—	—	—
Rhesus 121 (29/VIII/31)	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	4
Rhesus 112 (28/ 8/30)	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4
Rhesus 57 (17/X/29)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
Rhesus 32 (12/XI/29)	4	3	3	2	2	—	1	—	4	3	3	2
Rhesus 114 (18/VIII/00)	4	4	4	3	4	3	3	2	4	4	4	4
Rhesus 62 (6/VIII/29) ⊞	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4
Rhesus 122 (21/VIII/30)	3	2	2	1	3	3	1	2	4	4	2	3
Cobaia 654 — Typho exanthematico	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
Coelho 23 — Typho exanthematico	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
Rhesus 9 — Typho exanthematico	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0

4 = ++++ 2 = ++ ± = duvidoso
3 = +++ 1 = + 0 = negativo
⊞ = com estes sôros as reacções primitivas foram praticadas com o antigeno No. 102 A.
— = não foi feita a reacção

QUADRO No. 2

No. do soro	Informações clinicas e outros dados	*Reacção de fixação do complemento*		*Prova de protecção para camondongo branco*	OBSERVAÇÕES
		0.2 de soro	0.1 de soro		
2	J. M. C., de Santa-Cruz, clinicamente febre typhoide, Widal positivo a 1/200, pesquisa plasmodios negativa.	0	0	?	
3	C. C., de Valle Grande, sub-ictericia, 14 dias de doença, pesquisa Leptospira negativa, Plasmodio negativa.	++	++	?	
5	A. M., de Potosi, doente ha 5 dias, epistaxes, Plasmodio *vivax* no sangue.	0	0	?	
10	S. L. R., soldado chegado de Sucre, com 1 anno de residencia em Santa-Cruz. Sem dados clinicos. Pesquisa Plasmodio negativa.	+	+	Positiva	
11	J. A., de Comarapara (Valle Grande). Convalescente. Sem dados clinicos. Plasmodio negativa.	++++	++++	Positiva	
12	M. M., de Warnes (Santa-Cruz). Symptomas de ictericia grave. Internado a 15 de março, sangue colhido a 25 de abril. Plasmodio negativa.	+++	+++	Positiva	
14	D. A., recem-chegado de La Paz, ictericia grave, paralysia espastica dos membros. Entrado a 1 de abril, sangue colhido a 26 de abril; ainda doente com sub-ictericia e paralysia.	0	0	Negativa	
18	R. M., soldado, de Santa-Cruz, sem dados clinicos, convalescente. Plasmodio negativa.	++	+++	?	
19	M. E., civil, de Santa-Cruz, hemorrhagia, manchas petechiaes, ictericia, considerado paludico.	0	0	?	
20	H. H., civil, de Santa-Cruz, com ictericia, sem hemorrhagias, considerado paludico, Plasmodio negativa. Convalescente.	+	+	?	
21	F. V., civil, de Charagua, com ictericia, hemorrhagias, manchas petechiaes. Plasmodio negativa, Weil-Felix positiva a 1/200.	0	0	?	
Testemunhas					
Rhesus . . 103	Immunizados febre amarella	++++	++++		Sangrados após 30 dias
Rhesus . . 57		++++	++++		
Rhesus . . 9	Inoculados «typho exanthemaico de S. Paulo»	0	0		
Cobaia . . 471		0	0		

+ a ++++ = differentes graus de reacção
0 = resultado negativo
? = reacção não praticada ou de resultado não conhecido

As reacções variaram em graus, do positivo intenso ao fraco. E' de crer que os soros que mostravam resultados fracos tenham sido colhidos em periodos um tanto precoces, existindo os anticorpos fixadores em quantidade insufficiente para provocar o phenomeno da fixação total do complemento.

Pelas observações que temos colhido, os resultados mais intensos têm sido obtidos com soros de doentes sangrados a partir de 20 a 40 dias após a queda da temperatura. Não podemos, entretanto, precisar definitivamente o periodo optimo da sangria, por isso que não nos foi dado até agora acompanhar no homem, nas differentes phases da infecção, a evolução dos anticorpos fixadores do complemento. Nos *rhesus* infectados experimentalmente, sangrados entre 10 e 30 dias após a inoculação do virus, os resultados francamente positivos se mostram na porcentagem de 88,4% e nos sangrados entre 31 e 70 dias obtem-se 100 %, para depois decrescer a 36,3 % nos sangrados mais de um anno após a inoculação do virus. No homem, é de crer que a evolução dos anticorpos fixadores soffra a mesma marcha decrescente, para depois, talvez, se estabilizar, sob determinado teor (dependendo da propria infecção), conforme acontece com os anticorpos protectores, revelados pela immunidade adquirida.

Pelos dados que foi possivel colher, enviados pelo dr. Mazza, presume-se que o soro do doente 3, com resultado fraco (++), tenha sido colhido aos 14 dias da doença; o caso 11, francamente positivo (++++), na convalescença (?); o caso 12, positivo (+++), aos 40 dias; o caso 18, positivo fraco (++), na convalescença (?); quanto aos demais não temos outras informações. Seriam necessarios dados mais minuciosos a esse respeito para que ficasse esclarecido definitivamente o periodo optimo em que se deve praticar a sangria.

Em conclusão, a noção a tirar destes resultados, embora em numero reduzido, é que a reacção se presta sobretudo para o diagnostico retrospectivo da febre amarella, servindo como uma prova a mais para firmar o diagnostico desta infecção e elucidação de novos focos.

Um outro ponto para o qual queremos mais uma vez chamar a attenção é o da technica. Os elementos da reacção devem ser rigorosamente doseados e em especial o complemento que deve ser addicionado na dose optima, principalmente nos casos em que se presuma a presença de anticorpos em pequena quantidade, o que se verifica nas sangrias precoces. Nestes casos, a reacção deve ser ensaiada com o complemento addicionado na unidade complementar justa ou ligeiramente accrescida, pois só assim as reacções fracamente positivas poderão ser apreciadas. A leitura dos resultados deve ser feita em 2 tempos: 1.ª — 10 minutos após a hemolyse completa, no tubo testemunha do soro; 2.ª: — cerca de 8 a 10 horas de permanencia no *frigo*, não sendo conveniente prolongar em demasia essa segunda leitura.

A reacção bem executada pode dar informações de grande utilidade pratica.

RESUMO

A reacção de fixação do complemento effectuada em uma serie de soros de doentes de febre amarella provenientes de Santa-Cruz de la Sierra, Bolivia, deu resultados que variaram em graus do fraco ao forte e pareciam estar na dependencia do teor de anticorpos fixadores presentes no sangue por occasião da sangria. Conforme se deduz das observações já colhidas, as reacções mais accentuadas se verificam a partir dos 20 a 40 dias após a queda da temperatura, não tendo sido, entretanto, até agora estabelecido definitivamente esse ponto optimo, ponto em que os anticorpos amarillicos fixadores do complemento se encontrem mais abundantemente no sangue. Provavelmente o inicio de sua formação se processaria desde o final da infecção, elevando-se na convalescença, attingindo um maximo, para depois decrescer, como acontece nos *rhesus* e estabilizando-se talvez sob terminado teor, conforme occorre com os anticorpos protectores, indice verificavel da immunidade adquirida pelo individuo. Este modo de ver justifica-se pela percentagem de resultados positivos obtidos com soros de individuos residentes em zonas onde o mal se tem mostrado endemico.

Os resultados da reacção de fixação do complemento com os soros examinados concordaram, em geral, com os da prova de protecção, servindo a reacção como um meio para o diagnostico retrospectivo da febre amarella e tambem para a elucidação de novos focos da infecção.

Na realização daquella prova deve-se dar especial attenção ao doseamento dos elementos que entram na reacção, especialmente o complemento, que deve ser addicionado na dose justa, sobretudo nos casos de doentes cujo soro tenha sido colhido nos primeiros dias após a queda da temperatura, nos quaes o teor de anticorpos é quasi sempre pequeno.

ABSTRACT

Complement fixation reaction performed in a series of sera of yellow fever patients from Santa-Cruz de la Sierra, Bolivia, yielded results varying from weakly positive to highly positive apparently depending on the rate at which the especific antibodies were present in the blood at the bleeding time.

The reactions appear to be more marked with sera taken after 20 to 40 days since the drop of temperature; the optimun period for bleeding, however, has not yet been established.

Probably such antibodies begin their appearance since the end of the fever itself and raise during the convalescence, first reaching a maximum only to decrease afterwards and become stabilized at a certain rate as found with the

protecting antibodies which serve as an indication for acquired immunity. This opinion seems to be justified by the percentage of positive reactions obtained with sera of persons living in localities where yellow fever has been endemic.

The results of the complement fixation reaction performed with the 11 samples of sera received from Santa-Cruz de la Sierra, Bolivia, through Dr. S. Mazza, of Buenos Aires, agreed in general with those of the protection tests independently conducted by Dr. N. Davis, at his laboratory, in Bahia. Therefore, that reaction may be used as a means both of establishing the retrospective diagnosis of yellow fever and of tracing new foci of this infection.

The complement fixation reaction must be conscientiously performed especial attention been given to all of the elements used, particulary the complement, which must be added in the right dose. This precaution is essential in dealing with sera that have been secured during the first days following the drop of temperature, when the rate of antibodies is still low.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Monteiro, J. Lemos & J. Travassos* — C. R. Soc. Biol. CIV (21):697.1930; Brasil-Medico XLV (12):288.1931; Sexta Reunion Soc. Arg. Path. Reg. del Norte, Salta, Oct. 1930; Mem. Inst. Butantan V:173.1930.
2. *Mazza, Salvador* — Univ. Buenos Ayres, Mision de Estudios de Pat. Reg. Arg., Jujuy, Publicación No. 9, 1932.
3. *Monteiro, J. Lemos & J. Travassos* — Brasil-Medico XLVI(27):597.1932.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado á 4.a Reunião da Assoc. Med. Pan-Americana (Dallas, Estados Unidos) em março de 1933 e á Soc. Med. & Cir. S. Paulo, em I-VI de 1933. Dado á publicidade *in* Bol. Soc. Med & Cir. S. Paulo XVII:14. 1933 *et* Brasil Medico XLVII (17):298.1933).

ESTUDO
EXPERIMENTAL SOBRE TOXINA ESTAPHYLOCOCCICA

POR

J. TRAVASSOS

(com 4 gravuras, 1 graphico e 42 quadros no texto)

589.93

ESTUDO
EXPERIMENTAL SOBRE TOXINA ESTAPHYLOCOCCICA

POR

J. TRAVASSOS

Breve historico.

I — Preparação da toxina *in vitro*.

II — Poder toxico: *a*) acção erythrocytolytica; *b*) acção leucocytolytica; *c*) outras acções cytolyticas; *d*) acção necrosante; *e*) acção coagulante do plasma e acção fibrinolytica; *f*) acção mortal; *g*) acção tetanizante; *h*) acção gastro-intestinal.

III — Unidade versus pluralidade de principios activos.
Relação quantitativa entre as varias acções toxicas.

IV — Propriedades geraes: resistencia ao calor, á luz, ao envelhecimento; acção dos acidos do alcool e do formol; adsorpção pelo caolim e pelo alume; filtração, concentração e deseccamento.

V — Producção da toxina *in vivo*.

VI — Poder antigenico da toxina: antitoxina estaphylococcica. *a*) vias de immunização experimental; *b*) neutralização das varias acções toxicas da toxina; *c*) relações quantitativas do poder de neutralização das varias acções toxicas; *d*) immunização activa e passiva e acções toxicas dos filtrados; *e*) poder curativo da antitoxina em relação aos effeitos toxicos da toxina.

VII — Immunização activa e passiva e infecção sob condições experimentaes.

VIII — Anatoxina estaphylococcica: *a*) preparação; *b*) poder antigenico; *c*) poder floculante; *d*) emprego therapeutico.

IX — Producção de antitoxina em escala industrial: *a*) processos de immunização; *b*) processos de doseamento; *c*) novo processo de doseamento; *d*) concentração.

X — Discussão. Summario.

ESTUDO
EXPERIMENTAL SOBRE TOXINA ESTAPHYLOCOCCICA

POR

J. TRAVASSOS

Em janeiro de 1928, em Bundaberg, Queensland, a contaminação por estaphylococcos de mistura toxina-antitoxina diphterica, usada em immunização preventiva, causou a morte de 12 dentre 21 crianças então inoculadas, perecendo todas de septicemia estaphylococcica em 24 horas ou mais. Este desastre veiu mais uma vez focalizar a necessidade de uma investigação mais completa desta bacteria, sobretudo de seus productos toxicos, para os quaes a "Royal Commission", encarregada do estudo dessa occorrencia, chamou em especial a attenção, nos seguintes termos: "massive production of toxic substances must have taken place in the fatal cases if staphylococci were the responsible agents" (1).

A's septicemias estaphylococcicas, por vezes occorrendo em individuos apparentemente sãos, sem o desenvolvimento de uma infecção geral e somente reveladas pelos abcessos metastaticos, provavelmente oriundos de embolias bacterianas partidas de focos em evolução ou de focos latentes em remissão, contrapõem-se as toxemias estaphylococcicas que apresentam um quadro typico, quasi sempre de prognosticos desfavoraveis e de mortalidade elevada, conforme se deprehende dos artigos de Otten (40) que verificou 80% de casos fataes em 55 tratados; de Soper (59) que constatou 72 % de morte em 40 casos; de Lowenstein (29) que refere 57 casos com 51,4% de mortalidade. Estas septicemias, quasi sempre de marcha fulminante, seriam consequencia, não só da menor resistencia do organismo, como da maior virulencia da bacteria infectante (Bowler e Boardman) (7). "Parasita constante da superficie do corpo e das mucosas, geralmente de fraco poder invasor, não se poderia explicar este augmento rapido e sensivel da virulencia do estaphylococco si não por uma accentuada diminuição da resistencia individual, embora se admittisse a hypothese de uma contaminação externa por organismos altamente virulentos" (Lowenstein). As septicemias por estaphylococcos de fraca virulencia, em organismos de resistencia diminuida, seriam mesmo de prognosticos mais desfavoraveis do que as causadas por estaphylococcos altamente virulentos, mas em organismos de resisten-

cia normal. Só assim se poderia comprehender a alta mortalidade das septicemias e particularmente daquellas resultantes das amostras de estaphylococcos ordinariamente de fraca virulencia (Lowenstein). Ora, as septicemias secundarias a furunculos (forma erysipelatoide de George e Giroire) (17), em organismos de resistencia normal, de marcha fulminante e quasi sempre fataes [Peet (42), Reed e Stiles (55), Lowenstein, George e Giroire], não justificavam certamente esse modo de pensar. A resistencia organica contrapor-se-ia á fraca virulencia do germe, oriundo de identico modo da superficie do corpo. Nestas condições, um novo elemento, o poder toxigenico do estaphylococco, deveria ser chamado á explicação do facto. Com effeito, a virulencia nem sempre acompanharia o poder toxigenico nas bacterias. O proprio quadro toxemico dessas septicemias, observado pelos clinicos, não deixando duvidas quanto á intoxicação profunda do organismo, falaria accentuadamente em favor desta hypothese. A toxina estaphylococcica, elaborada mais ou menos intensamente, afastando as defesas naturaes, facilitaria a invasão do organismo e agindo sobre os pontos mais vulneraveis seria responsavel pela morte, tantas vezes observada no decurso das septicemias provocadas por esta bacteria.

Poderia o estaphylococco produzir uma toxina soluvel? Teria esta toxina propriedades que inhibiriam as defesas organicas? ¡Agiria ella, por si só, sobre certos orgãos, provocando a morte pelo modo brutal e rapido tantas vezes observado nas septicemias estaphylococcicas? Qual o mecanismo de sua acção mortal?

Uma rapida digressão pela literatura do assumpto deixar-nos-á a par da questão:

Pesquisas experimentaes, algumas bem antigas, demonstram o poder toxico de filtrados de culturas de certas amostras de estaphylococcos. Leber (31), Christmas (10), Rodet e Courmont (56), Mosny e Marcano (32), Lingelsheim (30), entre os mais antigos, Kraus e Pribram (27), Nicolle e Cesari (35), Parker (43 a 46), mais recentemente, entre outros, estudaram um principio activo existente nos filtrados de cultura de estaphylococcos, com poder pyogenico, necrosante e letal para animaes de laboratorio. Os effeitos erythrocytolytico e leucocytolytico desses filtrados, ficaram bem conhecidos através das publicações de Kraus (26), Van de Velde (64 e 65), Bail (4), Lingelsheim e Neisser e Wechsberg (36), tendo sido posteriormente objecto de numerosos estudos por varios experimentadores. A producção de uma gelatinase, de um fermento proteolytico de acção sobre o leite, albumina do ovo e soro, coagulados; e acção coagulante do plasma e o effeito fibrinolytico — já constituiram assumpto para numerosas pesquisas experimentaes.

Russ (57), Kellaway, Burnet e Williams (25), investigando a pharmaco-dynamica da toxina, em preparações de coração-pulmões isolados de animaes inoculados por via venosa, verificaram que ella tem um effeito nocivo sobre a circulação pulmonar, parecendo produzir grande damno sobre os capillares e sobre os pequenos vasos. A morte dos animaes dando-se minutos após a inoculação da toxina por via venosa, seria consequencia de uma queda brusca da pressão sanguinea.

Os trabalhos de Burnet (1), ultimamente apparecidos e realizados em consequencia aos desastres occorridos em Bundaberg, reuniram uma serie de pesquisas sobre a toxina estaphylococcica e não deixaram margem para que seja posta em duvida a capacidade toxigeni-

ca de certas amostras desta bacteria. As publicações de Gross (14), de Parish e Clark (47 a 49), Gengou (15), Panton, Valentine e Dix (51 e 52), Dolman (12), Burky (3), Nelis (37 a 39) e de outros, posteriores aos de Burnet, confirmaram os seus magnificos estudos.

No decorrer de nossos estudos sobre a toxina estaphylococcica, alem das propriedades já assignaladas, tivemos occasião de verificar, tambem, o effeito tetanizante da toxina quando inoculada directamente no cerebro de animaes [Travassos (63)]. Este effeito tornaria este principio activo responsavel pelas chamadas meningites e meningismos, evidenciados com frequencia em clinica, na phase terminal das septicemias ou consequentes a infecções oto-rhinologicas.

Tambem uma substancia de acção gastro-intestinal foi descripta e recentemente estudada por Jordan (20 a 22), Woolpert e Dack (66) e outros.

Esta ligeira revisão da literatura mostra-nos de relance todos os effeitos conhecidos dos filtrados de culturas de estaphylococcos. O effeito lytico sobre as cellulas do sangue e dos tecidos, o poder coagulante do plasma e o fibrinolytico, e o mecanismo d amorte rapida dos animaes inoculados por via venosa, explicariam provavelmente a pathogenia da maioria das lesões estaphylococcicas: tromboses, necroses e consequentes abcessos e o mecanismo da morte nas septicemias, caso outros factores não interviessem.

Dando á toxina e ás secreções da cellula estaphylococcica a responsabilidade das lesões causadas por esta bacteria, facto aliás cabivel ante as differentes acções toxicas dos filtrados, o antigo problema novamente se focaliza: em que condições o estaphylococco, parasita da pelle e das mucosas do homem e dos animaes, se pode tornar virulento e altamente toxigenico? O problema encarado por este prisma, já tão debatido nos primordios da bacteriologia, acarreta o estudo de uma serie de factores, inherentes ao organismo infectado e á propria cellula bacteriana e dos quaes a maioria permanece ainda desconhecida.

Nesta publicação, mostraremos os resultados dos nossos estudos sobre a toxina estaphylococcica e, tambem, sobre a antitoxina e a anatoxina, de tão promettedor alcance therapeutico nas estaphylococcias localizadas e generalizadas.

No decorrer destes estudos experimentaes tivemos a assistencia da dra. Jandyra Planet, presentemente em estagio de aprendizagem em nosso laboratorio. Agradecemo-lhe aqui a sua efficiente cooperação technica.

I — Preparação da toxina *in vitro*.

As condições necessarias para a producção da toxina *in vitro*, já bem estabelecidas por Walbum (57), Parker, Oppenheimer (41), Bigger e collaboradores (8 e 9) e recentemente por Burnet, referem-se em particular á reacção do meio de cultura e a certas substancias que favorecem ou impedem a sua maior elaboração.

Tanto em meio liquido (Walbum, Parker, Burnet), como em agar semi-solido (Oppenheimer, Bigger e Burnet), pode-se obter uma toxina bem activa, si a concentração do ião H se mantem entre 6,0-7,0. Walbum, que melhor estudou o problema sob este aspecto, affirma que um pH inicial de 5,0 é o mais apropriado, embora possa variar entre 5,0 e 10,0; porem, em um caldo commum, após 5 dias de desenvolvimento, a reacção final deve estar entre 7,6 e 8,6. Para esse fim, um soluto tampão de phosphato poderia ser usado, conforme posteriormente tambem fez Parker, mas, quando se emprega uma quantidade sufficiente do soluto tampão, o resultado é bem inferior. O fim almejado seria, entretanto, obtido indirectamente, desde que se conservassem as culturas em uma atmosphera que contivesse de 10 a 25 % de CO^2. Os estudos de Walbum e Parker mostram que este gas age como uma verdadeira substancia tampão, diminuindo a progressiva alcalinidade do meio durante o crescimento do germe. Burnet, em estudos mais minuciosos, suggere que, sob a acção do CO^2, as cellulas estaphylococcicas do typo *aureus*, se tornariam mais permeaveis aos iões H, ficando o meio interno mais acido, condição necessaria para a elaboração e diffusão da toxina. As variantes *albus*, naturalmente permeaveis aos iões H, requereriam exclusivamente um pH do meio para o lado da acidez, dispensando todo e qualquer traço de CO^2. Combiesco e collaboradores (11) substituiram, com resultado, o CO^2 pelo gas de illuminação.

Certas substancias addicionadas aos meios de cultura favoreceriam a producção da toxina, enquanto que outras a inhibiriam. Os saes de magnesio, segundo Walbum, seriam até certo ponto essen-

ciaes, sendo sufficiente a addição de pequena dose de 0,03% de sulfato de magnesio para que a elaboração da toxina fosse maior. Os saes de potassio, nickel, manganez, ouro e platina teriam o mesmo effeito. Ao contrario, o chloreto de sodio, commummente usado na dose de 0,05%, bem como os saes de calcio, seriam substancias inhibidoras. A glycose, como diz Parker, teria poder impediente, podendo isso ser explicado, ou pela acção de poupança da proteina (protein sparing action), demonstrada por Kendall (28), ou pelo facto de ser impossivel a manutenção do pH pela formação de acido (*).

Cultivos em anaerobiose mostraram a Burky, que, apezar de não conterem uma forte hemolysina, os filtrados se mostram toxicos para coelhos por via venosa.

Dos differentes meios de cultura que usamos para a preparação da toxina estaphylococcica (caldo commum, caldo Martin, meio de Parker, etc), destacamos os 2 seguintes que nos deram filtrados mais activos: a) meio de Walbum modificado por Burnet — a 1 litro de agua de carne preparada com coração de boi (250,0 para 1 litro de agua), addiciosar 5,0 grs. de peptona Witte, 2,0 grs. de phosphato de potassio (KH^2PO^4) e 0,3 grs. de sulfato de magnesio ($MgSO^4$); dissolver, filtrar e ajustar o pH entre 6,0 e 7,0; distribuir em frascos de 50 cc. e esterilizar a 120º por 20 minutos; b) agar commum a 0,8%, de pH 6,0.

Cultivos em caldo de 24 horas são transplantados para os frascos com o meio a) ou para placas contendo o meio b). Estes frascos ou placas são collocados em uma campanula munida de 2 tubuluraduras. Veda-se com parafina toda a reborda da campanula e, em seguida, faz-se passar uma corrente de CO^2, preparada num apparelho de Kipper, ligado directamente a uma dessas tubuluraduras. A outra, ligada a um tubo recurvado na extremidade e que penetra numa proveta graduada repleta dagua e, por sua vez, invertida numa cuba cheia desse liquido, serve para dar passagem ao ar deslocado. 20% do volume do ar da campanula é substituido por uma corrente de CO^2, vedando-se então os orificios das tubuluraduras. A campanula permanece na estufa a 37º, por 6 dias, sendo que geralmente no 4.º dia é renovado o CO^2. As culturas de 6 dias, addicionadas de uma camada de toluol para matar os germes, permanecem no frigorifico por 24-48 horas, quando são então filtradas ou centrifugadas fortemente. A conservação faz-se sob toluol e no frigorifico, ou após desseca-

(*) Recentemente Nélis (37) diz ter obtido toxinas estaphylococcicas em meio de Ramon, usado na preparação da toxina diphterica, as quaes não só se mostravam mais activas (acção hemolytica) do que as preparadas em meio de Walbum, como attingiam um alto titulo já no fim de 48 horas.

mento. Antes do uso verifica-se a esterilidade da toxina por semeadura em caldo e agar commum.

Varias experiencias por nós realizadas demonstraram que se obtêm toxinas mais activas: a) quando o pH do meio era ajustado entre 6,0 e 7,0 antes da esterilização; b) quando o volume do liquido não ultrapassava de 50 cc.; c) quando o cultivo era feito em recipientes de larga superficie.

Para se obter a toxina dos meios de cultura semi-solidos, procedia-se do seguinte modo: as culturas de 24-48 horas de varias placas eram cortadas com uma espatula em pedaços bem finos e estes amassados com um bastão de vidro até que fosse formada uma massa bem homogenea. Esta era fortemente espremida em gaza, o liquido centrifugado, addicionado de toluol e conservado no frigorifico.

II — Poder toxico: *a)* acção erythrocytolytica; *b)* acção leucocytolytica; *c)* outras acções cytolyticas; *d)* acção necrosante; *e)* acção coagulante do plasma e acção fibrinolytica; *f)* acção mortal; *g)* acção tetanizante; *h)* acção gastro-intestinal.

Os auctores que estudaram o assumpto verificaram que nem todas as amostrar de estaphylococcos pathogenicos são boas productoras de toxina. Russ (57), trabalhando com 250 amostras, achou que somente 80 eram hemolyticas e, destas, apenas 16 produziam toxina capaz de matar o coelho por via intravenosa. Burnet (1) achou que os resultados de Russ, seriam bem melhores si este auctor tivesse realizado suas experiencias usando meios de culturas em condições mais adequadas.

Nas nossas experiencias em meio de Walbum, de 67 amostras de estaphylococcos pathogenicos estudadas sob este ponto de vista, sómente 7 deram toxinas de accentuado poder erythrocytolytico. Nesse estudo, não verificamos nenhuma relação entre a virulencia das amostras e o poder toxigenico das mesmas.

Certas amostras isoladas de casos graves (septicemias, meningites) não mostraram actividade toxigenica mais elevada que outras, isoladas de lesões bem localizadas (ulceras, osteo-myelite) e apparentemente sem maior gravidade.

Algumas das amostras mais toxigenicas faziam parte da nossa colleção e foram isoladas ha varios annos (1928 a 1932), o que revela que o poder toxigenico é mantido por longo tempo. Por outro lado, algumas das amostras isoladas recentemente não mostraram maior poder toxigenico.

O augmento da virulencia dos estaphylococcos por passagens successivas no organismo do coelho, não modificou o poder toxigenico de 3 amostras ensaiadas

Ha portanto uma verdadeira dissociação entre a virulencia e o poder toxigenico.

As acções toxicas das culturas ou dos filtrados de culturas estaphylococcicas, até agora estudadas são as seguintes: erythrocytolytica, leucocytolytica, lytica para as cellulas dos tecidos e particularmente acção necrosante para a pelle; acção coagulante do plasma e effeito fibrinolytico; as acções proteolyticas sobre o soro, leite e albumina do ovo coagulados, e acção dissolvente sobre a gelatina; poder mortal, quando inoculada por via intravenosa; acção tetanizante, quando inoculada directamente no cerebro, e, ainda, um veneno gastro-intestinal.

No decorrer dos nossos trabalhos tivemos occasião de estudar varios desses effeitos de filtrados de culturas de estaphylococcos e resumimos a seguir os resultados obtidos.

a) ACÇÃO ERYTHROCYTOLYTICA — Os filtrados de culturas de certas amostras de estaphylococcos têm o poder de lysar mais ou mesos intensamente os globulos vermelhos do sangue dos differentes animaes. Essa acção lytica, pela qual é responsavel um principio activo filtravel, é destruida pelo calor e pela acção dos acidos e do formol e provoca, quando inoculada em animaes, o apparecimento de um anticorpo que a neutraliza.

Para a avaliação quantitativa da acção erythrocytolytica dos nossos filtrados, usamos a seguinte technica: a 0,5 cc. de differentes diluições dos filtrados (1/25, 1/50, 1/100, etc.), addiciona-se 0,5 cc. de uma diluição a 2% de hematias de carneiro, previamente lavadas e resuspensas em salina a 0,85%, em quantidade correspondente ao volume inicial do sangue. Incuba-se em banho-maria a 37° por 1 hora, agitando os tubos cada 15 minutos, sendo estes depois levados á geladeira até a manhã do dia seguinte, quando então é feita a leitura definitiva. A quantidade de toxina contida no tubo em que se verifica 50% de hemolyse Burnet a considera como a unidade erythrocytolytica do filtrado (D. M. H.). Para uniformidade e estudo comparativo dos resultados, a actividade hemolytica das nossas toxinas foi avaliada sob as mesmas bases.

As diluições dos filtrados feitas em salina addicionada de 10% de caldo commum, como aconselha Burnet, augmentam, até certo ponto, o poder hemolytico de certas toxinas, embora não exerçam maior influencia sobre outras.

O doseamento por incubação no frigorifico não nos deu resultados animadores. Nestas condições, certas toxinas não mostram effeito algum enquanto que outras revelam um poder hemolytico entre 100 e 200 unidades. Se após a 1.ª incubação no frigorifico incubam-se os tubos em banho-maria a 37° por 1 hora, o effeito hemolytico se revela accentuado, alcançando titulos elevados. As hematias sensibilisadas pela toxina (no frigorifico) centrifugadas e resuspensas em salina e incubadas a 37°, são lysadas rapidameste, o que demonstra a fixação da toxina sobre esses elementos.

O volume do meio de cultura tem grande importancia na producção de

erythrocytolysina de alto titulo. Usando a principio frascos contendo 500 a 250 cc. de caldo para o cultivo do germe, nunca conseguimos toxinas de poder acima de 50 unidades por cc.. Com a technica recente, empregando frascos contendo 50 cc. do meio de cultura, os resultados foram muito melhores, alcançando por vezes 3.200 unidades por cc.. A producção da erythrocytolysina é ainda favorecida pelo cultivo em meio liquido em frascos de larga superficie, parecendo isto correr por conta de um maior contacto de CO^2 com o meio. De um modo geral, as nossas toxinas de maior titulo hemolytico revelaram um pH variando entre 6,9 e 7,6.

Erythrocytolysinas de alto titulo tambem podem ser obtidas em agar semi-solido.

A elaboração da erythrocytolysina por uma mesma amostra de estaphylococco, nem sempre revela identica actividade, embora o meio de cultura seja da mesma partida, de volume igual e mesmas as condições de temperatura e percentagem de CO^2. Assim, as amostras 264, M. C. A. e 115, cultivadas naquellas condições, deram os seguinte valores hemolyticos: a amostra 264, cultivada em 3 frascos, deu 1.400, 1.600 e 2.800 unidades por cc.; a amostra M. C. A., nas mesmas condições, deu 50, 100 e 200 unidades; a amostra 115 forneceu, nos 3 frascos, o mesmo titulo de 800 unidades por cc.. Varias colonias de uma mesma amostra de estaphylococcos, tambem, em igualdade de condições, mostram actividades hemolyticas diversas, umas mais accentuadas que outras. Estas experiencias parecem mostrar que as cellulas estaphylococcicas não são igualmente toxigenas e suggerem a technica a seguir para a selecção das amostras bôas productoras de toxina.

No que diz respeito aos globulos vermelhos de differentes especies de animaes, a actividade erythrocytolytica se revela maior para os de coelho do que para os de carneiro, cobaia, rato, pombo, em ordem decrescente. Dolman, verificou variações do grau hemolytico dentro da mesma especie, mostrando certas toxinas maior poder erythrocytolytico para hematias de um animal do que para as de outro da mesma especie. Em geral, as nossas experiencias para a avaliação do poder erythrocytolytico de filtrados estaphylococcicos, foram feitas com hematias de 1 unico carneiro, sangrado por varias vezes.

Como se pode verificar no Quadro 1, nem todas as amostras de estaphylococcos são boas productoras de erythrocytolysina. De 67 amostras por nós estudadas e que se mostraram hemolyticas em placas de agar-sangue de coelho, somente 25 amostras revelaram valores erythrocytolyticos acima de 50 unidades por cc..

Experimentando o poder hemolytico de varias toxinas para hematias de carneiro e de coelho, verificamos (Quadro 2) que as toxinas apresentam um titulo mais elevado para hematias de coelho do que para as de carneiro, guardando geralmente uma relação de 1 para 4.

A presença de um soro activo não parece facilitar a hemolyse, o que vem confirmar as experiencias de Julianelle (23), além de que soros de certos animaes podem conter propriedades anti-hemolyticas por vezes accentuadas.

QUADRO 1

Acção erythrocytolytica (hematias de carneiro) das varias amostras estudadas, em unidades por 1 cc..

Total	< 50	> 50 < 100	> 100 < 300	>400 < 800	> 1600 <3200
67	42	12	6	4	3

QUADRO 2

Acção erythrocytolytica de varios filtrados para hematias de carneiro e de coelhos, em unidades por 1 cc..

Amostras	Hematias de carneiro	Hematias de coelho	Relação
Carolina	1.600	6.400	1:4
177.	1.600	6.400	1:4
»	400	1.600	1:4
M.C.A..	400	1.600	1:4
115	400	1.600	1:4
»	800	3.200	1:4
Af. 4	400	1.600	1:4
»	800	3.200	1:4
193	400	1.600	1:4
Francisco	400	1.600	1:4

O titulo erythrocytolytico de uma toxina não se mantem estavel por muitos dias. Toxinas conservadas no frigorifico, sob toluol e em frascos escuros, mostraram, já no fim de 20 dias, uma actividade hemolytica diminuida de 30% a 70%. Em temperatura ambiente, os filtrados perdem muito mais rapidamente o seu titulo hemolytico, embora os demais effeitos toxicos se mostrem mais estaveis, como por exemplo o poder mortal. Burky, mesmo após um anno de conservação á temperatura ambiente, encontrou filtrados de effeito mortal para

o coelho por via venosa, filtrados estes cuja acção erythrocytolytica tinha quasi desapparecido.

No estado secco, após a perda inicial sempre observada, o titulo erythrocytolytico é mais estavel, notando-se, contudo, uma pequena diminuição após alguns meses.

Glenny (em trabalho não publicado, cit. por Parish) (47), encontrou 2 hemolysinas em filtrados estaphylococcicos, com anticorpos especificos. Panton e Valentine (51), encontraram tambem toxinas com alto titulo erythrocytolytico para hematias de coelho e que apresentavam um titulo menor para as cellulas de carneiro, não chegando a hemolysar os globulos vermelhos humanos. Uma saturação previa com globulos vermelhos humanos de uma toxina fortemente hemolytica para globulos de coelho e inactiva para cellulas vermelhas do homem, não reduziu o titulo hemolytico para os globulos de coelho. Pareceria então que as hemolysinas para cellulas humanas e de coelho seriam distinctas e que a toxina estaphylococcica raramente agiria sobre as cellulas humanas *in vitro*.

Comprovando estas experiencias com 3 filtrados provenientes de 3 amostras toxigenicas de estaphylococcos, verificámos a menor sensibilidade das hematias humanas, submettidas á acção lytica da toxina. Assim a toxina 264, fortemente hemolytica (1/3.200) para hematias de carneiro e de coelho, mostrou fraco effeito erythrocytolytico para hematias humanas (1/4); do mesmo modo, as toxinas 115 e M. C. A., muito activas para hematias de coelho (1/1.600) e regularmente para hematias de carneiro (1/400), somente mostraram hemolyse completa para as hematias humanas, quando puras. Os globulos vermelhos humanos seriam, então, mais resistentes á acção lytica da toxina do que as hematias de carneiro e de coelho. Restaria comprovar si, em ensaios com hematias de individuos cujos soros são isentos ou pelo menos contêm pequena quantidade de antitoxina, o poder lytico desses filtrados não se mostraria mais accentuado. Com effeito, Bryce e Burnet (2), em estudos detalhados sobre o desenvolvimento da immunidade natural á toxina estaphylococcica, estabeleceram uma curva do teor antitoxico dos soros de individuos de varias idades, que se assemelha á curva da immunidade natural á toxina diphterica, na qual se vê que nos individuos adultos o teor anti-erythrocytolytico do soro é sempre elevado. Occasionalmente em coelhos (5%) se poderia observar tambem uma certa immunidade natural.

b) Acção leucocytolytica — O estudo da leucocidina estaphylococcica teve o seu ponto de partida nas experiencias de Van de Velde (1894) (64), que descobriu, nos exsudatos de coelhos inoculados por via pleural, uma substancia que provocava a degeneração bolhosa e a lyse dos leucocytos. Lingelsheim (30),

estudando mais minuciosamente o principio leucolytico das culturas dos estaphylococcos, verificou que os leucocytos de coelho são mais sensiveis do que os de cão, camondongo e cobaia, em ordem decrescente. Os leucocytos de sapo seriam completamente insensiveis.

Para os nossos ligeiros estudos sobre a acção leucocytolytica da toxina estaphylococcica usamos o processo de Neisser e Wechsberg (36), baseado na reducção do azul de methyleno. A technica que empregámos foi a seguinte: a) o exsudato pleural obtido após a inoculação de aleurona em coelhos, era recolhido e addicionado, á razão de 1/3 de seu volume, de uma solução a 0,5% de NaCl com 2% de citrato de sodio; os exsudatos muito hemorrhagicos não eram utilizados; b) a quantidade padrão da suspensão de leucocytos era dosada em presença de 0,05 de uma solução a 1/10.000 de azul de methyleno. Em uma serie de tubos com aquella quantidade de soluto de azul de methyleno, addicionavam-se quantidades crescentes da suspensão de leucocytos, sendo o volume de 1 cc. completado com salina e os tubos cobertos com uma camada de vaselina. Incubavamos em banho-maria a 37° e a leitura final era feita 20 minutos após. A quantidade padrão era dada pelo tubo que apresentava a reducção completa do azul de methyleno naquelle periodo de tempo; c) a essa quantidade padrão de leucocytos, addicionavam-se, em uma serie de tubos, quantidades crescentes de toxina estaphylococcica e o volume de todos os tubos era inteirado a 1 cc. com salina. Levava-se ao banho-maria a 37° por 1 hora e em seguida addicionava-se para cada tubo 0,05 de soluto de azul de methyleno. Cobria-se com vaselina e os tubos eram novamente incubados por 1 hora.

Uma unidade de leucocidina era dado pela minima quantidade do filtrado que prevenia completamente a reducção do azul de methyleno pelos leucocytos em 1 hora. Por esse processo verificámos a acção leucocytolytica dos nossos filtrados, encontrando em alguns delles uma actividade regularmente accentuada. Embora não tivessem apresentado uma relação numerica muito estreita, de uma maneira geral os nossos filtrados mais hemolyticos mostraram tambem maior actividade leucocytolytica. Os soros animaes inoculados repetidas vezes com a toxina estaphylococcica apresentam propriedades neutralizantes para a actividade leucocytolytica de filtrado.

Para certos auctores, estas duas actividades lyticas dos filtrados estaphylococcicos não seriam devidas a um unico principio activo, podendo-se mesmo separal-as por experiencias de adsorpção. Julianelle encontrou amostras productoras de hemolysina que não produziam leucocidina e vice versa. Panton e Valentine (51), do mesmo modo, verificaram amostras altamente productoras de hemolysina e que produziam fracamente leucocidina e vice versa. Weld e Gunther (46) teriam conseguido adsorver a erythrocytolysina com estroma de hematias de carneiro.

Convem ainda referir aqui a propriedade que possuiriam as culturas estaphylococcicas de diminuir a acção phagocytaria dos leucocytos. Esta propriedade, notada por Hektoen (19), Wadsworth e Hope (68), foi ultimamente estudada por Pike (53), que reconheceu, á luz dos trabalhos anteriores e dos experimentos que realizou, a propriedade de os estaphylococcos secretarem 2 substancias nocivas aos leucocytos: uma verdadeira exotoxina (leucocidina) que deve ser identica á hemolysina, á leto-toxina e á necro-toxina; a outra, uma substancia não antigenica, caracteriza a sua actividade pela diminuição da acção phagocytaria dos leucocytos. Esta ultima não antigenica, é thermo-estavel, não se deteriora com o tempo, não é affectada por uma atmosphera de CO^2 e seria susceptivel de ser produzida por todos os estaphylococcos.

c) Outras acções lyticas — A acção lytica dos filtrados de culturas estaphylococcicas extende-se ás cellulas de outros tecidos.

Denys e Van de Velde (65), Neisser e Wechsberg (36), estudando o assumpto, confirmam essa acção lytica; os dois ultimos auctores, porém, asseveram que este poder de lyse não se mostra evidente sobre as cellulas renaes.

Gengou (15) observou que, assim, os hematoblastos como as cellulas dos differentes orgãos do coelho soffrem a acção lytica da toxina.

Nélis e Picard (39), em cortes histo-pathologicos de orgãos de coelhos inoculados por via endovenosa, observaram o effeito lytico brutal da toxina, principalmente sobre as cellulas hepaticas, que, num estado de hepatite toxica super-aguda, apresentam uma lyse total de seu protoplasma, enquanto os nucleos, assim como as dimensões das cellulas, permanecem integros. No myocardio, por vezes, seriam encontradas fibras no estado granuloso e hyperplastico, e, nos rins, uma inflammação epithelial aguda, caracterizada por tumefacção turva das cellulas dos tubos contornados.

d) Acção necrosante para a pelle (*dermo-toxina*) — A acção dermotoxica da toxina estaphylococcica é facilmente verificavel pela necrose que sobrevem á inoculação intradermica dos filtrados.

Esta acção necrosante, já bem estudada por Parker e Burnet, revela-se com toda a intensidade nas 24-48 horas após a inoculação da toxina. Tres a quatro horas após a inoculação do filtrado já se nota uma area de côr azul escura, que varia em diametro com a toxicidez do mesmo. No dia immediato, a região toma uma côr amarellada e em torno della notam-se phenomenos isflammatorios, con-

sistindo estes em intenso rubor e edema mais ou menos extenso. Com o decorrer do tempo, pela eliminação do tecido necrosado forma-se uma ulcera. Os filtrados de culturas que não contêm toxina, quando inoculados, não produzem reacção de especie alguma, excepto occasionalmente uma area avermelhada que desapparece em 24-48 horas. A maior ou menor extensão da necrose depende da maior ou menor actividade toxica do filtrado.

No Quadro 3, podem ser verificados os resultados da acção dermo-toxica de varias toxinas, obtida com a inoculação de 0,2 cc. de varias diluições por via intradermica, em coelhos. As lesões provocadas pelas doses fracas são mais do typo inflammatorio, não chegando a verificar-se a placa de necrose.

QUADRO 3

Acção dermotoxica da toxina (inoculação por via intradermica em coelhos)

Toxinas	Diluições					
	1/5	1/10	1/20	1/30	1/40	1/50
115 (2)	Nec.	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.
264 (3)	Nec.	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.
M.C.A. (4). .	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.
Carolina (1). .	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.
Af 4	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.	—
21 (2).	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.	—
Mistura	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	—	—

Legenda: Nec. = necrose
ed. = edema

No Quadro 4, vêem-se as lesões necrosantes avaliadas pela extensão do edema e da placa necrosada, medidas em seus maiores diametros, de 3 toxinas, cujo poder erythrocytolytico era de 400 doses minimas hemolyticas (D. M. H.) por cc.. As quantidades de toxina inoculadas foram calculadas de modo que correspondessem a uma serie crescente de unidades hemolyticas. Verifica-se que, embora as 3 toxinas apresentassem o mesmo titulo erythrocytolytico, as lesões provocadas não se corresponderam totalmente. Com effeito, enquanto a toxina 115 origina uma placa de necrose de 1,6×0,9 com 1 D. M. H., a toxina Carolina, nessa mesma dose, provoca uma placa 24 vezes menor: 0,2 x 0,3. A toxina 264 mostrou uma acção dermotoxica pouco accentuada, só provocando uma placa de necrose com 5 D. M. H.

A sensibilidade do coelho ás inoculações intradermicas de toxina, porém, é variavel em certo grau. A menor dose de toxina capaz de produzir a lesão necrosante na pelle de um animal, nem sempre é sufficiente para produzir este

QUADRO 4

Acção dermotoxica da toxina (Relação entre as acções erythrocytolytica e dermotoxica)

Toxinas	Unidades hemolyticas por cc. (p. h. carneiro)	No. de unidades hemolyticas inoculadas por via intradermica											
		1		1.5		2,5		3		5		10	
		Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.
264 . .	400	—	—			0.8 x 0.5	—	4.5 x 4.0	3.5 x 1.7	1.5 x 1.5	0 7 x 1.0	2.0 x 1.5	1.1 x 0.8
115 . .	400	0.6 x 1.4	1.6 x 0.9	3.4 x 2.5	2.5 x 1.0			4.3 x 2.0	3.0 x 0.5	6.5 x 5.5	3.0 x 3.0	5.0 x 4.5	3.5 x 2.0
Carolina	400	1.7 x 2.5	0.2 x 0.3	2.0 x 1.2	0.5 x 0.5					6.2 x 3.0	4.0 x 1.3	5.8 x 3.0	4.5 x 1.5

mesmo effeito quando inoculada em outro; a essa mesma dose um terceiro coelho poderá reagir mais intensamente. Com doses mais elevadas de toxina e tomando por norma a extensão da lesão, esta variação ainda é observada. Os coelhos de pello branco mostram placas de extensão mais uniforme, sendo que os da mesma prole apresentam resultados mais constantes e talvez fixos. Os coelhos adultos são mais sensiveis.

A cobaia reage menos intensamente do que o coelho, mas, como bem observaram Parish e Clark, existe maior regularidade de resposta a uma quantidade de toxina considerada como dose minima necrosante (D. M. N.).

Coelhos successivamente inoculados de 4 em 4 dias com 0,25 cc. de uma toxina, mostram lesões necrosantes que diminuem cada vez mais de tamanho e intensidade, até se tornarem nullas da 4.ª á 6.ª inoculação. Estes animaes, assim tornados immunes, posteriormente inoculados por via venosa com uma dose de toxina seguramente mortal, nada apresentam. Os soros destes coelhos neutralizam mais ou menos intensamente todas as acções toxicas da toxina. A actividade necrosante da toxina é, tambem, neutralizada por soros de cavallos inoculados com toxina, e, bem assim, por soros de pessoas que tenham recebido varias injecções de toxina tratadas pelo formol (anatoxina).

e) Acção coagulante do plasma e acção fibrinolytica — De 28 culturas de estaphylococcos pathogenicos foi verificada a acção coagulante sobre o plasma oxalatado: duas, quatro e seis gottas das culturas de 18-24 horas eram addicionadas a 0,5 cc. de plasma oxalatado de coelho; incubava-se a 37° e faziam-se leituras após 2, 6 e 18 horas de estufa. A' excepção de 1 amostra, as demais coagularam o plasma, algumas dellas já no fim de 2 horas de incubação. Todas essas amostras produziram hemolysina, mais ou menos accentuadamente.

Numa serie de 18 amostras de estaphylococcos saprophytas da pelle, todas sem acção coagulante para o plasma, 6 mostraram fraca acção hemolytica; em outra serie de 15 amostras de estaphylococcos isolados da polpa vaccinica, cuja maioria somente com 6 gottas de cultura e no fim de 18 horas coagulou o plasma, 4 mostraram acção hemolytica um pouco mais accentuada, não alcançando todavia 100 D. M. H. por cc..

A lyse do plasma coagulado foi tambem observada na serie de amostras de estaphylococcos pathogenicos, algumas das quaes, já no fim de 24-48 horas, o haviam completamente dissolvido. As amostras que mais rapidamente coagulam o plasma são, do mesmo modo, as que mais rapidamente lysam o coagulo. Esta observação confirma as de Gratia (16) e as de Gengou (15), que consideram a coagulação do plasma uma phase da fibrinolyse.

A estaphylo-coagulase é em grande parte retida pela filtração e mostra-se mais thermo-estavel do que a hemolysina e a dermotoxina.

Sudhues (60), observou que os soros de portadores de infecção estaphylococcica, bem como os de coelhos infectados, não mostram

nenhum effeito de neutralização, evitando ou retardando a coagulação do plasma. O phenomeno de coagulação seria effeito de trocas physico-chimicas não especificas e não dependeria dos phenomenos de immunidade.

f) Acção mortal para differentes animaes (*leto-toxina*) — A' inoculação da toxina por via venosa em coelhos ou outros animaes, sobrevem a morte em espaço de tempo variavel, que se relaciona com a quantidade e o poder toxico dos filtrados. Este facto, claramente assignalado desde 1906 por Kraus e Pribram (27) e, em 1914, por Nicolle e Cesari (35), foi estudado em seu mecanismo por Russ (57), em 1916, e recentemente, por Kellaway, Burnet e Williams (25) e Nélis e Bouckaert (38).

Coelhos — Os coelhos inoculados por via intravenosa com uma forte dose de uma toxina bem activa cahem como que fulminados, morrendo instantaneamente. As doses menores prolongam o tempo da morte dos animaes, o que acontece tambem com as doses elevadas de toxina menos activa, conservando-se aquelles como que normaes, até alguns minutos antes do periodo final. O primeiro signal da acção letal da toxina sobre o organismo do animal injectado é uma certa difficuldade respiratoria, traduzida por inquietação, com pequenos movimentos lentos da cabeça e dos membros. O rythmo respiratorio, a principio lento, torna-se irregular e penoso, não tardando a queda do animal, precedida, as mais das vezes, por um grito angustioso. O coelho mostra movimentos desconnexos da cabeça e dos membros (menos frequentemente, fortes contracturas); logo depois, a respiração e todas as actividades musculares lhe cessam, seguindo-se a morte.

O reflexo pupillar durante o processo revela-se primeiramente por uma dilatação, seguida de forte myose; no periodo terminal, com a abolição dos reflexos corneos, a pupilla dilata-se novamente. Durante a crise pode-se notar, em certos animaes, forte anemia peripherica e micção e dejecção frequentes.

Necropsiando os animaes que morrem logo após a inoculação da toxina, observa-se o coração direito dilatado; os pulmões, com pequenas hemorrhagias e algumas vezes edema. Nos animaes que morrem após algumas horas, além destes aspectos, observam-se derrame e mesmo pequenas hemorrhagias no pericardio, sendo que, em alguns, ha um estravasamento sanguineo em todo o mediastino posterior, infiltração sanguinea no tecido pulmonar e congestão do figado.

A' puncção do ventriculo esquerdo não se consegue retirar sangue; o sangue colhido da auricula, cujo tempo de coagulação não parece alterado, quando centrifugado, mostra-se lysado.

Cortes histo-pathologicos, sobretudo do figado, mostraram a Nélis e Picard (39) intensa lyse dãs cellulas e, nos vasos, sangue lysado.

Russ, estudando o poder letal de uma toxina bem activa, em coelhos e gatos curarizados ou não, uns submettidos á respiração artificial, outros com a medulla seccionada, alguns tendo as carotidas ligadas, e ainda outros operados segundo o methodo de Hering-Bock (coração-pulmão isolados), observou que o phenomeno da morte estava ligado: a) a uma immediata queda da pressão sanguinea, seguida de volta á normal, havendo após alguns minutos uma profunda queda terminal; b) á diminuição da amplitude dos movimentos respiratorios nos animaes submettidos á respiração artificial; c) á parada do coração, com dilatação da auricula e ventriculo direitos e da arteria pulmonar, conservando-se o ventriculo esquerdo virtualmente vasio; d) o phenomeno da morte seria independente de qualquer acção do systema nervoso central. Os estudos histologicos demonstraram o effeito da toxina no bloqueio da circulação pulmonar, não tendo sido observado nenhum effeito directo sobre o coração. Russ concluiu que a acção mortal da toxina está directamente ligada á obstrucção da circulação pulmonar.

Kellaway, Burnet e Williams, estudando a acção pharmaco-dynamica da toxina, verificaram os mesmos phenomenos descriptos por Russ e observaram que a primeira queda da pressão sanguinea, seguida da volta á normal, é de origem vaso-motora e corre por conta dos principios pharmacologicamente activos do caldo de cultura. Somente a queda final da pressão sanguinea é devida ao principio activo do filtrado, obstruindo a circulação pulmonar.

Nélis e Bouckaert (38), registando os movimentos respiratorios, a pressão arterial e a actividade cardiaca de animaes inoculados por via venosa com uma dose de 2,5 cc. de toxina estaphylococcica, chegaram á conclusão de que a *causa mortis* estaria ligada a uma deficiencia da actividade cardiaca, de origem sinusal. Nos animaes inoculados com doses menores, cuja morte sobreviria após alguns dias, o effeito letal teria ainda como causa perturbações funccionaes de outros orgãos (figado, tubo digestivo, rins, pulmões, etc.).

As toxinas de varias amostras por nós preparadas mostraram poder mortal muito variavel. Enquanto algumas matam por via venosa 1 K. de coelho com doses inferiores a 0,25 cc., outras se mostram muito menos activas, sendo necessarios 3 e 5 cc. para se obter esse effeito. O Quadro 5 mostra o poder mortal de differentes amostras.

A inoculação por via subcutanea ou por via peritoneal, alem de mostrar effeitos um tanto irregulares, prolonga o tempo de morte dos animaes. Quando a inoculação se dá por via subcutanea, ha necessidade de uma maior quantidade de toxina para obtenção do effeito mortal, embora dependa mais da re-

QUADRO 5

Acção mortal de varias toxinas estaphylococcicas (inoculação por via venosa em coelhos)

Toxinas	Unidades hemolyticas por cc.	Quantidade de toxina por 1 K. de coelho								
		10 cc.	5 cc.	3 cc.	2 cc.	1 cc.	0.5 cc.	0.25 cc.	0.1 cc.	0.05 cc.
Angelina	> 4 < 20	† 1 hora	S	S	—	—	—	—	—	—
Allemão.	> 20 < 50	—	† 25'	—	S	S	—	—	—	—
Izolina	> 100 < 200	—	† 15'	—	S	—	—	—	—	—
Piza	> 100 < 200	—	—	† 39'	—	S	—	—	—	—
21	> 800 < 1.200	—	—	—	† 3'	† Noite	S	S	—	—
Carolina	> 200 < 400	—	—	—	—	† 12'	S	S	S	—
M. C. A.. . . .	> 200 < 400	—	—	† 4'	—	† 8'	† 1/31'	S	S	—
Af 4.	> 800	—	—	—	† 3'	† 4'	† 22'	† Noite	S	S
264.	> 3.200	—	—	—	—	—	† 5'	† 37'	† 32 horas	S
115.	> 800	—	—	—	—	—	—	† 12'	† 1/20'	† Noite

sistencia individual do coelho. Uma dose menor pode matar num espaço de tempo por vezes menor do que uma dose 2 ou 3 vezes maior. A' necropsia observa-se edema hemorrhagico no ponto de inoculação, e, dos orgãos, o mais attingido, é o pulmão, que mostra pequenas hemorrhagias disseminadas por toda a sua area, verificando-se tambem derrame nas cavidades pleural e pericardica.

Cobaias — A inoculação por via intracardiaca de uma toxina que mata 1 k° de coelho por via venosa com 1 cc. em 33 minutos, deu resultados variaveis. Assim é que, numa serie de cobaias inoculadas com quantidades de toxina equivalente a 4, 2, 1 e 0,5 cc. por K. de animal, morreu em 4 horas a cobaia inoculada com a quantidade equivalente a 0,5 cc., amanheceram mortas as cobaias inoculadas com as quantidades equivalentes a 2 cc. e 4 cc., enquanto que sobreviveu a inoculada com a quantidade equivalente a 1 cc..

Por via subcutanea, uma cobaia injectada com a quantidade equivalente a 3 cc. por K. amanheceu morta, enquanto que uma outra injectada com a quantidade equivalente a 5 cc. sobreviveu.

Por via peritoneal occorreram as mesmas irregularidades. Numa serie de cobaias inoculadas com quantidades equivalentes a 5, 3, 1 e 0,5 cc. por K., somente amanheceu morta a que foi inoculada com a quantidade equivalente a 3 cc..

Pombos — O pombo mostra-se sensivel, quer por via venosa, quer por via muscular: 0,4 cc. da mesma toxina, inoculada por via venosa, matou um pombo adulto em 4 horas e 1 cc., injectado na massa muscular do peitoral, matou outro durante a noite.

Camondongos — O camondongo mostra-se sensivel (via peritoneal).

g) ACÇÃO TETANIZANTE — Em nota anterior (63), mostramos que a inoculação de 0,2 ou 0,1 cc. de uma toxina estaphylococcica, bem activa, no cerebro de cobaias ou de coelhos, quer por via transocular, cisternal ou após trepanação, produz rapidamente nos animaes uma syndroma tetanizante caracterizada por contracturas generalizadas, rigidez da musculatura da rache, opisthotono, contracturas sobretudo dos membros anteriores, entrecortadas de movimentos rapidos (Figs. 1 e 2); tachypnéa e tachycardia iniciaes e rhythmo de Cheyne-Stokes terminal; dejecção e micção frequentes; sensibilidade exaggerada; a morte da-se algumas horas após a inoculação, ou, mais raramente, alguns minutos mais tarde e, neste ultimo caso, é sempre precedida por uma hemorrhagia nasal com os caracteres da do edema pulmonar, parecendo correr por conta da intoxicação do centro bulbar.

Doses menores de toxina (0,005 a 0,01 cc.) retardam o apparecimento da syndroma e pode-se então notar, antes de evidenciados os symptomas tetanizantes, o eriçamento dos pellos, prurido, movimentos mendibulares, perda momentanea do equilibrio, movimentos e marcha rotatoria. Em alguns animaes esta marcha rotatoria torna-se excessivamente rapida, atirando-se as cobaias com

facilidade de encontro aos obstaculos, excitação esta que dá a impressão de um verdadeiro delirio; vem afinal a queda em tetania, a que se segue a morte em tempo variavel. Estes ultimos symptomas, demonstrativos da participação do cerebello no processo, servem para caracterizar assim uma syndroma que se superpõe á da "tetania acerebellada".

Com a dose que limita a actividade da toxina, notam-se certas irregularidades no apparecimento dos symptomas, o que certamente corre por conta da maior ou menor resistencia offerecida pelo animal: certos delles apresentam symptomas menos accentuados, occorrendo em tempo muito mais prolongado, faltando por vezes o opisthotono; outros, não chegam a apresentar a syndroma definitiva, mostrando somente ligeira perda do equilibrio e marcha rotatoria, refazendo-se em seguida, podendo, ou não vir a morrer; outras cobaias, enfim, nada apresentam.

Nas doses proximas ao limite de actividade da toxina, varias cobaias se refazem, retomando o equilibrio, mantendo-se em quietude ou em movimentos e marcha rotatoria, mas, dessas, raras são as que sobrevivem nas 24 horas após a inoculação.

Guardada uma escala ascendente de diluições da toxina, observa-se uma relação chronometrica muito estreita entre a occorrencia dos symptomas e a quantidade de toxina inoculada. Assim, procedendo-se a varias diluições da toxina (1/5, 1/10, 1/20, etc.) e inoculando-se, por via transocular, 0,2 cc. de cada diluição em uma serie de 3 cobaias, observa-se uma chronometria muito estreita no apparecimento da queda tetanizante. Nos quadros 6 e 7, vemos os resultados obtidos com a inoculação de duas das nossas toxinas, guardado o criterio das concentrações decrescentes. Quatro toxinas, originadas de amostras differentes, comportaram-se mais ou menos identicamente. No quadro 8 vemos as curvas fornecidas pelas medias do tempo de queda tetanizante de varias toxinas estudadas sob este ponto de vista, podendo-se verificar as differenças de poder toxico das varias toxinas e, tambem, o parallelismo existente entre a toxicidez e a percentagem de mortes.

Si se objectiva mais o valor quantitativo da toxina, não se levando em conta a concentração desta no vehiculo, os resultados são bem differentes, notando-se claramente que a acção tetanizante da toxina occorre em funcção da concentração. No Quadro 9, vê-se que uma determinada dose de toxina que numa concentração mais elevada é capaz de produzir a syndroma tetanizante na cobaia, nada produz em diluição maior. Vemos ainda que, além de uma certa diluição, é impossivel obter qualquer symptoma da syndroma ou mesmo morte tardia, embora as doses inoculadas correspondam ás mesmas quantidades de toxina que em diluição inferior foram capazes de produzir uma symptomatologia completa, seguida de morte.

Para explicação deste facto devemos ter em conta que, pela inoculação por via transocular na cobaia, o liquido quasi sempre se diffunde sobre os orgãos

QUADRO 6

Acção tetanizante da toxina No. 264 (6) em cobaias, por via transocular

Diluição	Volume inoculado	Quantidade absoluta de toxina	Peso da cobaia	Tempo da queda tetanizante, em minutos (0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30)	Symptomas alem de 30 minutos	Volta ao equilibrio	Tempo da morte	Observações
pura	0.2	0.2	275.0	T			0/17'	H. N.
»	0.2	0.2	310.0	T			1/32'	
»	0.2	0.2	290.0	T			0/24'	H. N.
1/3	0.2	0.066	285.0	—|			1/38'	
»	0.2	»	305.0	—|			2/5'	
»	0.2	»	283.0	—|			0/38'	H. N.
1/5	0.2	0.04	310.0	—|			3/22'	
»	0.2	»	290.0	—|			3/10'	
»	0.2	»	285.0	—|			2/55'	
1/10	0.2	0.02	180.0	—|			1/17'	
»	0.2	»	280.0	—|			4/20'	
»	0.2	»	230.0	—|		0/38'	6/14'	
»	0.2	»	280.0	—|			4/10'	
1/20	0.2	0.01	270.0	—|		0/38'	48 horas	5 dias
»	0.2	»	260.0	—|		0/38'	S	
»	0.2	»	160.0	—|		0/44'	Noite	
»	0.2	»	270.0	—|		0/32'	Noite	
1/40	0.2	0.005	210.0	E —→		0/26'	S	5 dias
»	0.2	»	290.0	—→			S	5 dias
»	0.2	»	290.0	—→	E 0/35'	0/52'	S	5 dias

Legenda: —| queda tetanizante; E — prurido, movimentos mandibulares, movimentos e marcha rotatoria.
S — sobrevida; H. N. — hemorrhagia nasal.
O tempo de morte é dado por uma fracção cujo numerador representa o numero de horas e o denominador o numero de minutos.

QUADRO 7

Acção tetanizante da toxina No. 115 (9), via transocular, em cobaias

Diluição	Volume inoculado	Quantidade absoluta de toxina	Peso da cobaia	Tempo da queda tetanizante, em minutos (0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30)	Symptomas alem de 30 minutos	Volta ao equilibrio	Tempo da morte	Observações
1/1	0.2	0.01	320.0	⊣			0/13'	H. N.
»	»	»	280.0	⊣			0/36'	H. N.
1/10	0.2	0.02	245.0	——⊣			Noite	
»	»	»	310.0	——⊣			4/32'	
»	»	»	240.0	——⊣			5/22'	
1/20	0.2	0.01	285.0	——⊣		1/54'	4/4'	
»	»	»	280.0	——⊣		2/15'	5/42'	
»	»	»	305.0	——⊣			3/45'	
1/25	0.2	0.008	255.0	——⊣		2/0'	4/40'	
»	»	»	250.0	——⊣			5/12'	
»	»	»	290.0	——⊣			5/32'	
1/30	0.2	0.0066	285.0	——E——→		2/23'	S	5 dias
»	»	»	310.0	——⊣		1/12'	Noite	
»	»	»	270.0	——⊣			48 horas	
1/40	0.2	0.005	265.0	——→	E 2/8'		S	5 dias
»	»	»	300.0	——E——→			Noite	
»	»	»	290.0	——→	E 3/12'		S	5 dias

Legenda: ——⊣ queda tetanizante; E. — prurido, movimentos mandibulares, movimentos e marcha rotatoria.
S — sobrevida; H. N. — hemorrhagia nasal.
O tempo de morte é dado por uma fracção cujo numerador representa o numero de horas e o denominador o numero de minutos.

QUADRO 8

Media do tempo da queda tetanizante produzida em cobaias pela inoculação por via transocular de varias toxinas.

Toxinas	Diluição	Volume inoculado em cc.	Tempo da queda tetanizante, em minutos (0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30)	Ausencia de symptomas	% de mortes
A	Pura	0.2	—|		100
B	»	»	—|		100
D	»	»	——|		100
A	1/5	0.2	——|		100
B	»	»	——|		100
C	»	»	——|		100
D	»	»	——————————————————————————›		20
A	1/10	0.2	——|		100
B	»	»	——|		100
C	»	»	——|		100
D	»	»	——————————————————————————›		0
A	1/20	0.2	——|		100
B	»	»	——|		75
C	»	»	——————————————————————————›		66.6
D	»	»	——————————————————————————›		0
A	1/30	0.2	——————————————————————————›		66.6
B	»	»	——————————————————————————›		50
C	»	»	——————————————————————————»		33.3
D	»	»	——————————————————————————›		0
A	1/40	0.2	——————————————————————————»		33.3
B	»	»	——————————————————————————›		0
C	»	»	——————————————————————————›		0
D	»	»	——————————————————————————›		0

Legenda: ——\| Tempo medio da queda tetanizante, em series de cobaias variaveis em numero (3, 4, 5 e 6).

——› Alguns animaes apresentam a syndroma tetanizante typica, outros somente os phenomenos cerebellares da syndroma nos 30 minutos de observação.

——» Alguns animaes apresentam tardiamente os symptomas cerebellares da syndroma, enquanto que outros nada mostram.

——› Nenhum symptoma accentuado.

QUADRO 9

Acção tetanizante da toxina estaphylococcica avaliada em funcção da concentração

Diluições da toxina	Volume inoculado em cc.					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
1/2.5		++5' / †				
1/5	0.02 ++22';R. / †	++9' / †				
1/10	0.01 ++20';R. / †	0.02 ++12';R. / †				
1/20	0.005 +33';R / †	0.01 +26';R. / †		0.02 ++8' / †		
1/30		0.0066 θ / S	0.01 θ / †.			0.02 + / †
1/40		0.005 θ / S		0.01 θ / S		
1/50		θ / S			0.01 θ / S	
1/60		θ / S	0.005 θ / S			
1/80		θ / S		0.005 θ / S		
1/100		θ / S			0.005 S / θ	

Legenda:

++22' : queda tetanizante em 22 minutos

\+ : movimento e marcha rotatoria, perda momentanea do equilibrio

R : retoma o equilibrio

† : morte nas 24 horas

†. : morte nas 48 horas

θ : nenhum symptoma

S : sobrevida em 5 dias.

nervosos, banhando-os mais em superficie do que em profundidade; outrosim, devemos levar em conta que a fixação da toxina sobre a cellula nervosa obedece, talvez, ás mesmas leis que regem as colorações vitaes electivas, regulando-se por um coefficiente de repartição, solubilidade e penetração, ou ainda ás leis de adsorpção por superficies limitadas entre systemas micro-heterogenos ou colloides. As inoculações de toxina corada pela fuchsina, em identicas diluições ás da experiencia, mostram-nos que tanto maior é a superficie do cerebro corada, quanto maior é o volume do liquido inoculado. Assim, a inoculação de 0,1 cc. da toxina corada attinge somente a superficie dos orgãos que repousam na caixa craniana; a de 0,2 cc. cora não só essa região, como parte do cerebro e do cerebello do lado opposto ao da inoculação; as de 0,3 cc. e de 0,4 cc. chegam a corar até os pontos mais elevados do cerebro, corando praticamente toda a superficie da massa encephalica. Como a acção da toxina é immediata, não sendo assim sujeita a outros factores como o da absorpção, de acção mais prolongada, é facil de presumir que uma maior extensão do tecido nervoso é submettida á acção da toxina, si esta é inoculada em maior volume. Este facto é corroborado pela experimentação que nos mostra que, si de uma mesma diluição da toxina, inocularmos 0,1 cc., 0,2 cc., 0,3 cc. e 0,4 cc. em cobaias, os tempos de queda tetanizante desses animaes serão tanto menores quanto a quantidade inoculada é maior. O coefficiente de repartição da toxina, nestas condições experimentaes, para qualquer de suas diluições, permanece o mesmo para um determinado volume inoculado. O facto, porém, das concentrações menores enfraquece o poder de fixação que se torna nullo, quando attinge determinada diluição. A inoculação, por exemplo, de 0,1 cc. da diluição a 1/20 banha determinado territorio, mas, como nessa diluição a toxina está dentro do seu limiar de fixação, o animal apresenta os symptomas tetanizantes; a inoculação de 0,2 cc. da diluição a 1/40 reparte-se em um territorio muito maior, mas, como o limiar de fixação da toxina está aquem dessa diluição, o processo fixador não se realiza e, embora as quantidades absolutas de toxina inoculadas sejam as mesms, os animaes reagem irregularmente, ou nada apresentam.

Essa experiencia sugere a falta de especificidade (neurotropismo) da toxina estaphylococcica para o tecido nervoso. Reproduzindo as experiencias classicas de Wassermann e Takaki (71), sobre a adsorpção da toxina tetanica pelo tecido nervoso, verificamos que o filtrado estaphylococcico, após contacto mais ou menos prolongado com esse tecido, não perde o seu effeito mortal e tetanizante. Os animaes inoculados repetidas vezes com doses não mortaes de toxina, por via subcutanea, intradermica, venosa e, mesmo, carotidiana, não mostram symptomas nervosos que possam affirmar o neurotropismo da toxina.

— Os resultados registados nos quadros 6, 7 e 8 e os obtidos com varias outras toxinas inoculadas na dose de 0,2 cc. de diluições mais estreitas (ver mais adiante), permittem estabelecer: a) uma dose tetanizante symptomatica (D. T. S.), que assignala o limite de actividade symptomatica da toxina, limite em

que se notam irregularidades no apparecimento dos symptomas, podendo produzir uma queda tetanizante tardia definitiva ou somente symptomas de excitação, tal como prurido, movimentos mandibulares, movimentos e marcha rotatoria, perda momentanea do equilibrio, ou nada produzir em certos animaes mais resistentes; b) uma dose tetanizante letal (D. T. L.), que representa, em funcção da concentração, a menor dose de toxina capaz de produzir systematicamente a syndroma nos 30 primeiros minutos após a inoculação e a morte nas 24 horas, em todas as cobaias inoculadas. Estes dados e o da neutralização da acção tetanizante da toxina pela antitoxina, foram aproveitados para o estabelecimento de um novo processo de doseamento da antitoxina, do qual falaremos mais adiante.

A toxina inoculada por via lombar na rache do coelho produz rapidamente a paralysia dos membros posteriores e, quando inoculada em doses acima de 0,5 cc., tardiamente (4 a 5 horas mais tarde), causa os symptomas cerebraes e sobretudo o opisthotono, que progridem muito lentamente. Os animaes geralmente morrem na noite do dia da inoculação.

Sob a marcose. pelo chloroformio, ou pelo ether, os symptomas tetanizantes diminuem de intensidade e mesmo desapparecem, mas retornam á actividade primitiva logo que o animal volta ao normal.

Cortes histo-pathologicos, feitos em cerebros e cerebellos de cobaias inoculadas, mostram uma degeneração do typo hydropico das cellulas desses orgãos, phenomenos de polychromatolyse e extravasamento sanguineo em determinados pontos, com lyse dos globulos vermelhos. Nos animaes que morrem 4 ou 5 horas após a inoculação da toxina não se observa reacção da neuroglia. Para o lado das meninges, observa-se ligeira infiltração leucocytaria.

Como testemunhas foram inoculadas cobaias, não só com o caldo usado para as culturas collocado sob as mesmas condições de experiencia, como tambem com toxinas diphterica e tetanica, filtrados de culturas de *E. typhi*, gonococco, estreptococco, meningococco, veneno de jararaca e solução de trypsina. Somente com as inoculações de filtrados de culturas de meningococco em meio hormonico de Huntoon e de estreptococco hemolytico conseguimos, quando eram inoculadas doses elevadas (0,3 cc. a 0,5 cc.), um effeito semelhante, porem os animaes retomavam o equilibrio muito facilmente, em alguns minutos, embora morressem nas 24 horas.

h) Acção GASTRO-INTESTINAL — Desde as observações de Barker (5), nas Philippinas, foi aventada a hypothese de certos alimentos contaminados por estaphylococcos produzirem, quando ingeridos, symptomas gastro-intestinaes (salivação, nauseas, vomitos, dores abdominaes, diarrhéa profusa, prostração e tremores de frio), mais ou menos accentuados.

De então para cá appareceram varios trabalhos nesse sentido que

são mencionados num artigo recentemente publicado por McBurney (33).

As experiencias de Dack e collaboradores (13), reproduzindo em voluntarios a syndroma gastro-intestinal pela ingestão de filtrados de culturas de estaphylococcos isolados de um bolo que occasionara a syndroma em 10 pessoas; as de Jordan e McBroom (21), e as de Woolpert e Dack (66), fazendo apparecer em macacos a sysdroma toxica, tambem por ingestão de filtrados de culturas de estaphylococcos; as de Ramsy e Tracy (58), em gatinhos, por ingestão de culturas de estaphylococcos em leite, sabidamente responsaveis pela gastro-enterite no homem; e, ultimamente, as de Borthwick (6), em cobaias e coelhos, quer pela inoculação directa no estomago, quer pela via intra-rectal, irrigando previamente estes orgãos com salina e ajustando o pH a 7,3 — todas demonstraram fartamente que o filtrado estaphyloccico é capaz de provocar esta syndroma gastro-intestinal.

Woolpert e Dack, em trabalho recente, acreditam que o veneno gastro-intestinal esteja ligado a um principio activo distincto dos demais principios toxicos dos filtrados estaphylococcicos, embora estes (hemolysina, leucocidina, dermo-toxina, leto-toxina) estejam sempre nelles presentes e guardem proporcionalmente certa relação quantitativa entre si. Pelo aquecimento e pela filtração já se conseguiria grosseiramente dissociar o veneno gastro-intestinal dos demais principios, o que se tornaria evidente pela neutralização do filtrado pela antitoxina que, neutralizando os demais effeitos, deixaria livre o veneno gastro-intestinal (experiencias em macacos). Poder-se-ia pensar numa destruição da antitoxina no tracto gastro-intestinal, mas o mesmo não acontece com a mistura toxina-antitoxina botulinica, e, alem disso, macacos immunizados passivamente não se mostraram immunes ao filtrado por via oral.

III — Unidade versus pluralidade de principios activos. Relação quantitativa entre as varias acções toxicas

O problema da unidade ou da pluralidade de principios activos responsaveis pelas varias acções toxicas dos filtardos estaphylococcicos, tem sido encarado sob pontos de vista diversos, pelos experimentadores que estudaram o assumpto.

Neisser e Wechsberg (36) acreditam que a leucocidina poderia ser adsorvida dos filtrados por leucocytos, sem que fosse destruida ou diminuida a acção erythrocytolytica dos mesmos.

Parker (43), em alguns de seus filtrados que exerciam accentuada acção dermo-toxica, não encontrou nenhuma acção letal quando inoculados por via venosa em coelhos. Por outro lado, filtrados activamente hemolyticos seriam desprovidos de acção necrosante.

Weld e Gunther (46) mostram que o principio erythrocytolytico pode ser separado da dermo-toxina por uma technica de saturação do filtrado com estroma de hematias de carneiro. Gengou (15) e Nélis (37), ao contrario, não conseguiram, pela adsorpção do principio activo com sangue, a dissociação das varias acções toxicas da toxina. Para Gross (14) o principio erythrocytolytico teria no caldo de cultura formação anterior á dermo-toxina e, em certos filtrados, esta alcançaria uma actividade muito superior áquelle.

Julianelle (23), por ter encontrado amostras de estaphylococcos que, embora produzindo forte erythrocytolysina, não mostravam nenhum traço de leucocidina e vice-versa, julga que a hemolysina e a leucocidina são independentes uma da outra.

Panton e Valentine (51) tambem se incluem entre os dualistas; como foi referido anteriormente, quando do estudo da erythrocytolysina, estes auctores acreditam tambem na possibilidade da existencia de hemolysinas distinctas para hematias de differentes especies animaes e da humana.

Glenny (47) teria encontrado duas hemolysinas com anticorpos distinctos.

Burnet (1), entretanto, encontra certa relação numerica entre os poderes necrosante e mortal da toxina (1/400) e assenta com mais segurança o seu modo de pensar unicista no facto de 5 antitoxinas, preparadas com 5 filtrados de amostras diversas, apresentarem uma relação muito estreita na neutralização desses differentes effeitos. Uma unidade anti-mortal das 5 antitoxinas corresponderia grosseiramente a 10 unidades anti-necrosantes e a 160 anti-hemolyticas. Essas experiencias deixariam demonstradas, não só a identidade antigenica das toxinas preparadas com varias amostras de estaphylococcos, como a realidade de uma antitoxina neutralizando as differentes propriedades de um unico principio activo. Com effeito, no caso da existencia de varios principios responsaveis pelas differentes acções toxicas da toxina, as neutralizações dessas acções toxicas não se mostrariam em tão estreita e constante relação numerica, dados os graus de antigenicidade differentes que forçosamente teriam esses varios principios toxicos. A transformação rapida da toxina em toxoide seria responsavel pela falta de concordancia absoluta entre os valores das differentes acções da toxina.

Dolman (12), Gengou (15) e Nélis (37), tambem são unicistas.

As acções coagulante do plasma e fibrinolytica, que, nos seus ultimos trabalhos, Gengou attribue a um unico principio, seriam facilmente dissociadas dos effeitos lyticos, dermo-toxico e letal pela filtração e por sua maior thermo-resistencia.

Gross (14), acredita-a filtravel, mas thermo-resistente a 90.° e desprovida de acção antigenica.

Sudhues (60) observou tambem que os soros de portadores de infecção estaphylococcica, soros de coelhos infectados, bem como soros de alto titulo anti-erythrocytolytico, não mostram nenhum effeito de neutralização sobre a actividade coagulante do plasma das culturas, quer evitando, quer retardando o tempo da coagulação.

Relativamente no veneno gastro-istestinal, Woolpert e Dack acreditam que este esteja ligado a um principio activo distincto, embora sempre guarde com as demais acções toxicas dos filtrados, uma relação de presença e proporcionalidade. Pelo aquecimento e pela filtração já se conseguiria dissociar o veneno gastro-intestinal, dissociação que se tornaria evidente pela neutralização daquellas acções toxicas pela antitoxina que o deixa livre.

Nas nossas experiencias, os filtrados que mostraram um poder hemolytico accentuado, foram estudados quanto ás suas acções necrosante, mortal e tetanizante e ficou verificado que todos apresentam estas actividades toxicas mais ou menos accentuadamente. No Quadro 10 veem-se as relações numericas das acções erythrocytolytica (para hematias de carneiro) e necrosante, calculadas em relação a 1 minima mortal para 1 K. de coelho. A unidade erythrocytolytica foi avaliada como acima ficou dito (pag. 11), mostrando as toxinas 264 e 21 um maior poder hemolytico na leitura final, após estacionar na geladeira durante a noite, o que não foi verificado para as demais toxinas cujo titulo pouco foi alterado após a 2.ª incubação. Quanto á acção necrosante, os numeros do quadro correspondem á avaliação feita relativamente á menor quantidade de toxina capaz de produzir uma pequena placa de necrose na pelle do coelho e não como fez Burnet, que avaliou a lesão pela extensão do edema. A acção mortal foi avaliada em relação a 1 K. de coelho, inoculando-se por via intravenosa differentes quantidades de toxina e considerando-se como unidade a menor quantidade de toxina que mata 1 K. de coelho em 24 horas.

Os valores encontrados mostram que entre as acções erythrocytolytica e mortal ha uma relação numerica mais ou menos constante: na avaliação pelo maior effeito erythrocytolytico uma quantidade de toxina maior do que a correspondente a 400 D. M. H. e menor do que a correspondente a 800 D. M. H. é necessaria para matar 1 K. de coelho; na avaliação inversa a minima mortal está acima de 100 e abaixo de 200 D. M. H..

QUADRO 10

Relação entre os poderes erythrocytolytico, necrosante e letal

Toxinas	D. M. H. por cc.	D. M. N. por cc.	D. M. L. por cc.	1 D. M. L. equivale a		
	H. carneiro			1 D. M. L.	D. M. N.	D. M. H.
115	800	> 150 < 200	> 4 < 10	> 1 < 1	37.5 20.0	200 80
M. C. A.	400	> 100 < 150	> 2 < 4	> 1 < 1	50.0 37.5	200 100
264	3.200	> 150 < 200	> 4 > 10	> 1 < 1	37.5 20.0	800 320
Af. 4	400	> 50 < 100	> 2 < 4	> 1 < 1	25.0 12.5	200 100
21	1.600	> 100 < 50	< 2 < 4	> 1 < 1	25.0 12.5	800 400

Os valores correspondentes á acção necrosante, avaliada tal como foi referida acima, em relação a 1 D. M. L. para 1 K. de coelho, não guardam uma relação muito definida. Burnet, fazendo a verificação pela extensão do edema, encontrou uma relação de 1/400 entre o poder necrosante e o letal.

No Quadro 11, onde estão analysados os valores toxicos de 3 toxinas conservadas sob toluol e no frigorifico, verifica-se que ha uma certa disparidade entre o poder erythrocytolytico e o poder letal, e, quanto ao poder necrosante, agora avaliado pela extensão do edema, os resultados, do mesmo modo, não guardam uma relação muito definida. Neste mesmo quadro, já agora avaliando o poder tetanizante em relação ás demais acções toxicas da toxina, verifica-se que para as 2 toxinas de poder erythrocytolytico correspondente a 400 D. M. H. por cc., uma quantidade equivalente a 12,5 D. M. H. é necessaria para produzir a syndroma tetanizante nas cobaias e a morte nas 24 horas. Com 6,25 D. M. H., os symptomas evidenciados são ligeiros, morrendo os animaes em 48 horas. A acção tetanizante, igualmente, guarda certa relação com o poder letal, mas, com o poder necrosante, avaliado pela extensão do edema, o parallelismo não é evidente.

Como essas verificações tivessem sido feitas com toxinas conservadas ha dias sob toluol e no frigorifico e os doseamentos realizados em differentes dias,

QUADRO 11

Relações entre os poderes erythrocytolytico, necrosante, letal e tetanizante de toxinas estaphylococcicas.
(Toxinas conservadas sob toluol e na geladeira)

Toxina	Acções das toxinas	QUANTIDADES DE TOXINA EM CC.											
		1 cc.	0.5 cc.	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.0078125	0.0039062	0.0019	0.00097	0.00048
115	D. M. H. para hematias de carneiro. . .	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.0975
	Poder necrosante { Nec.					3.0x3.0	3.5x2.0	3.3x3.0	4.0x2.0	3.0x1.0	1.5x1.0	0.3x0.4	θ
	Poder necrosante { Ed.					5.8x6.0	5.0x4.8	6.4x5.5	6.2x3.4	3.4x2.3	1.7x1.8	0.8x1.0	0.4x0.6
	Poder letal por K.	† 30'	† 48 hs.	θ	θ								
	Poder tetanizante			++†	++†	+†	±†.	0/S	0/S				
Carolina	D. M. H. para hematias de carneiro. . .	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195
	Poder necrosante { Nec.						4.5x1.5	4.0x1.8	3.5x0.6	0.5x0.5	0,3x0.3	θ	θ
	Poder necrosante { Ed.						6.0x3.2	6.2x2.5	4.4x1.8	2.0x1.2	0.6x1.2	0.4x0.6	0.1x0.2
	Poder letal por K.	† 33'	† 20 hs.	θ	θ	++†							
	Poder tetanizante						++†	± S	0/S	0/S			
M. C. A.	D. M. H. para hematias de carneiro. . .	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78		
	Poder necrosante { Nec.					2.0x1.1	1.8x0.7	1.0x0.5	0.4x0.5	θ	θ		
	Poder necrosante { Ed.						2.4x1.8	1.6x1.0	0.8x1.0	0.3x0.2	θ		
	Poder letal por K.	† 35'	† 36 hs.	θ	θ	3.2x2.3							
	Poder tetanizante			++†	++†	++†	±†.	0/†.	0/S	0/S			

Legenda — ++† : queda tetanizante e morte nas 24 horas.
±. : movimentos rotatorios.
θ : nenhum symptoma.
†. : morte em 48 horas.
S : sobrevida em 5 dias de observação.

fizemos outras pesquisas das relações entre o poder erythrocytolytico e o poder tetanizante, sendo a verificação deste realizada no dia seguinte ao doseamento daquelle, em toxinas de preparação recente e em toxinas dessecadas (Quadro 12). O poder erythrocytolytico foi avaliado para hematias de carneiro. Com as toxinas que se mostram mais erythrocytotoxicas para hematias de carneiro necessitamos de uma maior cifra de D. M. H. para produzir a syndroma tetanizante na cobaia, ao passo que com as que mostram effeito erythrocytotoxico menor, já com 2 unidades hemolyticas ou com um pouco mais se consegue uma syndroma tetanizante typica.

A differença que se observa nas relações destas duas acções toxicas, quer nas avaliações de toxinas conservadas, quer nas de toxinas recentemente preparadas e doseadas, deve corresponder ao facto da queda do poder erythrocytolytico, já observada por Burky em relação a este effeito e ao poder mortal, si outras causas estrictamente technicas não estiverem, por sua vez, em jogo. Estas discordancias tambem se podem enquadrar na argumentação de Burnet, sobre a transformação rapida da toxina em toxoide, facto que seria responsavel pela falta de concordancia absoluta entre os valores das differentes acções toxicas dos filtrados. Acreditamos haver certa difficuldade para assentar as relações numericas entre os valores dessas differentes acções, não só pelos argumentos acima expostos, como pelas differenças de technica usadas pelos diversos experimentadores na determinação do poder erythrocytolytico, o que faz variar em quantidade e qualidade as hematias. Accrescem a isso as oscillações de sensibilidade dos animaes empregados na determinação das acções necrosante e mortal. A prova do poder dermo-toxico, por exemplo, avaliada pela extensão do edema ou pelo diametro da placa necrosada, deixa muito a desejar, uma vez que a uma mesma dose limite os animaes reagem differentemente, como assignalámos mais acima, o que foi tambem observado por Burnet, Parish e Clark e por Burky. A prova do poder mortal para coelho, mesmo em funcção do peso, offerece as mesmas variações. Burnet teria encontrado raças de animaes mais sensiveis e, por outro lado, Burky registou maior numero de animaes sensiveis á toxina entre os coelhos adultos. Nós mesmo, por differentes vezes, tivemos variações com uma dose determinada como D. M. L. por K. de coelho, resistindo alguns animaes á inoculação de uma tal dose.

O criterio indirecto adoptado por Burnet, avaliando o poder neutralizador da antitoxina para as varias acções toxicas da toxina, certamente seria o melhor para o julgamento final, si a determinação das unidades limites dessas varias acções toxicas não estivesse revestida de identicas causas de erro. Contudo, podendo uma approximação estreita ser estabelecida, o facto constituiria argumento forte e seguro que falaria em favor de um unico principio activo da toxina.

As nossas verificações neste particular resumiram-se no registo da neutralização das varias acções toxicas da toxina por 3 antitoxinas, oriundas de cavallos em serviço de immunização industrial, recebendo inoculações de anato-

Numero de unidades hemolyticas necessarias para a producção da syndroma tetanizante.
(Verificação em toxinas recentemente preparadas e em toxinas dessecadas)

Toxinas	Unidades hemolyticas para hematias de carneiro											
	1	1.5	2	3.5	5	10	15	20	30	40	80	100
115 (9)	± †.	+ †.	++ †		++ †	++ †		++ †		++ †		
M. C. A.		0/S	± †		+ †	++ †	++ †					
Carolina	0/S			+ †	++ †		++ †					
264 (6)	0/S		0/S		0/S	++ †	++ †	++ †		++ †		
Mistura III						0/S		± S		++ †		++ †
Mistura I					0/S	0/S		0/S		± †.	++ †	++ †
115 (secca)	0/S		++ †		++ †							
Mistura II (secca)	0/S	+ †	++ †		++ †	++ †		++ †			++ †	
Mistura III (secca)	0/S			+ †.	++ †							
264 (secca)					0/S	0/S			++ †	++ †	++ †	

Legenda — 0 : nenhum symptoma da syndroma
± : symptomas ligeiros
+ : symptomas accentuados, sem queda tetanizante
++ : queda tetanizante definitiva
S : sobrevida em 5 dias de observação
† : morte nas 24 horas
†. : morte nas 48 horas.

xina e toxina de differentes amostras de estaphylococcos. Como se vê no Quadro 13, em que resumimos os resultados obtidos, a relação de 1/160, obtida por Burnet entre o poder anti-letal e o poder anti-erythrocytolytico, foi por nós observada 3 vezes sobre 5 verificações. A relação de 1/10, ainda de Burnet, entre o poder anti-necrosante e o anti-letal, foi obtida 1 vez sobre duas verificações. O poder anti-tetanizante, avaliado 2 vezes em face de 1 dose tetanizante symptomatica (D. T. S.) da toxina, correspondeu em relação a 1 unidade anti-mortal do mesmo modo que o poder anti-necrosante. Convem notar que a determinação das unidades limites das acções necrosante e mortal da toxina obedeceu ao criterio estabelecido por Burnet, e a determinação da unidade tetanizante symptomatica foi feita de occordo com os nossos estudos sobre esta acção toxica da toxina. Estes numeros, que se approximam dos obtidos por Burnet, trazem uma contribuição que vem reforçar a hypothese unicista desse experimentador, em relação ás acções hemolytica, necrosante, mortal e tetanizante.

QUADRO 13

Determinação quantitativa da neutralização das differentes acções toxicas da toxina pela antitoxina

Antitoxinas	Doses minimas anti-hemolyticas	Doses minimas anti-necrosantes	Doses minimas anti-letaes	Doses minimas anti-sympto-tetanizantes
Cavallo 80 (anatoxina 630 cc.)	12.000 / 160		75 / 1	
Cavallo 81 (anatoxina 630 cc.)	26.000 / 160		162 / 1	
Cavallo 82 (anatoxina 630 cc.)	16.000 / 160		> 75 < 100 / < 1	
Cavallo 81 (anatoxina 630 cc. — toxina 160 cc.)	36.000 / 180	> 2.500 / 12.5	200 / 1	2.500 / 12.5
Cavallo 82 (anatoxina 630 cc. — toxina 160 cc.)	16.000 / 200	> 800 / 10	> 60 < 80 / < 1	800 / 10

Legenda: o numerador da fracção representa o numero de unidades antitoxicas por cc.; o denominador da fracção dá o numero de unidades correspondentes a 1 unidade anti-letal.

Quanto aos effeitos leucocytolytico, coagulante do plasma, fibrinolytico e acção gastro-intestinal, cujos estudos até agora realizados demonstram correr por conta de principios activos distinctos, somente pesquisas ulteriores poderão esclarecer melhor o assumpto.

IV — Propriedades geraes: resistencia ao calor, á luz, ao envelhecimento; acção dos acidos do alcool e do formol; adsorpção pelo caolim e pelo alume; filtração, concentração e dessecamento.

A toxina estaphylococcica mostra fraca estabilidade, perdendo sua actividade á medida do envelhecimento. A acção erythrocytoxica é a que se mostra inicialmente mais attingida, podendo mesmo perder grande parte de sua actividade sem que as demais acções mostrem uma destruição estrictamente parallela.

Burky (3), com filtrados abandonados á temperatura ambiente, cerca de 1 anno depois, ainda observou acção mortal para o coelho, enquanto que o poder erythrocytolytico se mostrava bastante diminuido ou quasi nullo. Certas de nossas toxinas, conservadas em frascos escuros na geladeira e sob toluol, perderam grande parte do seu poder hemolytico e tetanizante, já no fim de 2 meses; outras conservaram sua actividade por periodo superior (70 dias), embora esse facto aconteça menos frequentemente. Exposta á luz e á temperatura do laboratorio a perda é bem mais rapida. A toxina congelada conserva-se quasi que indefinidamente. No estado secco, a toxina conserva por muito tempo todas as suas actividades. Mesmo a acção erythrocytotoxica, que se mostra geralmente mais diminuida, soffre nesse estado uma baixa relativamente pequena, após 6 meses. O dessecamento pode ser feito, tanto no vacuo, sob a acção do acido sulfurico, como na estufa a 37.° por 24-48 horas, ou ainda submettida a uma corrente constante de ar quente e de temperatura entre 25-30.°. Uma corrente de ar aquecido a 40-45.°, por 24 horas, destroe quasi totalmente as actividades erythrocytolytica e tetanizante do filtrado. (Temos em estado secco, sob chloreto de calcio, toxinas de mais de 1 anno que ainda conservam os seus effeitos toxicos: 0,000125 produz a syndroma tetanizante na cobaia e 0,0000625 hemolysa 0,5cc. de hematias de carneiro a 2%.

A toxina estaphylococcica submettida á acção do calor, conforme a temperatura, perde parcial ou totalmente seus effeitos toxicos.

A 55.° por 15 minutos, uma toxina que doseava 3.200 M. H. por cc., passa a dosear 1.600 M. H. por cc.. Prolongando-se o aquecimento por 30 minutos, o titulo cahe a 800, e, por 1 hora, vem a 200 M. H.. A essa mesma temperatura, durante 30 minutos, o poder necrosante é apenas alterado, mas, por 1 hora, o titulo cahe de metade, provocando placa de necrose, rubor e edema bastante

diminuidos. A essa temperatura, por 1 hora, o effeito tetanizante ainda se mantem quando se inocula 0,2cc. da toxina pura.

A 75.° por 15 minutos, o titulo erythrocytolytico baixa a 800 M. H.; por 30 minutos vem a 400; por 1 hora cahe entre 100 e 200 M. H.. O effeito tetanizante a essa temperatura, por 1 hora, diminue de intensidade, observando-se contudo a syndroma tetanizante na dose de 0,2 cc., mas os animaes retomam o equilibrio em poucos minutos, alguns resistindo á morte nas 24 horas. O poder necrosante, nessa mesma temperatura e espaço de tempo, baixa a 1/3 do titulo, notando-se a placa necrosada muito diminuida de extensão, bem como o rubor e o edema.

A 100.° durante 5 minutos, o poder erythrocytolytico de 3.200 M. H. cahe abaixo de 100 e, prolongando-se o aquecimento por 10 minutos, baixa a 0. A 100.° por 5 minutos, é destruida toda actividade necrosante, mortal e tetanizante da toxina.

Os acidos fortes destroem o poder toxico dos filtrados. Nélis (37) que estudou o assumpto, encontrou que o H2S04 e o HC1 a 5% e a 37.°, destroem completamente a toxina em algumas horas. A 1% e após 24 horas a 37.°, os resultados seriam identicos. O acido acetico a 5% destruiria a toxina somente após 24 horas. O acido tartarico e lactico a 1% e a 5%, não modificariam o poder toxico em 10 dias.

O formol a 0,1% por 24 horas a 37.°, faz baixar a acção erythrocytolytica, mas o poder necrosante ainda é em parte conservado. A 0,3% e 0,4%, a baixa é bem maior nas 24 horas, e, nas 48 horas, o titulo hemolytico baixa a 10 M. H.; 5 cc. por via intravenosa não matam o coelho, mas 0,25 da toxina, por via intradermica, ainda produzem necrose de 1 x 1 cm. de extensão; nesta mesma dose, ainda provoca a syndroma tetanizante na cobaia, esta porem de pequena intensidade, resistindo a maioria dos animaes nas 24 horas. Ajustando-se o pH da toxina para 8,5 e addicionando-se formol a 0,4%, mantendo-se na temperatura de 37.°, a desintoxicação é bem mais rapida.

A filtração retem parte dos principios activos das culturas de estaphylococcos. A estaphylo-coagulase, por exemplo, é retida em grande parte, quando as culturas são filtradas em velas Chamberland. A acção tetanizante mostra um limite de actividade maior nas culturas apenas centrifugadas do que nas culturas filtradas. O mesmo acontece, em menor escala, com as acções necrosante e mortal. Velas Mandler e Berkefeld filtram melhor a toxina. Em discos Seitz, os resultados são superiores a todos os demais.

Pesquisas de adsorpção pelo caolim, talco e alume mostraram-nos que a toxina é facilmente adsorvida por essas substancias. A adsorpção pelo caolim

processa-se já no fim de 2 horas, periodo em que grande parte (cerca de 90%) da toxina é adsorvida. Os resultados da adsorpção da actividade tetanizante de 5 cc. de uma toxina por 1,0 gr. de caolim, são expostos so Quadro 14. Vê-se que uma toxina cuja actividade tetanizante se elevava á diluição de 1/40, exposta á adsorpção pelo caolim, em 10 minutos, baixou a actividade para a diluição a 1/10 e após 2 horas de contacto somente 0,2 da toxina pura produziram a syndroma tetanizante. Com 24 horas de contacto somente a dose de 0,4 cc. da toxina pura foi capaz de produzir a syndroma, com morte do animal após algumas horas. Suspenso o precipitado em caldo Walbum esteril de pH 6,8 — 7,0, não conseguimos rehaver a toxina, o que foi conseguido em parte com salina alcalinizada a pH 8,2.

O hydrato de aluminio preparado segundo a technica C de Willstätter, Krant e Erbacher (69, adsorve a toxina na sua quasi totalidade, mas o eluato com a solução de phosphato não foi conseguido em 2 manipulações.

O alcool absoluto precipita a toxina na proporção de 8 volumes de alcool para 1 de toxina, mas o contacto prolongado do alcool destroe em grande parte o principio toxico.

Dos processos que temos empregado para a concentração da toxina, o melhor é sem duvida o do dessecamento. Este pode ser realizado sem perdas accentuadas, tanto a 37.° por 24 horas, em placas e em camada bem fina, ou sob a acção de uma corrente de ar aquecida a 30.°, por 24-48 horas, quanto no vacuo, sob a acção do acido sulfurico, sendo mantida a tiragem constante afim de evitar a acção deleteria dos vapores do acido. Pelos resultados registados no Quadro 15, verifica-se que a perda da actividade tetanizante da toxina submettida a estes dois processos de dessecamento é relativamente pequena. Neste mesmo quadro é dado o limite de actividade tetanizante da toxina completamente dessecada por uma corrente de ar aquecida a 30.°, por 48 horas, calculada em peso. Vê-se que um pouco mais de 1 decimo de milligrammo do pó é necessario para provocar a syndroma tetanizante na cobaia. A unidade erythrocytolytica desta toxina dessecada foi de 0,0000625, do pó.

V — Producção da toxina *in vivo*.

Para a comprovação definitiva de que o estaphylococco elabora uma toxina soluvel no organismo infectado, seria de interesse verificar si, nos exsudatos de coelhos ou outros animaes inoculados com culturas, se encontraria esse producto toxico. A elaboração *in vivo* da toxina viria assim comprovar o papel toxico dessa bacteria, já evidenciado pelas observações clinicas demonstrativas da profunda intoxicação que acompanha certas septicemias estaphylococcicas, algumas mostrando no mecanismo da morte uma perfeita analogia com o que se observa após a inoculação da toxina por via intravenosa em animaes.

QUADRO 14

Adsorpção pelo caolim.
(5 cc. de toxina + 1,0 gr. de caolim. Agitação constante, verificação no liquido sobrenadante após centrifugação).

Diluições	Volume inoculado	Acção tetanizante inicial	Após 10 minutos de contacto	Após 2 horas de contacto	Após 24 horas de contacto	
					com 0.5 de caolim	com 1.0 de caolim
Pura	0.4					$\frac{++\ 17'}{\dagger\ 6/12'}$
Pura	0.2	$\frac{++\ 1'}{\dagger\ 18'\ \text{H. N.}}$	$\frac{++\ 4'}{\dagger\ 1/16'}$	$\frac{++\ 15'}{\dagger\ \text{N}}$	$\frac{++\ 3'}{\dagger\ 15'\ \text{H. N.}}$	$\frac{+\ 41'}{\text{S}}$
1/5	0.2			0/S		0/S
1/10	0.2	$\frac{++\ 6'}{\dagger\ 2/12'}$	$\frac{+\ 24'}{\dagger\ \text{N.}}$		$\frac{+\ 39'}{\text{S}}$	
1/20	0.2	$\frac{++\ 9'}{\dagger\ 2/9'}$	0/S		0/S	
1/40	0.2	$\frac{+\ 22'}{\dagger\ \text{N.}}$				
1/50	0.2	0/S				

0 = nenhum symptoma; + = symptomas cerebellares sem queda tetanizante;
++ = queda tetanizante definitiva; S = sobrevida em 5 dias;
† 2/9' = morte em 2 horas e 9 minutos.

QUADRO 15

Concentração da toxina

Actividade tetanizante inicial				Concentração á estufa a 37° por 24 horas, de ± 5 vezes					Concentração no vacuo, temperatura ambiente sob a acção do acido sulfurico e tiragem constante, por 24 horas, de ± 10 vezes.					Toxina dessecada sob a acção de uma corrente de ar aquecida a 30°. Acção tetanizante avaliada em peso.	
Diluição	Volume inoculado em cc.	Quantidade absoluta de toxina em cc.	Resultados	Diluição	Volume inoculado em cc.	Quantidade absoluta de toxina concentrada em cc.	Quantidade absoluta de toxina original em cc.	Resultados	Diluição	Volume inoculado em cc.	Quantidade absoluta de toxina original em cc	Quantidade absoluta de toxina concentrada em cc.	Resultados	Quantidade (em peso) inoculada em 0.2 cc. de salina	Resultados
1/5	0.2	0.04		1/5	0.2	0.04	0.2	+ + 3' / † 3/10'	1/50	0.2	0.004	0.04	+ + 7' / † 23' H. N.	0.001 mgr.	+ + 8' / † N.
1/10	0.2	0.02	+ + 6' / † 4/32'	1/50	0.2	0.004	0.02	+ + 16' / † N.	1/100	0.2	0.002	0.04	+ + 18' / † 5/42'	0.000124	+ + 18' / † N.
1/20	0.2	0.01	+ + 16' / † 5/42'	1/100	0.2	0.002	0.01	+ + 1/32' / † N.	1/200	0.2	0.001	0.01	++ 22' / † 5/0	0.0001	+ 57' / S
1/30	0.2	0.0066	+ + 23' / † N.						1/300	0.2	0.00066	0.0066	0/S	0.000075	O/S
1/40	0.2	0.005	+ 2/8' / † N.	1/200	0.2	0.001	0.005	0/S	1/400	0.2	0.0005	0.0005	0/S	0.00005	O/S
1/50	0.2	0.004	0/S												

Legenda: 0 = nenhum symptoma; + = symptomas cerebellares sem queda tetanizante;
++ = queda tetanizante definitiva; S = sobrevida em 5 dias;
† 2/9' = morte em 2 horas e 9 minutos.

QUADRO 16

Elaboração da toxina *in vivo*

Coelhos	Dose e Via	Exsudatos colhidos	Poder hemolytico para hematias de carneiro					Poder necrosante					Poder tetanizante					Verificação da esterilidade
								Exsudato		Exsudato + antitoxina			Exsudato		Exsudato + antitoxina			
			1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	Dose	Resultados	Dose exs.	Dose antitox.	Resultados	Dose	Resultados	Dose exs.	Dose antitox.	Resultados	
2	intravenosa 0.2 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	3 +	4 +	4 +	0.1	e ± v ± n —				0.3	S / +				Esteril
		Peritoneal	H. C.	H. C.	H. C.	2 +	4 +	0.1	e + v ± n —	0.1	1 gotta	e ± v — n —	0.3	+ + 8' / †				»
		Pleural	3 +	4 +	4 +	4 +	4 +	0.2	e — v — n —				0.5	O / †				»
36	intravenosa 0.5 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	H. C.	H. C.	H. C.	0.1	e + v ± n ±	0.1	1 gotta	e ± v — n —	0.2	+ + 6' / †	0.2	1 gotta	O / S	»
		Peritoneal	H. C.	H. C.	H. C.	1 +	4 +	0.1	e ± v ± n —									»
		Pleural	2 +	4 +	4 +	4 +	4 +	0.2	e ± v — n —				0.3	O / †.				»
29	intravenosa 0.5 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	H. C.	H. C.	2 +	0.2	e + v ± n —	0.2	1 gotta	e — v — n —		+ / †				»
		Pleural	2 +	4 +	4 +	4 +	4 +	0.3	e ± v — n —				0.3	O / S				»
58	intravenosa 0.5 cc.	Pericardico						0.3	e + v ± n —				0.3	+ + 5' / †.				»
		Pleural	H. C.	H. C.	4 +	4 +	4 +	0.3	e ± v ± n —				0.3	O / †.				»
		Peritoneal						0.3	e + v + n ±				0.3	O / S				»
60	intravenosa 0.5 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	2 +	4 +	4 +	0.2	e ++ v + n ++									
		Pleural	H. C.	H. C.	4 +	4 +	4 +	0.3	e ++ v + n ±				0.3	+ + 16' / S				»
		Peritoneal	H. C.	H. C.	3 +	4 +	4 +	0.3	e ++ v + n ++				0.3	+ + 3' / † 10' H. N.	0.25	1 gotta	O / S	»
47	intravenosa 0.5 cc.																	
		Peritoneal						0.2	e ++ v ± e ++				0.25	+ + 1' / † N.	0.25	1 gotta	O / S	»

Legenda:

acção necrosante:
- — = negativo
- e = edema: ± menos de 1 cc. / + entre 1 e 2 cc. / ++ mais de 2 cc.
- v = rubor: ± muito ligeiro / + perceptivel / ++ accentuado
- n = necrose: ± muito ligeira / + placa de 1 cm. / ++ placa de mais de 1 cm.

acção tetanizante:
- ++ 8' / † = queda tetanizante em 8 minutos e morte nas 24 horas.
- O = nenhum symptoma nos 30 primeiros minutos de observação.
- + = symptomas cerebellares.
- †. = morte em 48 horas.
- H. N. = hemorrhagia nasal.

As nossas experiencias neste particular constaram de inoculações em coelhos, por via venosa, e, em camondongos, por peritoneal, de 0,5 cc. de emulsão de uma cultura em agar de 20 horas de um estaphylococco virulento, previamente lavada com salina e estandardizada ao No. 3 da escala de Mac Farlum. Após a morte dos animaes, o que occorria geralmente entre 12 e 48 horas, colhiam-se os exsudatos peritoneal, pleural e pericardico, recebendo-os em pequenos tubos sob uma camada de toluol. Vinte e quatro horas depois, ao mesmo tempo que era feita uma prova de esterilidade por semeadura em caldo de uma gotta de cada exsudato, procedia-se ás verificações das propriedades hemolytica, necrosante e tetanizante, e á neutralização das mesmas pela antitoxina. O Quadro 16 motsra os resultados destas differentes provas. Este quadro regista somente os resultados positivos, tendo-se verificado, em 5 outros animaes do mesmo modo inoculados, nenhum resultado toxico dos exsudatos.

Com alguns exsudatos daquelles animaes observámos placas de necrose por vezes muito nitidas, embora na maioria das vezes somente fosse observado edema e rubor. O effeito tetanizante verifica-se com mais nitidez, morrendo a maioria dos animaes nas 24 horas após a inoculação. A antitoxina neutraliza esses effeitos toxicos dos exsudatos.

Estes resultados são demonstrativos da elaboração da toxina *in vivo*.

VI — Poder antigenico da toxina: antitoxina estaphylococcica. *a)* **vias de immunização experimental;** *b)* **neutralização das varias acções toxicas da toxina;** *c)* **relações quantitativas do poder de neutralização das varias acções toxicas;** *d)* **immunização activa e passiva e acções toxicas dos filtrados;** *e)* **poder curativo da antitoxina em relação aos effeitos toxicos da toxina.**

Os filtrados das culturas de estaphylococcos, quando inoculados repetidas vezes em animaes, provocam a formação de uma antitoxina que neutraliza todas as acções toxicas da toxina. Esta antitoxina, já assignalada por varios auctores, foi estudada minuciosamente por Burnet (1) e posteriormente por Parish e Clark (48 e 49), Panton, Valentine e Dix (51 e 52), Dolman (12) e outros, resaltando desse estudo a identidade antigenica de filtrados oriundos de varias amostras de estaphylococcos.

a) Vias de immunização — Repetindo as inoculações de pequenas quantidades de toxina, pelas vias subcutaneas e intradermica, em coelhos, conseguem-se obter titulos antitoxicos por vezes accentuados. Os animaes injectados por via venosa, mostram-se difficilmente immunizaveis, não supportando na maioria das vezes as inoculações de doses crescentes de toxina. Parker já tinha mostrado esse facto, mas Burnet diz ter conseguido uma immunização pe-

quena de animaes inoculados por esta via, com doses sub-letaes de toxina. Quatro coelhos por nós ensaiados, com 2 inoculações de 0,1cc. de uma toxina que matava em 1 hora 1 K. de coelho com 0,5cc., não resistiram a uma terceira inoculação de 0,25cc. da mesma toxina. Por esta via, mesmo em immunização com anatoxina que, por ser atoxica, permitte inoculações de doses crescentes e elevadas do filtrado (ver os resultados mais adiante), não conseguimos resultados satisfactorios, pois os soros dos animaes (coelho) mostraram poder de neutralização quasi nullo. Na immunização de coelhos por via intradermica e subcutanea, as injecções de toxina foram feitas com intervallos de 4 dias e em doses crescentes, tendo sido feitas 4 e 5 inoculações. Sangrámos os animaes 8 dias após a ultima injecção e os soros foram ensaiados sob o ponto de vista da neutralização das acções erythrocytolytica, necrosante, tetanizante e letal da toxina.

b) Neutralização das varias acções toxicas da toxina — Os nossos primeiros ensaios visaram a avaliação da capacidade de neutralização dos differentes soros dos coelhos inoculados em relação a uma quantidade fixa de toxina. Para isso, foi tomada a quantidade de 1 cc. de uma toxina bem activa, á qual eram addicionados 1, 0,5 0,1 e 0,05 cc. e 0,01 dos soros a dosear, completando-se com salina o volume final de cada tubo para 2cc.. Com essas differentes misturas, após incubação em banho-maria a 37.° por 1 hora, foram feitas as provas da maneira seguinte: para avalição do poder anti-erythrocytolytico tomavamos 0,5 cc. da diluição a 1/5 dessas differentes misturas e addicionavamos 0,5 cc. de uma emulsão de hematias a 2%, renovando-se a incubação por mais 1 hora, sendo a leitura final realizada 24 horas depois, tendo os tubos permanecido durante este tempo na geladeira; a prova do poder anti-necrosante foi realizada por inoculações intradermicas no coelho, de 0,1 cc. tambem da diluição a 1/5 dessas differentes misturas; a avaliação do poder anti-tetanizante foi feita pela inoculação transocular de 0,25 cc. dessas mesmas misturas, e, finalmente, a prova do poder anti-letal, inoculando-se 1,5 5cc. das misturas por via venosa em coelhos de mais ou menos 1 K.. 0 Quadro 17 resume os resultados obtidos. O soro do coelho No. 7, de todos o que se mostrou mais activo, neutralizando na dose de 0,1cc. a quantidade de 1 cc. da toxina bem activa (0,25 cc. matavam 1 K. de coelho em 1 hora e 0,2cc. da diluição a 1/30 provocavam a syndroma tetanizante definitiva na cobaia), foi colhido de um animal que já na primeira inoculação intradermica da toxina mostrou necrose pequena (1,0 x 2,0cm) e, nas demais, somente edema e ligeiro rubor. Esse animal, mostrando antecipadamente menor sensibilidade a inoculações intradermicas da toxina, comparativamente aos demais que revelaram lesões necrosantes extensas, embora gradativamente menores, faz-nos pensar numa immunidade anterior, natural ou adquirida. A neutralização de todas as acções toxicas do filtrado por todos os soros ensaiados foi evidente, revelando os varios soros maior ou menor poder de neu-

QUADRO 17

Poder neutralizante de soros de animaes immunizados com toxina para as acções erythrocytolytica, necrosante, tetanizante e letal da toxina

Coelhos	Via de immunização	No. de inoculações	Total de toxina inoculada em cc.	1 cc. toxina + 0.1 cc. soro				1 cc. toxina + 0.5 cc. soro				1 cc. toxina + 0.1 cc. soro				1 cc. toxina + 0.05 cc. soro				1 cc. toxina + 0.01 cc. soro			
				acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal
7	Intradermica	3	0.85	N. C.	0			N. C.	0	O / S	S	H +	0.1x0.2	O / S	S	H+++	3.5x3.0	++ 4' / † 1/31		H. C.	5.0x2.0		† 17'
57	Subcutanea	4	1.85	N. C.	0			N. C.	0	O / S	S	H ++	1.5x1.5	O / S	S	H. C.				H. C.			
52	Subcutanea	4	1.85	N. C.	0			N. C.	0	O / S		H+++	0.3x0.2	++ 14' / † 3/8'		H. C.	3.0x2.3		† 11'	H. C.			
17	Intradermica	5	1.6	N. C.	0	O / S	S	N. C.	0	O / S	S	H+++	1.0x1.5	++ 5' / † N.	† N.	H. C.				H. C.			† 8'
11	Intradermica	4	1.85	N. C.	0			H. +	0.5x1.0	+ 1/23' / † N.	S	H. C.	5.5x1.0	++ 7' / † 39' H. N.	† 2/3'	H. C.				H. C.			
Testemunha				H. C.	3.5x2.5	++ 3' / † 17' H. N.	† 7'	H. C.				H. C.				H. C.				H. C.			

Legenda: N. C. = neutralização completa
H. + = 25 % de hemolyse
H. ++ = 50 % de hemolyse
H. +++ = 75 % de hemolyse
H. C. = Hemolyse completa

$\frac{O}{S}$ = nenhum symptoma tetanizante, sobrevida em 5 dias

$\frac{++\ 14'}{\dagger\ 3/8'}$ = queda tetanizante em 14', morte em 3 hs. e 8 minutos

$\frac{++\ 3'}{\dagger\ 17'\ H.\ N.}$ = queda tetanizante em 3', morte em 17', hemolyse nasal

† N. = morte durante a noite

S = sobrevida em 5 dias de observação.

tralização. Por outro lado, o poder neutralizante de cada soro para as differentes acções toxicas guarda uma relação constante, evidenciando assim a unidade antigenica da toxina.

c) *Relações quantitativas do poder ou neutralização das varias acções toxicas* — A avaliação quantitativa do poder neutralizante de soros de animaes immunizados, para as differentes acções da toxina tomadas em suas diversas unidades (D. M. H.; D. M. N.; D. M. T.; D. M. L.), realizada com soros de cavallos em serviço de immunização industrial, está resumida no Quadro 13 e por esses resultados a identidade antigenica da toxina ficou mais uma vez comprovada.

d) *Immunização activa e passiva e acções toxicas dos filtrados* — Para a verificação na neutralização *in vivo* da toxina pela antitoxina, foram tomados animaes immunizados activa ou passivamente e submettidos á acção da toxina pelas vias intradermica, intravenosa e transocular.

Os coelhos immunizados activamente, cujos soros foram estudados anteriormente, foram submettidos á inoculações intradermica de toxina 14 dias depois da ultima injecção, e, 2 dias após, foram injectados por via intravenosa com uma quantidade de toxina que correspondia a 4 D. M. L. para 1 K. de coelho. O Quadro 18 mostra os resultados dessas provas. Somente o coelho No. 11, justamente o portador de soro menos activo, mostrou pequena necrose no ponto da pelle em que foi inoculado, sobrevivendo, entretanto, á dose por via venosa. Os demais mostraram-se immunes.

— Para demonstrar a neutralização *in vivo* em animaes immunizados passivamente, tomámos differentes coelhos e cobaias que foram submettidos á inoculações de diversas quantidades de antitoxina, sendo posteriormente provados ás acções dermotoxica e mortal e tetanizante da toxina.

1) *acção necrosante* — Dez coelhos foram inoculados por via subcutanea com diversas quantidades de uma antitoxina concentrada, preparada em cavallo, doseando 750 unidades tetanizantes(doseamento pelo nosso methodo, vide mais adiante); 1, 4 e 8 dias depois, receberam por via intradermica, 0,1 cc. de uma toxina que, nessa quantidade, produziu uma lesão necrosante extensa em coelho. Os resultados que se veem no Quadro 19, mostram nos coelhos submettidos á prova, no dia immediato d ainoculação da toxina, ligeiras reacções, sobretudo edema, não se chegando a observar a necrose nitida, o que se verificou no coelho testemunha. Essas reacções mostraram-se muito mais attenuadas, quasi nullas, nos coelhos inoculados com 4 dias de intervallo, quando a absorpção da antitoxina foi completa. Porém, nos ensaios realizados com 8 dias de intervallo, as lesões mostraram-se extensas, com necrose accentuada, demonstrando a eliminação total ou quasi total da antitoxina.

2) *acção mortal* — Coelhos immunizados passivamente com 0,5 cc., 1, 2 e 5 cc. da mesma antitoxina concentrada, preparada em cavallo, foram submet-

QUADRO 18

Coelhos immunizados activamente e submettidos a inoculações intradermica e intravenosa de toxina.

Coelhos	Via de immunização	No. de inoculações	Quantidade de toxina inoculada em cc.	Prova de acção necrosante, 14 dias após a ultima inoculação com		Prova do poder mortal 16 dias após a ultima inoculação com 4 D. M. L.
				0.1 da diluição da toxina a 1/5	0.1 da diluição da toxina a 1/2	
57	subcutanea	4	1.85	0	0	S
52	subcutanea	4	1.85	0	0	S
17	intradermica	5	1.6	0	0.2 x 0.2	S
11	intradermica	4	1.85	1.0 x 0.5	1.0 x 1.0	S
Testemunha	—	—	—	3.5 x 2.5	3.7 x 3.0	† 7'

tidos á prova do poder mortal da toxina, inoculada por via venosa, em dose que matava 1 K. de coelho em menos de 20 minutos. O Quadro 20 mostra os resultados nos animaes assim immunizados e posteriormente submettidos á prova da acção mortal da toxina, decorridos 2, 5 e 9 dias após a inoculação da antitoxina. Os animaes ensaiados com 48 horas de intervallo resistiram nos 5 dias de observação, demonstrando assim uma immunização completa. Dos que receberam toxina após 5 dias, somente 1 coelho, que foi immunizado com uma dose elevada (5 cc.) resistiu aquelle periodo, enquanto que os demais immunizados com doses menores mostraram um tempo de morte muito mais prolongado do que os testemunhas. Os coelhos inoculados após 9 dias morreram nas 24 horas.

3) *acção tetanizante* — O poder preventivo da antitoxina estaphylococcica em relação ao effeito tetanizante da toxina, foi verificado experimentalmente, obedecendo-se ao seguinte criterio: inoculações da antitoxina e da toxina misturadas no momento da injecção e inoculações da antitoxina por differentes vias,

QUADRO 19

Immunização passiva e acção necrosante da toxina

No. dos coelhos	Dose de antitoxina concentrada	Dose de toxina inoculada após 24 horas	Resultado nas 48 horas			Dose de toxina inoculada após 4 dias	Resultado no 5.º dia			Dose de toxina inoculada após 8 dias	Resultado no 9.º dia		
			Edema	Vermelhidão	Necrose		Edema	Vermelhidão	Necrose		Edema	Vermelhidão	Necrose
19	0.5	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	± +	0 +	0 0								
9	0.5					0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	0 ±	0 0	0 0				
30	0.5									0.1 Tox. pura	++	++	++ 9.0 x 2.0
32	1 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	+ ++	+ +	0 ±								
29	1 cc.					0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	± +	0 +	0 ±				++
15	2 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	± +	0 ±	0 ±								
7	2 cc.									0.1 Tox. pura	++	+	+
22	2 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura								0.1 Tox. pura	++	+	++ 1.8 x 1.0
3	5 cc.		0 +	0 ±	0 ±								
55	5 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura				0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	0 +	0 0	0 0				
Test.			++ ++	+ ++	++ ++								
Test.						0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	++ ++	++ ++	++ ++ 2.8 x 3.0				
Test.										0.1 Tox. pura	++	++	++ 3.0 x 3.2

Legenda: O = nenhum symptoma

± = menor de 1 cc.
\+ = entre 1 e 2 cc.
++ = maior de 2 cc.

Vermelhidão: ± = muito ligeira; + = perceptivel; ++ = accentuada

Necrose: ± = muito ligeira; + = placa de 1 cc.; ++ = placa de mais de 1 cc.

No. dos coelhos	Dose de antitoxina concentrada	Inoculação com toxina (via venosa)		Resultados nos 5 dias de observação				
		Dias decorridos após a inocul. da antitoxina	Dose toxina por K.	1 M. T. N.	2 M. T. N.	3 M. T. N.	4 M. T. N.	5 M. T. N.
19	0.5 cc.	2 dias	1 cc.					S
9	0.5 cc.	5 dias	1 cc.		†			
30	0.5 cc.	9 dias	1 cc.	† 1 h. após				
32	1 cc.	2 dias	1 cc.					S
29	1 cc.	5 dias	1 cc.		†			
15	2 cc.	2 dias	1 cc.					S
7	2 cc.	9 dias	1 cc.	†				
22	2 cc.	9 dias	1 cc.	†				
55	5 cc.	5 dias	1 cc.					S
Testemunha	—	—	1 cc.	† 12 minutos após				
»	—	—	1 cc.	† 16 minutos após				
»	—	—	1 cc.	† 7 minutos após				

sendo os animaes, em tempos diversos, posteriormente submettidos por via transocular á acção tetanizante da toxina; as vias empregadas para a inoculação da antitoxina foram a transocular, a cisternal, a lombar e a subcutanea.

I — *inoculações misturadas* — Tomavamos 0,2 cc. da diluição da toxina que correspondia a 2 L † (ver a determinação da L † no doseamento da antitoxina) e 0,2 cc. da diluição da antitoxina que correspondia a 10 e a 150 unidades neutralizantes (doseada pelo nosso methodo) e injectavamos, immediatamente após a mistura feita na propria seringa e no momento da inoculação em 2 series de cobaias. O Quadro 21 mostra que, enquanto as cobaias testemunhas soffrem a queda tetanizante logo após a inoculação das 2 L † da toxina e morrem pouco depois, as cobaias da 1.ª serie, inoculadas com essa quantidade de toxina de mistura com as 10 unidades de antitoxina, mostraram somente alguns signaes da syndroma, sem queda tetanizante definitiva, morrendo 2 cobaias durante a noite e sobrevivendo as outras nos 5 dias de observação. Na 2.ª serie, porém, com 150 unidades de antitoxina, as 4 cobaias inoculadas com a mistura nada apresentaram, sobrevivendo todas nos 5 dias de observação. A avidez da antitoxina pela toxina, nestas experiencias, mostrou-se evidente.

II — *inoculações separadas com 10 minutos de intervallo* — A antitoxina foi inoculada por via transocular, num volume de 0,2 cc., correspondendo a 10 e a 150 unidades neutralizantes e a toxina, 10 minutos após, foi injectada pela

QUADRO 21

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina.
1) Antitoxina e toxina misturadas no momento da inoculação.

Toxina	Unidades Antitoxina	Cobaias experimentadas				Testemunhas
2 L †	10	+ 9' / † N.	+ 56' / † N.	± / S		++ 1' / † 1/17'
2 L †	150	0 / S	0 / S	0 / S	0 / S	++ 1' / † 2/20'

Legenda:
0 = nenhum symptoma.
\+ = symptomas cerebellares, sem queda tetanizante definitiva.
++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos.
S = sobrevida em 5 dias de observação.
† 2/1 = morte após 2 horas e 1 minuto.

mesma via na dose de 2 L †. O Quadro 22 mostra os resultados destas 2 series. Na 1.ª serie, sem que fosse evitada a syndroma tetanizante das cobaias, contudo notou-se o tempo de queda e de morte mais prolongado, relativamente á testemunha. Na 2.ª serie, porém, todas as cobaias inoculadas mostraram protecção completa.

III — *inoculações separadas com* 1 *hora de intervallo* — Nestas experiencias, a antitoxina foi inoculada pelas vias transocular, cisternal e lombar, e a toxina, 1 hora depois, por via transocular, na dose correspondente a 2 L †. Usámos cobaias para as experiencias do poder preventivo da antitoxina por

QUADRO 22

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina.
a) Inoculações separadas, com 10 minutos de intervallo.

Toxina	Unidades Antitoxina	Cobaias experimentadas				Testemunhas
2 L †	10	++ 8' / † 48 hs.	++ 12' / † N.			++ 1' / † 2/2'
2 L †	150	0 / S	0 / S	0 / S	0 / S	++ 1' / † 2/21'

Legenda:
0 = nenhum symptoma.
\+ = symptomas cerebellares sem queda tetanizante definitiva.
++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos.
S = sobrevida em 5 dias de observação.
† 2/1' = morte após 2 horas e 1 minuto.

via transocular e coelhos para as series de inoculações pelas vias cisternal e lombar.

O Quadro 23 regista os resultados das experiencias. Com 10 unidades da antitoxina por qualquer das vias inoculadas, não se verificou a protecção dos animaes, enquanto que com 75 e 150 unidades pelas vias cisternal ou transocular os animaes mostraram-se protegidos, sobrevivendo a maioria delles nos 5 dias de observação. Os coelhos inoculados com antitoxina por via lombar apresentaram symptomas tetanizantes definitivos e morreram nas 24 horas. Procurando verificar a causa dessa falta de protecção, procedémos a inoculações de antitoxina corada pela fuchsina por via lombar em coelhos, e, 1 hora após a inoculação, pela abertura do canal racheano, verificámos que somente a parte

QUADRO 23

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina.

3) Inoculações separadas com 1 hora de intervallo.

Toxina	Antitoxina		Cobaias e coelhos experimentados						Testemunhas
	Unidades	Via							
2 L †	10	transocular	++ 8' / † N.	++ 10' / † 1/13'	++ 3' / † 1/17'				++ 1' / † 1/12'
2 L †	150	transocular	± 20' / S	0 / S	+ 36' / † N.				++ 1' / † 1/14'
2 L †	10	cisternal	++ 3' / † 4/22'	++ 7' / † N.	+ 6' / † N.	+ 8' / † N.			++ 1' / † 1/11'
2 L †	75	cisternal	0 / S	0 / S	± 4' / S				++ 1' / † 2/2'
2 L †	75	lombar	† 4' / † N.	++ 3' / † N.	++ 4' / † N.	++ 7' / † 2/5'	++ 5' / † 31'HN	++ 7' / † 1/10'	++ 3' / † N.

Nota: As experiencias pelas vias cisternal e lombar foram realizadas em coelhos e as pela via transocular, em cobaias.

Legenda: Identica á do quadro 21.

da medulla mais proxima do ponto da inoculação se mostrava corada; mesmo augmentando a quantidade do liquido corado para 1 cc., verificámos somente a coloração de 2/3 da medulla naquelle espaço de tempo. Isso nos indica que pela via lombar, a antitoxina não chegou a banhar os centros nervosos superiores, donde não ter sido verificada a neutralização da toxina.

IV — *inoculações separadas com 3 e 6 horas de intervallo* — Seis cobaias inoculadas por via transocular com 150 unidades de antitoxina divididas em 2 grupos de 3, soffreram, decorridos 3 e 6 horas, a inoculação de 2 L † de toxina. No Quadro 24 reunimos os resultados. Como se vê, uma das 3 cobaias de cada serie não resistiu, enquanto que as demais não apresentaram symptomas e sobreviveram nos 5 dias de observação.

QUADRO 24

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina
4) Inoculações separadas com 3 e 6 horas de intervallo.

Toxina	Unidades Antitoxina	Intervallos	Cobaias experimentadas			Testemunhas
2 L †	150	3 horas	0 / S	+ 17' / S	++ 4' / † N.	++ 1' / † 2/4'
2 L †	150	6 horas	0 / S	0 / S	+ / † N.	++ 1' / † 1/14'

Legenda:
0 = nenhum symptoma.
\+ = symptomas cerebellares sem queda tetanizante definitiva.
++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos.
S = sobrevida em 5 dias de observação.
† 2/1' = morte após 2 horas e 1 minuto.

V — *inoculações separadas com 24 horas de intervallo* — Nestas experiencias usámos para a inoculação da antitoxina as vias cisternal, transocular e subcutanea, provando a protecção dos animaes pela inoculação de 2 L † e com 2 D. T. M., da toxina, por via transocular, após 24 horas. O Quadro 25 mostra os resultados obtidos. Observa-se que, com a inoculação da antitoxina pelas vias cisternal e transocular, até um limite maximo de 280 unidades, e 24 horas após a toxina, não se conseguiu a protecção dos animaes, sendo provavelmente a absorpção da antitoxina sido feita naquelle espaço de tempo. Nas inoculações por via subcutanea, somente com dose ao redor de 3.750 unidades, foi conseguida uma protecção completa das cobaias.

QUADRO 25

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina.
5) Inoculações separadas com 24 horas de intervallo.

Toxina	Antitoxina		Cobaias experimentadas			Testemunhas
	Unidades	Via				
2 L †	100	transocular	++ 23' / † N.	++ 8' / † N.		++ 1' / † 3/22'
2 L †	100	cisternal	+ 18' / † N.	++ 11' / † N.		
2 L †	200	transocular	++ 8' / † N.	++ 7' / † N.		++ 2' / † 2/31'
2 L †	200	cisternal	± 9' / S	++ 56' / † N.		
2 D.T.M.	280	transocular	+ 18' / † N.	++ 17' / † N.	+ 43' / S	++ 5' / † 3/6'
2 D.T.M.	375	subcutanea	+ 34' / S	++ 57' / † N.		
2 D.T.M.	750	subcutanea	+ 15' / † N.	+ 15' / † N.		++ 7' / † N.
2 D.T.M.	1500	subcutanea	+ 18' / S	++ 9' / † N.		++ 5' / † 3/6'
2 D.T.M.	3750	subcutanea	0 / S	0 / S		
2 L †	3750	subcutanea	0 / S			++ 1' / † 22' H.N.
2 D.T.M.	7500	subcutanea	0 / S	0 / S		++ 5' / † 4/12'
2 L †	7500	subcutanea	0 / S			

Legenda: Identica á do quadro 21.

VI — *inoculações separadas com* 96 *horas de intervallo* — Quatro cobaias inoculadas por via subcutanea, 2 com 3.750 unidades de antitoxina e outras 2 com 7.500 unidades, 96 horas após provadas com a inoculação de 2 L † de toxina, mostraram ainda protecção. Das 2 inoculadas com 3.750 unidades, 1 apresentou a queda tetanizante em 17 minutos e morte durante a noite, enquanto que a outra nada apresentou e sobreviveu nos 5 dias de observação. As duas outras inoculadas com 7.500 unidades nada apresentaram e sobreviveram naquelle periodo.

VII — *inoculações separadas com* 10 *dias de intervallo* — Uma cobaia inoculada com 3.750 unidades e 3 outras com 7.500 unidades, por via subcutanea, não resistiram, após 10 dias de inoculação, á prova realizada com 2 D. T. L. da toxina, por via transocular.

e) Poder curativo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina — Na cobaia, uma vez declarada a syndroma tetanizante, mesmo que a intervenção com a antitoxina seja precoce, difficilmente se consegue o restabelecimento de todos os animaes. Com 100, 200 e 300 unidades de antitoxina, inoculadas pelas vias cisternal e transocular, não conseguimos restabelecer o equilibrio de 9 das 10 cobaias inoculadas com 1 L † da toxina, 5 minutos após a queda tetanizante. A unica cobaia que conseguiu restabeelcer-se, retomou o equilibrio 48 minutos após a applicação de 200 unidades de antitoxina e sobreviveu nos 5 dias de observação, enquanto que as outras permaneceram em tetania difinitiva, morrendo a maioria durante a noite da inoculação. O effeito curativo da antitoxina mostrou-se assim muito limitado, não pela falta da neutralização da toxina porventura livre no cerebro, mas pelo facto de não haver *restitutio ad integrum* das cellulas nervosas lesadas mais ou menos profundamente. Em cortes de cerebros de cobaias inoculadas com a toxina e mortas 4 a 5 horas depois, Maffey, dos laboratorios da Faculdade de Medicina de S. Paulo, encontrou a degeneração hydropica das cellulas nervosas, quer do cerebro, quer do cerebello, mais accentuada em certas zonas do que em outras. Em cortes de cerebros de cobaias que morreram muitas horas após a inoculação da toxina, zonas de intensa polychromatolyse, edema, por vezes com lyse accentuada do tecido, podem ser vistos principalmente nas proximidades da base do cerebro. Este effeito accentuadamente necrosante e lytico da toxina estaphylococcica, causador sem duvida da tetania da cobaia, e, quiçá, por analogia, responsavel pelas meningites estaphylococcicas do homem, lesando as cellulas nervosas anatomica e funccionalmente não deixa tempo á intervenção da antitoxina.

VII — Immunização activa e passiva e infecção sob condições experimentaes.

Um dos pontos mais interessantes destes estudos sobre a antitoxina estaphylococcica seria a verificação de sua actividade preventiva em relação ás septicemias. Panton, Valentine e Dix, que já tiveram occasião de experimentar a sua applicação em casos de septicemia do homem, colheram a impressão de um effeito neutralizante do principio toxico, não havendo influencia decisiva sobre a reproducção do estaphylococco *in vivo*. Jamieson (24), tambem em casos de septicemia, interpretou do mesmo modo o effeito da antitoxina. Burnet, em verificações sobre o poder preventivo na septicemia experimental do coelho, observou uma maior resistencia dos animaes immunizados, relativamente aos testemunhas, registando contudo um augmento do numero de germes na corrente circulatoria, tanto nestes, como naquelles.

Parece assentado então que a antitoxina não apresenta um effeito lytico ou de qualquer maneira nocivo ao germe em si, demonstrando exclusivamente um effeito antitoxico. Neste particular, haveria certa analogia com os estreptococcos que, segundo Parish e Okell (49) possuem 2 modos de ataque: um agudo pela toxina e um segundo, septico ou pyogenico. Não seria por isso contraindicada a applicação precoce da antitoxina, uma vez que, neutralizada a toxina, possuidora de acções toxicas que afastam as defesas organicas, restaria ao organismo a integridade dessas defesas, capazes de por si só destruirem o germe.

Procurámos realizar essas demonstrações em coelhos, activa e passivamente immunizados, e submettidos á inoculações intravenosas com culturas de estaphylococcos. Tambem fizemos experiencias em cobaias immunizadas passivamente, e posteriormente submettidas a inoculações cerebraes de culturas. Realizámos ainda verificações sobre o desenvolvimento de uma lesão localizada na pelle, em animaes immunizados, provocada pela inoculação de uma cultura de estaphylococcos em caldo de 20 horas.

No Quadro 26 vemos os resultados das experiencias realizadas com coelhos immunizados activa e passivamente. A immunização activa dos coelhos foi realizada por inoculações intradermicas e subcutaneas de doses crescentes de toxina e de anatoxina, geralmente num total de 5 injecções; para a immunização passiva usámos uma antitoxina preparada em cavallos e concentrada, doseando 750 unidades anti-tetanizantes por cc., em inoculações subcutaneas feitas 24 horas antes da applicação intravenosa de 0,5cc. de uma cultura em caldo, de 20 horas, de uma amostra de estaphylococco virulento. As experiencias de immunização passiva foram feitas em animaes jovens de 300 a 400 grs. e em

QUADRO 26

Immunização activa e passiva e infecção por via intravenosa

Coelhos			Peso	Im. activa		Im. passiva antitoxina 24 hs. antes	Dose de cultura estaphylococcica por k.	Resultados	Toxina nos exsudatos
				Toxina	Anatoxina				
Coelhos novos	Testemunhas	269	350.0	—	—	—	0.5 cc.	† < 24 horas	—
		262	310.0	—	—	—	0.5 cc.	† < 24 horas	++
		239	330.0	—	—	—	0.5 cc.	† < 24 horas	±
	Im. passiva	240	350.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	++
		232	370.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	±
		246	270.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	—
		259	360.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† < 24 horas	—
		241	350.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	+
Coelhos adultos	Im. activa	52	—	4 x 1.85 cc.	—	—	0.5 cc.	† > 11 dias < 12 dias	±
		11	—	4 x 1.85 cc.	—	—	0.5 cc.	† > 12 dias < 13 dias	±
		7 p.	—	—	5 x 7.75 cc.	—	0.5 cc.	† > 10 dias < 11 dias	±
		13	—	—	5 x 7.75 cc.	—	0.5 cc.	† > 9 dias < 10 dias	+
	Testemunhas	50	1.600.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 11 dias < 12 dias	±
		61	1.550.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 9 dias < 10 dias	++
		60	1.870.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 2 dias < 3 dias	++
		53	1.905.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 7 dias < 8 dias	—
	Im. passiva	56	1.750.0	—	—	1.2 cc.	0.5 cc.	Sobrevida > 106 dias	
		51	1.930.0	—	—	2.2 cc.	0.5 cc.	† > 3 dias < 4 dias	
		58	1.830.0	—	—	2.8 cc.	0.5 cc.	† 10 dias	+
		59	1.750.0	—	—	4 cc.	0.5 cc.	Sobrevida > 106 dias	
		54	1.820.0	—	—	2.5 cc.	0.5 cc.	† > 29 dias < 30 dias	—

Legenda: ++ = necrose na pelle do coelho, acção tetanizante para a cobaia (0.3 cc).
+ = edema » » » » , ligeira acção tetanizante para a cobaia (0.3 cc).
± = edema ligeiro na pelle do coelho. sem acção tetanizante para a cobaia (0.3 cc).
— = negativo
. = não foi feito calculo por peso.

animaes adultos de peso entre 1.500 a 2.000 gs.. Um numero elevado de testemunhas foi inoculado somente com a cultura. Logo após a morte dos animaes procurámos verificar si nos exsudatos colhidos existia toxina livre, o que demonstraria uma possivel influencia desta no mecanismo da morte, já por um bloqueio da circulação pulmonar, já por uma lyse mais ou menos accentuada dos orgãos, tal como foi demonstrada pelas experiencias de Nélis e Picard (39).

Vemos neste quadro, na serie de coelhos jovens, mais sensiveis ás inoculações venosas de estaphylococcos, que os testemunhas morrem num espaço de tempo menor do que 24 horas, enquanto que os coelhos injectados previamente com a antitoxina sobrevivem mais tempo, não ultrapassando de 48 horas. Na serie de coelhos adultos, os testemunhas perecem num tempo variavel de 3 a 12 dias, sendo que a maioria morreu entre 7 e 12 dias; os coelhos immunizados activamente tambem pereceram entre 9 e 13 dias (o soro do coelho 13, immunizado com anatoxina por via venosa, não mostrou nenhum poder neutralizador) ao passo que dos coelhos adultos immunizados passivamente, 2 pereceram entre 3 e 10 dias, 1 resistiu 29 dias e os 2 outros ainda sobrevivem por mais de 106 dias. Nestes ultimos animaes não houve uma relação definida entre a morte ou sobrevivencia e a quantidade de antitoxina inoculada. Após 106 dias, estes animaes (coelhos 56 e 59) receberam por via venosa 2 cc. de uma toxina regularmente activa (0,25 matava 1 K. de coelho em menos de 24 horas). O coelho 59 morre em menos de 18 horas, enquanto o 56 sobreviveu.

O poder toxico apresentado pelos exsudatos, embora em gráu não muito elevado, corroborado pela lyse natural do sangue do coração, demonstra que a toxina encontra-se em estado livre. Por outro lado os pequenos abcessos encontrados nos rins, figado e myocardio, o aspecto especial do figado e pequenas hemorrhagias disseminadas, demonstram um estado pathologico especifico desses orgãos.

A ausencia de antitoxina circulante nesse final de infecção, demonstrada pela presença livre de toxina, torna patente o seu exgottamento no decorrer da mesma.

A septicemia que decorre das inoculações de doses macissas de cultura e contingente ás condições de experiencia em animaes de relativa sensibilidade ao germe, não permitte uma reacção organica maior, mesmo com o auxilio da antitoxina. Que ha em inicio uma defesa provavelmente devida á presença da antitoxina não resta duvida, conforme demonstra a sobrevivencia por maior tempo dos animaes immunizados em relação aos testemunhas.

O Quadro 27 mostra os resultados de uma serie de cobaias immunizadas passivamente por via transocular, com doses de antitoxina variando de 100 a 280 unidades e 24 horas depois inoculadas com 0,1 cc. da diluição a 1/10 de cultura recente. Observa-se uma maior sobrevivencia dos animaes immunizados relativamente aos testemunhas.

As nossas pesquisas sobre o desenvolvimento de uma lesão localizada na pelle, em animaes immunizados, provocada pela inoculação de 0,1 cc. de uma cultura de estaphylococcos em caldo, de 20 horas, mostraram: a) em 2 coelhos immunizados por via intradermica com antitoxina circundante ao local da injecção de 0,1 de cultura, não houve nas 48 horas o desenvolvimento da lesão caracteristica; no 3.º dia um pequeno foco purulento foi observado, sem maior desenvolvimento ulterior; nesses mesmos animaes, uma lesão accentuada, embora de dimensões menores do que as observadas no coelho testemunha, occorreu em outro ponto de inoculação não circundado pela antitoxina e afastado do primeiro; b) em 2 coelhos immunizados por via venosa com antitoxina (5 cc. e 2 cc.) um ligeiro ponto purulento surgiu no ponto da inoculação infectante, no fim de 24 horas; esta diminuta lesão regrediu nos dias immediatos; c) no coelho testemunha, que não recebeu antitoxina, no ponto de inoculação desenvolveu-se uma placa de necrose de 3,0 x 3,0, com edema e rubor accentuados, abcedando no dia immediato, trazendo, após a queda do tecido necrosado, a formação de uma escara que perdurou por varios dias.

QUADRO 27

Immunização passiva e infecção por via cerebral

Cobaias	Im. passiva. Antitoxina 24 hs. antes, por unidades	Cultura estaphylococco a 1/10	Resultados
3	—	0.1 cc.	† < 24 horas
65	—	0.1 cc.	† < 24 horas
96	—	0.1 cc.	† 28 horas
39	130	0.1 cc.	† > 3 dias < 4 dias
97	100	0.1 cc.	† 5 dias
133	280	0.1 cc.	† > 5 dias < 6 dias
9	210	0.1 cc.	† 6 dias
4	160	0.1 cc.	† > 8 dias < 9 dias
62	130	0.1 cc.	† > 8 dias < 9 dias

VIII — Anatoxina estaphylococcica: preparação e propriedades.

As exotoxinas, quando tratadas pelo formol e mantidas por certo tempo a uma determinada temperatura, perdem a sua acção toxica, conservando, entretanto, a propriedade antigenica. Opera-se uma transformação, no sentido de Ramon, obtendo-se uma anatoxina, para a qual certos auctores ainda conservam o nome de toxoide de Ehrlich. A toxina estaphylococcica, segundo já foi verificado por Burnet, Parish e Clark, Dolman, Gengou e outros, do mesmo modo, transforma-se em uma anatoxina sob a acção do formol. Sua desintoxicação, muito mais rapida do que a observada com a toxina diphterica, é influenciada, não só pela percentagem de formol usado, como pela temperatura e pH do material. Ella é muito mais rapida em meio alcalino do que em meio acido.

Estudasdo a anatoxina estaphylococcica, procurámos, inicialmente, verificar em que condições sua transformação se opera; posteriormente, fizemos pesquisas sobre o seu poder antigenico, sobre a capacidade de ser fixavel pela antitoxina e sobre o seu poder flocculante.

Os dados fornecidos por Burnet esclarecem muito bem as condições em que se processa a desintoxicação da toxina tratada pelo formol. As nossas verificações foram feitas com a percentagem de 0,2 e 0,4% de formol com toxinas de pH não ajustado (o pH final de nossas culturas tem variado entre 6,8 a 7,6) ou com toxinas previamente ajustadas a um pH 8,2 — 8,4 mantidas a 37.°, avaliando-se em tempos diversos a actividade toxica. Os Quadros Nos. 28, 29, 30 e 31 resumem os resultados obtidos em um desses ensaios.

Esses resultados mostram-nos que a toxina, sob a acção do formol, perde rapidamente o seu poder toxico e mais rapidamente ainda si o pH do material é ajustado previamente para 8,4. Resalta ainda deste estudo o facto de todas as actividades toxicas do filtrado diminuirem parallelamente, não havendo conservação maior de uma ou diminuição mais rapida de outra, o que parece corroborar o argumento da unidade do principio activo, o qual, por si só seria responsavel pelos varios effeitos.

Poder antigenico — O poder antigenico da anatoxina foi ensaiado em coelhos, em cavallos e no homem. As inoculações em coelhos foram feitas pelas vias intradermica, subcutanea e intravenosa. Quatro a cinco injecções de doses crescentes de uma anatoxina completamente atoxica, obtida a partir de uma toxina regularmente activa, ajustada ao pH 8,4 e submettida á temperatura de 37.° por 5 dias, foram feitas com 4 dias de intervallo. Após 8 dias da ultima inoculação, os animaes foram sangrados e doseado o poder neutralizador dos soros para uma determinada quantidade de toxina. Tomámos

QUADRO 28

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37°C.
I — Verificação da acção erythrocytolytica
(numero de D.M.H. por cc.)

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.4 % HCHO
0	1.600		1.600		1.600
4 horas		> 160 < 320	> 80 < 160	> 40 < 80	> 20 < 40
24 horas	1.600	> 40 < 80	> 10 < 20	< 10	0
48 horas		> 10 < 20	> 5 < 10	0	0

QUADRO 29

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37°C.
II — Verificação da acção necrosante.

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.4 % HCHO
0	0.005 cc. necrose 1.0 x 1.2 cm.				
4 horas		0.1 cc. edema, necrose 5.0 x 3.0 cm.	0.1 cc. edema, necrose 3.0 x 4.0 cm.	0.1 cc. edema 1.0 x 0.8 cm.	0.1 cc. edema 0.8 x 0.6 cm.
24 horas		0.2 cc. edema, necrose 1.0 x 1.4 cm.	0.2 cc. necrose ligeira edema 1.0 x 0.8 cm.	0.2 cc. 0	0.2 cc. 0
48 horas		0.4 cc. edema, necrose ligeira 0.6 x 0.5 cm.	0.4 cc. edema ligeiro	0.4 cc. 0	0.4 cc. 0

QUADRO 30

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37° C.
III — Verificação da acção letal.

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.4 % HCHO
0	0.25 cc. por K. † 1/12'		0.25 cc. por K. † 1/42'		
4 horas		2 cc. por K. † 0/16'	2 cc. por K. † < 15/0	2 cc. por K. S	2 cc. por K. S
24 horas		5 cc. por K. S	5 cc. por K. S	5 cc. por K. S	5 cc. por K. S
96 horas		10 cc. por K. S	10 cc. por K. S	10 cc. por K. S	10 cc. por K. S

Legenda: † 1/42' = morte em 1 hora (numerador) e 42 minutos (denominador).
S = sobrevida em 5 dias de observação.
2 cc. por K. = 2 cc. de toxina inoculada por via venosa por 1 K. de coelho.

QUADRO 31

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37° C.
IV — Verificação da acção tetanizante.

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	0.4 % HCHO Tox. pH 8.0—8.2
0	0.01 cc. ++ 16' / † 3/54'				
4 horas		0.1 cc. ++ 8' / † 27' H. N.	0.1 cc. ++ 22' / † N.	0.1 cc. ++ 38' / S	0.1 cc. 0 / S
24 horas		++ 54' / S	0.2 cc. + / S	0.2 cc. 0 / S	0.2 cc. 0 / S
96 horas		+ / S	0.4 cc. 0 / S	0.4 cc. 0 / S	0.4 cc. 0 / S

0.4 cc. a 0.01 cc. = quantidade absoluta de toxina inoculada, por via transocular em cobaias.

$\frac{++\ 8'}{\dagger\ 27'\ H.N.}$ = queda tetanizante em 8 minutos, morte em 27', com hemorrhagia nasal.

$\frac{0}{S}$ = nenhum symptoma, sobrevida em 5 dias de observação.

1cc., 0.1 e 0.05cc. dos soros e misturámos a 1 cc. de uma toxina bem activa (0.25cc. matava 1 K. de coelho em 1 hora; 0.2 cc. da diluição a 1/30 provocava a syndroma tetanizante na cobaia), completando-se com salina o volume final para 2 cc.. Foram verificadas as propriedades hemolytica, necrosante, tetanizante e letal dessas misturas, segundo a orientação seguida anteriormente (p.48).

O Quadro 32 regista os resultados: os soros dos coelhos immunizados por via intravenosa não apresentam um effeito neutralizador apreciavel, mostrando-se esta via impropria para a obtenção da antitoxina; os demais soros, de coelhos immunizados com anatoxina por via intradermica e subcutanea, mostraram um poder neutralizador um pouco inferior aos obtidos com soros de coelhos immunizados com toxina não tratada pelo formol (Quadro 17), embora maiores quantidades de anatoxina tivessem sido usadas.

Estes coelhos, assim immunizados, foram submettidos á inoculação intradermica de toxina 14 dias depois da ultima injecção, e, 2 dias após, foram injectados por via intravenosa com uma quantidade de toxina que correspondia a 4 D. M. L. para 1 K. de coelho.

O Quadro 33 mostra os resultados dessas provas.

Por estes resultados verifica-se que os coelhos immunizados por via intravenosa não se mostraram immunes ás acções necrosante e letal da toxina, ao passo que os demais revelaram immunidade completa.

O estimulo antigenico primario da anatoxina foi melhor apreciado em cavallos. Após uma serie de inoculações subcutaneas com doses crescentes de anatoxina, passou-se a uma segunda serie de inoculações com toxina activa, sangrando-se os animaes após a primeira e depois da segunda serie, sendo os soros doseados pelo methodo que descreveremos mais adiante, baseado na neutralização do effeito tetanizante da toxina. O Quadro 42, onde estão registados os resultados, mostra-nos que em um unico animal foi augmentado o titulo antitetanizante e, assim mesmo, ligeiramente, ao passo que em 3 outros o titulo foi mantido e, em mais um, notou-se uma queda do valor antitoxico do soro. O estimulo antigenico primario da anatoxina é, assim, evidente, attingindo a curva antitoxica do soro dos animaes com ella inoculados, após certo numero de inoculações, o seu maior titulo, o qual na maioria das vezes não é ultrapassado, mesmo que a propria toxina activa seja usada como estimulo antigenico secundario.

Tanto as nossas verificações realizadas em coelhos, como as que fizemos com soros de 3 cavallos em serviço de immunização, em que tambem foi verificado o poder neutralizador desses soros para as differentes acções toxicas da toxina tomadas em suas respectivas unidades (Quadro 13), mostram-nos o parallelismo da neutralização desses varios effeitos, indicativo da unidade antigenica da anatoxina e da unidade da antitoxina.

QUADRO 32

Poder neutralizante de soros de animaes immunizados com anatoxina, para as acções erythrocytolytica, necrosante, tetanizante e lettal da toxina.

Coelhos	Vias de immunização	No. de inoculações	Total de anatoxina inocul. em cc.	1 cc. toxina — 1 cc. soro				0.5 cc. soro 1 cc. toxina —				1 cc. toxina — 0,1 cc. soro				1 cc. toxina — 0,1 cc. soro				1 cc. toxina — 0,01 cc. soro			
				acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lethal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lethal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lethal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lethal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lethal
4	intravenosa	5	7.75	H +++	2.5 x 1.5	$\frac{++5'}{\dagger 47'}$	† 16'	H. C.	2.4 x 1.5			H. C.				H. C.				H. C.			
13	»	»	»	H +++	3.0 x 2.0	$\frac{++5'}{\dagger 4/17'}$	† 12'	H. C.	3.0 x 2.0			H. C.				H. C.				H. C.			
7	subcutanea	»	»	N. C.	0.8 x 1.0	$\frac{0}{S}$	S	H ++	2.5 x 2.0	$\frac{++8'}{\dagger 4/8'}$	1/31'	H. C.	3.0 x 2.0	$\frac{++5'}{\dagger 3/12'}$		H. C.				H. C.			
3	intradermica	5	»	N. C.	0	$\frac{0}{S}$	S	H +	1.0 x 1.0	$\frac{0}{S}$	S	H. C.	2.5 x 2.0	$\frac{++4'}{\dagger 28' H. N.}$		H. C.				H. C.			
12	»	»	»	N. C.	0	$\frac{0}{S}$		N. C.	0	$\frac{0}{S}$	S	H ++	1.5 x 1.2		S	H. C.	3.5 x 3.0	$\frac{++8'}{\dagger 2/36'}$		H. C.			
Testemunha				H. C.	3.5 x 2.5	$\frac{++3'}{\dagger 17' H. N.}$	† 7'	H. C.				H. C.				H. C.				H. C.			

Legenda: N. C. = neutralização completa
H. + = 25 % de hemolyse
H. ++ = 50 % de hemolyse
H. +++ = 75 % de hemolyse
H. C. = hemolyse completa

$\frac{0}{S}$ = nenhum symptoma tetanizante, sobrevida em 5 dias

$\frac{++14'}{\dagger 3/8'}$ = queda tetanizante em 14', morte em 3 horas e 8 minutos

$\frac{++3'}{\dagger 17' H. N.}$ = queda tetanizante em 3', morte em 17', hemolyse nasal

† N. = morte durante a noite

S = sobrevida em 5 dias de observação.

No homem, injecções repetidas de anatoxina em doses crescentes augmentam o titulo antitoxico do soro. No decorrer do tratamento de casos de furunculose, anthrazes, acmes nodulares, osteomyelites, pyodermites, etc., cujos resultados therapeuticos serão posteriormente discutidos em trabalho a ser publicado, tivemos opportunidade de, por vezes, dosear o titulo antitoxico dos soros antes e depois do tratamento. Esse doseamento foi feito pela verificação do poder anti-erythrocytolytico e, tambem, em um numero menor de vezes, pela verificação do poder anti-tetanizante. Para a verificação do primeiro procuravamos qual a menor dose de soro que neutralizava 10 D. M. H. e, para a do segundo, qual a dose de soro que neutralizava 1 L † da toxina (ver mais adiante), calculando-se o numero de unidades por cc..

QUADRO 33

Coelhos immunizados com anatoxina e submettidos ás acções necrosante e letal da toxina.

Coelhos	Via da immunização	No. de inoculações	Quantidade de anatoxina inoculada em cc.	Prova da acção necrosante, 14 dias após a ultima inoculação		Prova do poder letal, 16 dias após a ultima inoculação, com 4 D. M. L.
				0.1 da diluição da tox. a 1/5	0.1 da diluição da tox. a 1/2	
4	intravenosa	5	7.75	1.5 x 1.0 cm.	2.8 x 3.0 cm.	† 4/20'
13	»	5	7.75	0.5 x 1.0 cm.	1.5 x 1.0 cm.	† 6 horas
7	subcutanea	5	7.75	0	0	S
3	intradermica	5	7.75	0	0.5 x 0.5 cm.	S
12	»	5	7.75	0	0	S
Testemunha				3.5 x 2.5 cm.	3.7 x 3.0 cm.	† 7'

O Quadro 34 mostra esses resultados, resaltando o regular augmento do numero de unidades anti-erythrocytolyticas após a serie de inoculações com anatoxina, e, tambem, a neutralização do effeito tetanizante da toxina.

Conclue-se desses estudos que uma toxina, submettida á acção do formol, completamente atoxica, conserva evidente poder antigenico, manifestado pelo augmento crescente do teor antitoxico dos soros dos animaes com ella repetidamente inoculados.

O tratamento das estaphylococcias pela anatoxina só poderia ser um facto evidente: a) si o titulo antitoxico do soro pudesse ser augmentado pelo emprego

therapeutico da anatoxina; b) si se verificasse, antes do tratamento dos pacientes, um titulo antitoxico inferior ao geralmente necessario para serem observadas as curas clinicas; c) si ficasse demonstrado que a cura coincide com o augmento desse titulo.

No Quadro 34, em que damos os resultados dos doseamentos realizados antes e depois do tratamento, de alguns casos submettidos ás inoculações pela anatoxina e clinicamente curados, podemos verificar que todos esses itens são preenchidos. Um unico ponto restaria a comprovar: qual o teor antitoxico dos soros dos individuos normaes? Bryce e Burnet (2) estudaram com minucia o assumpto, doseando o titulo antitoxico de numerosos individuos de varias idades, desde o nascimento até 80 annos e estabeleceram uma curva das medias do teor antitoxico normal por idades. Essa curva, que reproduzimos aqui (Graphico 1), assemelha-se á da diphteria: nos recem-nascidos o teor antitoxico corresponde geralmente ao teor materno, decrescendo em seguida até um titulo praticamente nullo, elevando-se depois gradativamente com a idade até o maximo titulo da curva (entre 80 a 100 unidades), attingido entre 6 e 7 annos de idade. Entre 10 e 20 annos esse titulo baixa para depois subir ao mesmo nivel.

Comparando os titulos de individuos normaes com os titulos que mostraram os pacientes portadores de estaphylococcias, verificamos que só nas osteomyelites se observam e, assim mesmo, em alguns casos, titulos elevados, proximos dos mais baixos obtidos após o tratamento com a anatoxina. Nos demais pacientes, o titulo antitoxico antes do tratamento, ou approximou-se da curva normal, ou mostrou-se apenas ligeiramente superior, não tendo alcançado em nenhum caso o titulo elevado obtido após o tratamento.

Este facto talvez esteja ligado á propria natureza da lesão: na lesão chronica o foco reveste-se de formações diversas, que constituem uma parede defensiva por vezes espessa a delimitar toda a area necrosada; a toxina, dialysando lentamente, forneceria o elemento antigenico que estimularia a formação da antitoxina, mas esta não poderia transpor a barreira (tromboses dos pequenos vasos e lymphaticos, membrana defensiva), pelo menos em quantidade sufficiente para collocar a colonia estaphylococcica em condições de menor aggressividade.

Fixação da anatoxina pela antitoxina — O methodo commummente usado para esta verificação baseia-se no facto de que a união anatoxina e antitoxina torna esta ultima incapaz de neutralizar uma pequena dose de toxina posteriormente addicionada, pelo menos em tempo requerido para que a dissociação não se tenha effectuado.

Usa-se uma antitoxina de titulo conhecido e diluições convenientes de toxina e anatoxina que mostrem um ponto de neutralização em partes iguaes ou em quantidades muito proximas. Numa serie de tubos tomam-se quantidades decrescentes de antitoxina na diluição optima (0,9, 0.85, 0.8, 0.75, etc. até 0.05).

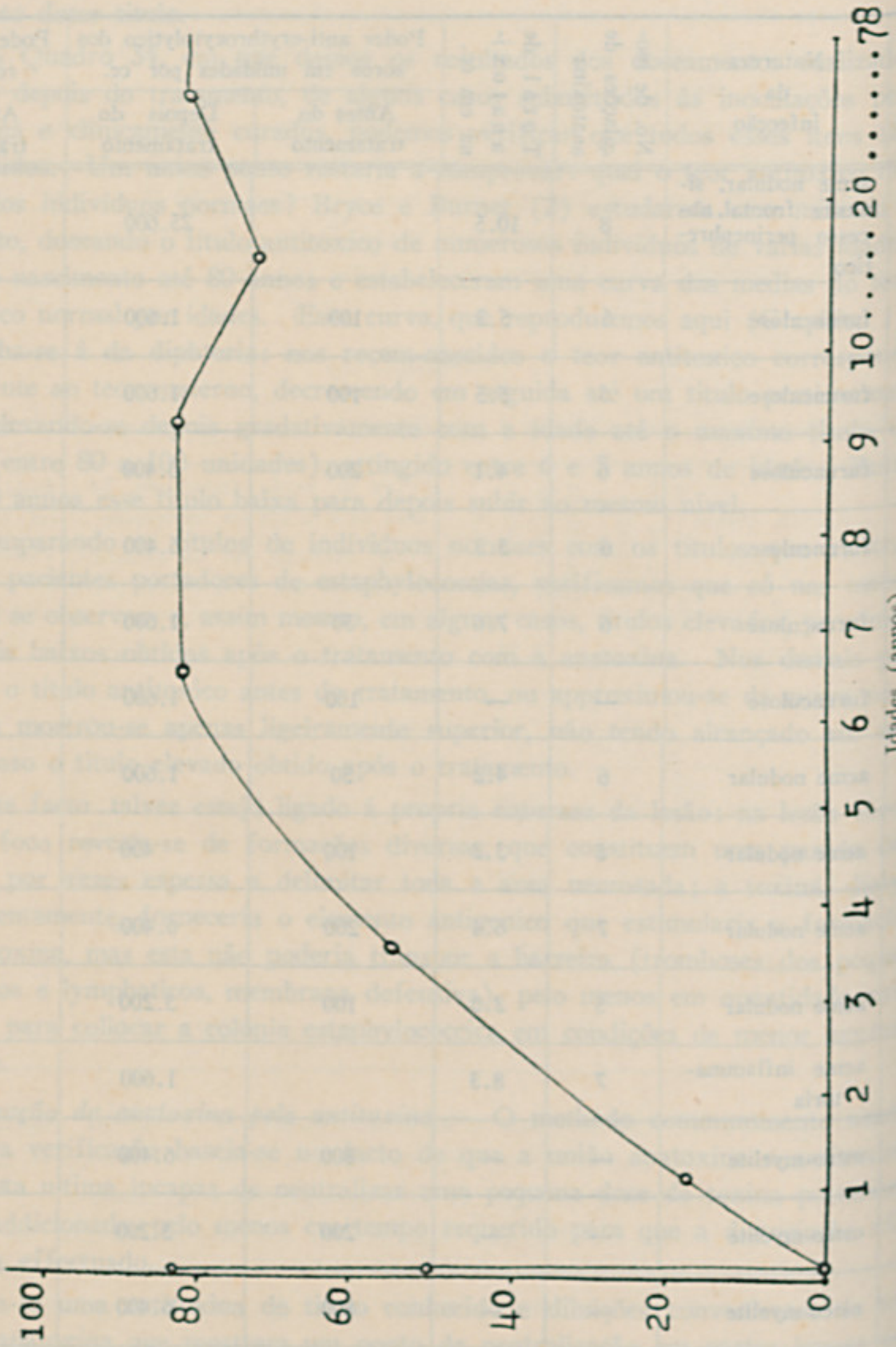
QUADRO 34

Immunização humana com anatoxina (Casos clinicamente curados. Doseamento do teor antitoxico antes e depois do tratamento).

Doentes	Natureza da infecção	No. de inoculações de anatoxina	Total de anatoxina em cc.	Poder anti-erythrocytolytico dos soros em unidades por cc.		Poder anti-tetanizante dos soros em unidades por cc.	
				Antes do tratamento	Depois do tratamento	Antes do tratamento	Depois do tratamento
L. A.	acme nodular, sinusite frontal, abcesso perinephretico	8	10.5		25.600		> 100 < 200
[illegible]	furunculose	6	5.3	100	1.600		
A. L.	furunculose	6	5.5	100	1.600	< 5	25
P.	furunculose	6	4.1	200	6.400		
P.	furunculose	6	5.3		6.400		
P.	furunculose	6	7.6	50	1.600		
L.	furunculose	—	—	100	1.600	< 5	25
C.	acme nodular	6	4.2	50	1.600	< 5	25
A. M.	acme nodular	5	3.2	100	400	< 5	—
P.	acme nodular	7	6.4	200	6.400	< 5	> 25 < 50
B.	acme nodular	5	2.0	100	3.200		
B.	acme inflammatoria	7	8.3		1.600		
O.	osteo-myelite	—	—	800	6.400		
P.	osteo-myelite	—	—	200	3.200		
F.	osteo-myelite	—	—	800	6.400		
D.	sycose	5	3.2	100	1.600		

GRAPHICO I

Desenvolvimento da immunidade estaphylococcica (Curva de Bryce e Burnet).



e quantidades de toxina, tambem na diluição requerida, em quantidades crescentes, completando sempre o volume final para 1 cc. (0.1, 0.15, 0.2, 0.25, etc.). Uma nova serie com anatoxina, substituindo a toxina, é feita nas mesmas condições. Incubam-se essas 2 series em banho-maria por 30 minutos. De cada tubo destas 2 series toma-se 0.75 cc.; dividem-se os tubos em 3 filas com 0.25 cc. para cada tubo, dando no final 6 filas de tubos, 3 com a mistura toxina-antitoxina e 3 com a mistura anatoxina-antitoxina. Para facilidade de exposição denominaremos essas filas de A e AA, B e BB, C e CC, respectivamente. Em A e AA addiciona-se 0.25 cc. de salina, em B e BB 0.25 cc. da diluição da toxina que, no volume final, corresponda a 1 minima hemolytica e em C e CC 0.25 cc. de diluição da toxina que, no volume final, corresponda a 2 minimas hemolyticas. Incuba-se por mais 1/2 hora e addiciona-se, em todos os tubos, 0.5 cc. de uma emulsão a 2% de hematias de carneiro, lavadas. (Nova incubação por 1 hora, permanecendo depois os tubos na geladeira até a manhã do dia seguinte, quando é feita a leitura definitiva.

O Quadro 35 mostra os resultados de uma dessas experiencias. Verifica-se que a anatoxina guarda cerca de 50% do poder de ser fixavel pela antitoxina.

Temos presentemente em andamento um estudo experimental mais minucioso do assumpto, no qual investigamos particularmente as relações existentes entre essa capacidade da anatoxina de ser fixavel pela antitoxina e o ponto optimo de flocculação especifica. Em publicação posterior daremos os resultados desse estudo.

IX — Producção de antitoxina estaphylococcica em escala industrial.

O emprego therapeutico da antitoxina estaphylococcica, já tentado por Valentin, Panton e Dix e por Jamieson e Powell, tem mostrado resultados animadores, evidenciados sobretudo pela neutralização dos phenomenos toxicos.

Porisso, procuramos tambem produzir a antitoxina estaphylococcica em escala industrial, afim de verificarmos as suas propriedades preventivas e curativas no homem.

Immunizámos 8 cavallos, que receberam semanalmente, por via subcutanea, doses crescentes de anatoxina, seguida de uma serie de injecções tambem em doses crescentes, de toxina. A experiencia de Parker, neste particular, serviu-nos para estabelecer este methodo de immunização. Com effeito, a maioria dos animaes de Parker (45), immunizados com doses crescentes de toxina não modificada, pereceram no decorrer da immunização. Dos nossos 8 cavallos, inoculados com uma serie de doses crescentes de anatoxina, seguida de uma outra de toxina. somente 1 morreu, quando já recebia 80 cc. de toxina.

Iniciámos a immunização com 5 cc. de anatoxina por via subcutanea, augmentando gradativamente as doses até attingir 150 cc., inoculados de uma só vez; então era iniciada a serie de injecções de toxina activa, tambem com a dose inicial de 5 cc., gradativamente augmentada até 100 cc.. No ponto de inoculação das injecções com toxina quasi sempre sobrevinha edema, por vezes accentuado, que desapparecia no fim de 4 a 5 dias; alguns animaes apresentaram abcessos que se romperam espontaneamente. As reacções febris, quasi sempre de pequena intensidade, attingiam o maximo na manhã do dia seguinte da inoculação, em nenhum dos animaes ultrapassando 40°, mantendo-se em media a 38°5 e 39°. Durante a immunização os animaes perdiam um pouco de seu peso, sobretudo quando as doses de toxina eram augmentadas, em inicio e bruscamente, de muitos centimetros cubicos. Este inconveniente foi evitado pelo augmento gradativo da dose, não ultrapassando de 20 cc. entre uma inoculação e a seguinte. Sempre que o animal perdia de 10 a 20 Ks. esperavam-se alguns dias para ser effectuada a inoculação seguinte, cuja dose de toxina não era augmentada, repetindo-se a da inoculação anterior.

As inoculações duraram de 4 a 5 meses. Sangrias exploradoras foram feitas no fim da serie de inoculações com a anatoxina, e tambem quando as injecções com toxina attingiram a 50 e 80 cc..

Inicialmente procurámos dosear o titulo antitoxico do soro, verificando o poder de neutralização para as varias acções toxicas da toxina, tomadas em unidades. Assim é que foram verificados os poderes anti-erythrocytolytico, anti-necrosante, anti-tetanizante e anti-letal, da maneira seguinte:

a) para a avaliação do poder anti-erythrocytolytico tomavamos, em partes iguaes, diluições do soro (1/100, 1/200, 1/300, etc.) e uma diluição da toxina que, no volume final, correspondesse a 10 unidades hemolyticas. Essa mistura era incubada a 37° por 1 hora e depois addicionada de igual volume de hematias a 2%, renovando-se a incubação por mais 1 hora. O titulo anti-hemolytico era dado pela quantidade de soro contida no ultimo tubo que não apresentasse hemolyse.

b) o poder anti-necrosante foi avaliado na pelle de coelhos por inoculações de 0.2 cc. de differentes misturas, em partes iguaes, de varias diluições de antitoxina e de uma diluição da toxina equivalente, no volume final, a 1 dose minima necrosante, após incubação a 37° por 1 hora. Considerava-se como D. M. N. a quantidade de toxina contida em 0.2 cc. que produzisse lesão necrosante na extensão de 1 x 1 cm., inoculada por via intradermica.

c) o poder anti-tetanizante foi verificado tambem com misturas em partes iguaes previamente incubadas, de differentes diluições de antitoxina e de 10 unidades tetanizantes symptomaticas: D. T. S. é a dose que assignala o limite da actividade symptomatica da toxina e a ella já nos referimos acima.

QUADRO 35

Fixação da anatoxina pela antitoxina

(Verificação pela prova da hemolyse)

	Anatoxina ou toxina a 1/5 Antitoxina a 1/100	0.25 0.75	0.3 0.7	0.35 0.65	0.4 0.6	0.45 0.55	0.5 0.5	0.55 0.45	0.6 0.4	0.65 0.35	0.7 0.3	0.75 0.25	0.8 0.2	0.85 0.15	0.9 0.1	0.95 0.05
Serie toxina	(Tox. + antitox.) A — 0.25 cc. da mistura + 0.25 cc. salina	4	4	4	tr	tr	tr	3	2	1	1	±	HC	HC	HC	HC
	B — 0.25 cc. da mistura + 1 D. M. H.	4	4	4	tr	3	3	2	1	1	±	HC	HC	HC	HC	HC
	C — 0.25 cc. da mistura + 2 D. M. H.	4	tr	3	2	2	1	1	±	±	HC	HC	HC	HC	HC	HC
Serie anatoxina	(Anatox + antitox.) AA — 0.25 cc. da mistura + 0.25 cc. salina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BB — 0.25 cc. da mistura + 1 D. M. H.	4	4	4	4	4	4	4	4	tr	3	3	3	2	2	1
	CC — 0.25 cc. da mistura + 2 D. M. H.	4	4	4	4	4	tr	tr	3	3	3	2	2	2	1	HC

Legenda:

4 = nenhum traço de hemolyse
3 = 25 % de hemolyse
2 = 50 % de hemolyse
1 = 75 % de hemolyse
± = cerca de 90 % de hemolyse
tr = menos que 5 % de hemolyse
HC = hemolyse completa

d) o poder anti-letal foi avaliado em face de 1 D. M. L. de toxina, considerando-se como tal a menor dose de toxina capaz de matar 1 K. de coelho em 1 hora.

No Quadro 13 vêem-se os resultados desses doseamentos, calculados em relação a 1 cc. de antitoxina (numerador da fracção) e a uma unidade anti-letal (denominador da fracção).

As relações numericas mostradas pelos doseamentos da neutralização pelos soros das varias acções toxicas da toxina, são de tal modo estreitas, que falam a favor da antigenicidade de um unico principio activo e, logicamente, da unidade da antitoxina: uma unidade anti-letal corresponderia a 160 anti-erythrocytolyticas, a 10 unidades anti-necrosantes e anti-tetanizantes. Esse facto veiu corroborar as pesquisas de Burnet, feitas nesse sentido.

O titulo antitoxico seria assim facilmente avaliavel pelo doesamento do poder neutralizante do soro para qualquer uma dessas actividades da toxina, si diversas causas de erro pudessem ser afastadas. Com effeito, a prova mais simples da neutralização do poder hemolytico tem o inconveniente proprio de todas as provas *in vitro*, isto é, de nella intervir o contingente todo pessoal do technico analysta. As provas de neutralização do effeito letal e necrosante, têm contra si, em primeiro logar, a differença de sensibilidade dos animaes; em segundo logar, nas doses multiplas que poderiam ser usadas para afastar esse inconveniente, o volume sempre maior a ser inoculado não torna pratico o seu uso. Por outro lado, a toxina conservada nas condições habituaes, perde, dentro de curto tempo, parte de sua actividade, transformando-se talvez em toxoide. E', portanto, um elemento variavel e de estandardização irregular, além do que a presença do toxoide tornaria falsos os resultados pelo facto de sua fixação á antitoxina.

Por estas razões procurámos um methodo de doseamento que parecesse, por certos motivos, superior aos demais. O facto de a antitoxina ser um elemento praticamente estavel, quando conservada em boas condições (dessecada e guardada no vacuo, ao abrigo da luz e no frigorifico), permitte o seu aproveitamento para dosear a toxina, elemento instavel, tal como se pratica para o doseamento das outras antitoxinas, technica que possue a vantagem de afastar certas causas de erro decorrentes da presença do toxoide.

O doseamento realizado pela pesquisa da neutralização do effeito tetanizante da toxina traria vantagem sobre os demais effeitos não só pelo facto, por nós verificado, de uma determinada dose de toxina produzir, em 100% das cobaias inoculadas, a syndroma tetanizante seguida systematicamente da morte algumas horas após, como pelo facto de, em pequeno volume, podermos concentrar maior numero de unidades tetanizante letaes (D. T. L.), podendo mesmo attingir, si trabalharmos com toxina concentrada ou dessecada, a centenas de unidades, o que permittiria seguir mais estreitamente o methodo usado para

as demais antitoxinas. A inoculação cerebral não será obstaculo maior para a realização desse processo de doseamento desde que se use a via transocular, de technica extremamente simples e rapida.

Este methodo consiste, em ultima analyse, na determinação previa da menor quantidade de toxina que, em presença da unidade de antitoxina tomada como padrão, produz systematicamente a queda tetanizante e a morte em cobaias, dentro de certas bases experimentaes; essa quantidade (L †) é tomada como unidade para a avaliação do poder neutralizante das antitoxinas a dosear.

Fundamentamos então esse methodo sobre as seguintes bases: a) deve ser considerada como unidade tetanizante letal da toxina (D. T. L.) a menor quantidade de toxina que, injectada por via transocular no cerebro de cobaias de 250 a 350 gms., produz, systematicamente, a queda tetanizante nos primeiros 30 minutos de observação e, systematicamente, a morte num periodo de 24 horas; b) deve ser considerada como unidade da antitoxina padrão a menor quantidade de antitoxina que, misturada a 10 D. T. L. de uma toxina recentemente avaliada (na vespera), evita, não só a queda tetanizante dos animaes nos primeiros 30 minutos de observação, como a morte nas 24 horas; c) a L † da toxina é a menor quantidade do filtrado que, misturada a uma unidade de antitoxina, produz, systematicamente, a queda da cobaia nos 30 minutos e a morte nas 24 horas, em 100% das cobaias inoculadas. Estudemos, agora, experimentalmente, a avaliação dessas unidades:

I) Determinação da unidade tetanizante letal da toxina (D. T. L.) — Inoculando-se em uma serie de cobaias, por via transocular, 0.2 cc. de differentes diluições de uma toxina estaphylococcica (1/5, 1/10, 1/20, etc.) consegue-se estabelecer um limite de actividade (D. T. S.), além do qual não mais se evidenciam os symptomas que caracterizam a syndroma tetanizante. Nesta seriação notam-se, entre outros factos, os seguintes: a) o tempo do apparecimento da syndroma, avaliado pela queda tetanizante definitiva da cobaia, aumenta á medida que diminue a quantidade absoluta de toxina; b) varias cobaias, inoculadas com a mesma quantidade (0.2 cc.) de uma das diluições menores da toxina, apresentam com muita regularidade a queda tetanizante no mesmo espaço de tempo, porém, á medida que a diluição se approxima do limite de actividade (D. T. S.), esse tempo de queda torna-se variavel, notando-se tambem certas irregularidades so apparecimento dos symptomas e na occorrencia da morte, que pode faltar nas 24-48 horas; c) as doses maiores de toxina provocam a syndroma tetanizante defintiva seguida de morte dos animaes após algumas horas ou mesmo após alguns minutos, mas, neste ultimo caso, determinam sempre uma hemorrhagia nasal que traduz o edema pulmonar, enquanto que ás doses menores advêm inicialmente os symptomas cerebellares, seguidos ou não da queda tetanizante, retomando alguns animaes o equilibrio.

Numa serie de diluições mais estreitas, abaixo da que marcou o limite de actividade tetanizante symptomatica (D. T. S.), e acima da que produziu a

queda tetanizante nos 30 minutos e a morte em 100% do animaes em algumas horas, é possivel, por inoculações em cobaias, determinar a D. T. L., isto é, a dose minima tetanizante letal da toxina, tal como foi definida acima.

Para a uniformidade dos resultados do methodo devemos ter em conta, na determinação da D. T. L. da toxina, não só o volume a ser inoculado por via transocular em cobaias, como a concentração final da toxina. A concentração da toxina no vehiculo, como vimos anteriormente, tem effeito decisivo na producção da syndroma tetanizante. Determinada dose de toxina que, numa concentração mais elevada, é capaz de produzir a syndroma tetanizante na cobaia, em diluição que ultrapasse certo limite de coscentração (limiar de fixação) é incapaz de produzir qualquer symptoma da syndroma, ou mesmo morte tardia. Na determinação da D. T. L., assim, o volume a ser inoculado deve ser fixo, variando as diluições da toxina como acima ficou dito e não por inoculações de varias quantidades de uma mesma diluição.

Quanto ao volume a ser inoculado, para maior margem das pesquisas e possibilidade de se trabalhar com toxina menos activa, pode ser usado o de 0.4 cc.. Quando são usadas toxinas muito activas ou toxinas concentradas, esse volume deve ser fixado em 0.2 cc.. O volume de 0.4 cc., quando inoculado por via transocular em cobaias, provoca em alguns animaes ligeiros phenomenos de compressão, porem estes desapparecem em poucos minutos, não perturbando os resultados do methodo. O volume usado na determinação da D. T. L. deve ser conservado em todas as operações ulteriores, tomando-se para as misturas toxina-antitoxina, conforme o caso, 0.2 cc. ou 0.1 cc. para a diluição da toxina e 0.2 cc. ou 0.1 cc. para a diluição do soro. E' claro que a toxina, nesses volumes a serem misturados, entrará em dose dupla, ficando na diluição final com a mesma concentração usada na primeira determinação.

Quando já se possue uma antitoxina de padrão conhecido, é possivel mais facilmente controlar a D. T. L. de uma toxina, usando uma prova previa de hemolyse. Para isto, em uma serie de tubos contendo 0.4 cc. de uma mistura, previamente incubada a 37° por 1 hora, de 0.2 cc. da diluição da antitoxina padrão (que corresponde á quantidade que neutraliza 1 D. T. L.) e 0.2 cc. de differentes diluições da toxina a dosear, addiciona-se 1 gotta de hematias de carneiro a 20 %, renovando-se a incubação por mais 1 hora. O tubo que mostra 50 % de hemolyse coincide geralmente com o ponto de neutralização para a cobaia. Como a concordancia dos resultados não se tem mostrado absoluta, este ponto tem-nos servido como ponto de partida para as inoculações na determinação da D. T. L. de toxinas, poupando-se, com este modo de proceder, muitos animaes.

II) Padronização da antitoxina — Nas bases fundamentaes deste methodo deve ser considerada como unidade padrão da antitoxina a menor quantidade de antitoxina que, misturada a 10 D. T. L. de uma toxina recentemente ava-

liada (preferivelmente na vespera), evita, não só a queda tetanizante das cobaias nos 30 primeiros minutos de observação, como a morte dellas nas 24 horas.

Toma-se uma antitoxina oriunda de cavallo immunizado após repetidas inoculações de anatoxisa e procede-se a varias diluições: 1/10, 1/20, 1/30, etc., pipetando-se 0.8 cc. de cada uma dessas diluições para uma serie de tubos. De uma toxina pura, cuja D. T. L. doseada na vespera foi de 0.4 cc. de uma diluição a 1/20, addicionam-se 0.8 cc. em cada tubo, agitando-se a mistura e incubam-se os tubos em seguida a 37° por 1 hora. Após esse periodo, 3 cobaias são inoculadas com 0.4 cc. de cada uma das misturas e observadas convenientemente. O Quadro 36 mostra os resultados: verifica-se que 0.2 cc. da diluição original de 1/40 do soro foi capaz de neutralizar as 10 D. T. L. da toxina. Repetindo-se a verificação somente com 1 D. T. L. da toxina e com diluições 10 vezes maiores da antitoxina (1/350, 1/400, 1/450, 1/500), obtêm-se resultados comparaveis (Quadro 37). Procurando-se em seguida verificar o ponto justo de neutralização, recorre-se á prova de hemolyse, da maneira seguinte: em uma serie de tubos pipetam-se 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 cc. etc. até 0.95 cc. da diluição da toxina a 1/5 e completam-se os volumes de todos os tubos para 1 cc., addicionando-se 0.9, 0.85, 0.8 cc. etc., da diluição da antitoxina a 1/200. Após agitação de todos os tubos e incubação de 1 hora a 37°, addicionam-se a cada 0.5 cc. das differentes misturas 0.5 cc. de hematias de carneiro a 2%. Após incubação de 1 hora os tubos são collocados na geladeira e os resultados lidos na manhã do dia seguinte. No Quadro 38, que mostra os resultados obtidos, verifica-se que, no tubo em que a toxina e a antitoxina se encontraram em partes iguaes, somente ligeiros traços de hemolyse são observados, não chegando mesmo a lysar 5% das hematias, enquanto que, nos demais tubos da direita, se observa um effeito erythrocytolytico cada vez maior, até a hemolyse completa nos ultimos tubos.

Estas 3 verificações, superpondo seus respectivos resultados, permittiram-nos fixar como unidade padrão da antitoxina a dose de 0.005 ou seja 0.2 cc. da diluição a 1/40.

Presentemente temos a nossa antitoxina padrão em estado secco, em tubos em que foi feito o vacuo e fechados á lampada e conservada ao abrigo da luz e no frigorifico. Em duas verificações já feitas, no espaço de um anno, temos encontrado titulo identico ao primitivo.

Nesta ordem de pesquisas damos preferencia actualmente a toxinas congeladas no frigorifico a — 10°, pelo facto do poder toxico manter-se estavel por longo tempo, permittindo verificações espaçadas sem maior causa de erro.

III) *Determinação da L † da toxina* — Nas bases fundamentaes deste methodo, deve ser considerada como L † da toxina a menor quantidade de filtra-

QUADRO 36

Estandardização da antitoxina padrão, com 1 D. T. L. da toxina.

Antitoxina Toxina		Tempo da queda tetanizante, em minutos (2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30)	Symptomas após 30'	Tempo da morte
0.2 de soro a 1/30	1	→	0	S
	2	→	0	S
0.2 de toxina pura	3	→	0	S
0.2 de soro a 1/40	1	→	0	S
	2	→	0	S
0.2 de toxina pura	3	→	0	S
0.2 de toxina pura	1			Noite
	2			4/32'
0.2 de soro a 1/50	3			4/56'
0.2 de soro a 1/60	1			0/32' H. N.
	2			2/27'
0.2 de toxina pura	3			3/2'

0.0005 de soro neutraliza 1 D. T. L. da toxina.

QUADRO 37

Estandardização da antitoxina padrão, com 10 D. T. L. da toxina.

Antitoxina Toxina		Tempo da queda tetanizante, em minutos 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30	Symptomas após 30'	Tempo da morte	
0.2 de soro a 1/350	1	→	0	S	
0.2 de toxina a 1/10	2	→	0	S	
	3	→	0	S	
0.2 de soro a 1/400	1	→	0	S	0.005 de soro neutraliza 10 D. T. L. da toxina
0.2 de toxina a 1/10	2	→	0	S	
	3	→	0	S	
0.2 de soro a 1/450	1	E →	tardio	18/0	
0.2 de toxina a 1/10	2	E →	»	90/0	
	3	E →	»	S	
0.2 de soro a 1/500	1	—		Noite	
0.2 de toxina a 1/10	2	—		Noite	
	3	E →	»	S	

QUADRO 38

Estandardização da antitoxina padrão pela prova da hemolyse.

Toxina a 1/5	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9
Antitoxina a 1/200	0.75	0.7	0.65	0.6	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1
Resultados	4	4	4	4	tr.	tr.	3	2	1	1	±	H. C.	H. C.	H. C.

Legenda:

4 = nenhum traço de hemolyse
tr. = traços de hemolyse < 5 %
3 = 25 % de hemolyse
2 = 50 % de hemolyse
1 = 75 % de hemolyse
H. C. = hemolyse completa.

do que, de mistura com 1 unidade de antitoxina padrão, produz systematicamente a queda tetanizante da cobaia nos 30 primeiros minutos de observação e a morte nas 24 horas, em 100% dos animaes inoculados.

Para a determinação da L † toxinas muito activas devem ser utilizadas e, no caso de toxinas fracas, somente quando previamente concentradas podem servir. Com toxinas dessecadas obtem-se uma margem de experimentação muito maior. Mistura-se a 0.8 cc. da diluição da antitoxina padrão que contem 1 unidade (0.2 cc. da diluição a 1/40 neutralizam 10 D. T. L.) quantidades crescentes, geralmente em centesimos, da toxina, completando-se com salina o volume para 1.6 cc.. Agitam-se todos os tubos e incubam-se por 1 hora. Após esse periodo, 3 cobaias são inoculadas com 0.4 cc. de cada uma das misturas e observadas convenientemente. A menor quantidade de toxina capaz de, após contacto de 1 hora com 1 unidade de antitoxina, produzir a queda tetanizante dentro de 30 minutos e a morte geralmente nas 24 horas, em todas as cobaias, é considerada como a L †. Entre a Lo (ponto de neutralização justa) e a L † ha uma zona de transição, caracterizada pela irregularidade no apparecimento dos symptomas e na morte dos animaes e que corresponde a uma determinada dose de toxina livre praticamente incapaz de, por si só, produzir a queda e a morte em todas as cobaias.

O Quadro 39 mostra uma dessas determinações, realizada com uma toxina 2 vezes mais activa do que a que serviu para as determinações anteriores. Verifica-se que o ponto neutro corresponde á dose de 0.1 cc. da toxina, enquanto que a L† está entre 0.12 e 0.13.

Repetidas verificações da L † de varias toxinas mostraram um comportamento semelhante, com variações de 2 e 3 centesimos a Lo e a L †. Quando se usam toxinas concentradas ou dessecadas, essas variações são mais estreitas, e, nesse caso, devemos trabalhar com diluições que nos permittam fixar as differenças em millesimos.

A determinação de L † deve ser sempre feita na vespera do doseamento das antitoxinas, embora as toxinas congeladas ou dessecadas permittam um espaço de tempo maior entre as duas verificações.

IV) *Doseamento das antitoxinas* — Para o doseamento das antitoxinas, pratica-se uma serie de diluições dos soros a dosar, das quaes 0.8 cc. são addicionados a 4 L da toxina, completando-se o volume de 1.6 cc. com salina. Agitam-se os tubos e incubam-se por 1 hora a 37°. Tres cobaias são inoculadas com 0.4 cc. de cada mistura e observadas convenientemente. Uma prova inicial de hemolyse facilita a determinação do ponto de neutralização. A 0.4 cc. de cada mistura após a incubação, addiciona-se 1 gotta de hematias de carneiro a 20% e incuba-se novamente. O tubo que mostra 50% de hemolyse no fim de 1 hora, coincide as mais das vezes com o ponto de neutralização para cobaias; não sendo, porem, de concordancia absoluta (Quadro 40), elle só servirá de

Determinação da Lo e da L † da toxina 115 (D. T. M. — 001)

Antitoxina / Toxina	Antitoxina / Toxina em 0.4 cc.		Tempo da queda tetanizante, em minutos (0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30)	Symptomas após 30'	Tempo da morte	
0.8 soro dil. '/40 0.36 toxina 0.44 salina	0.005 / 0.09	1 2 3	→	0 0	S S	
0.8 soro dil. '/40 0.4 toxina 0.4 salina	0.005 / 0.1	1 2 3	→ → ×	± E '/53' 0 0	S S	L. 0
0.8 soro dil. 1/40 0.44 toxina 0.36 salina	0.005 / 0.11	1 2 3	→ —| →	+ E °/44' 0	Noite Noite S	
0.8 soro dil. 1/40 0.48 toxina 0.32 salina	0.005 / 0.12	1 2 3	→ —| →	+ E °/54' 0	Noite 2/16' S	L. †
0.8 soro dil. 1/40 0.52 toxina 0.28 salina	0.065 / 0.13	1 2 3	—| —| —|		'/6' 3/26' 2/42'	
0.8 soro dil. 1/40 0.56 toxina 0.24 salina	0.065 / 0.14	1 2 3	—| —|		°/40' HN °/18' HN	
0.8 soro dil. 1/40 0.6 toxina 0.2 salina	0.005 / 0.15	1 2 3	—| —|		°/40' HN 2/57'	

QUADRO 40

Relação entre o grau de hemolyse das misturas toxina-antitoxina e a acção tetanizante

Antitoxinas	Resultados da prova de hemolyse em																	
	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.
	N. C.	N. C.	N. C.	N. C.	25 %	25 %	25 %	50 %	50 %	50 %	> 50%	75 %	50 %	75 %	> 75%	> 75%	H. C.	H. C.
Equino 81 Mistura dos plasmas	$1/25 = \frac{0}{S}$									$1/50 = \frac{++\ 0/30'}{\dagger\ 3/5'}$						$1/75 = \frac{++\ °/14'}{\dagger\ N.}$		
Equino 81 Concentrada				$1/250 = \frac{0}{S}$			$1/275 \begin{matrix} + \\ = \end{matrix} \frac{2/12'}{S}$ $\begin{matrix} + \\ = \end{matrix} \frac{1/36'}{\dagger\ 48\ hs.}$						$1/300 - \frac{++\ 0/19'}{\dagger\ 2/54'}$					
Equino 82 Mistura dos plasmas																$1/25 = \frac{++\ °/15'}{\dagger\ N.}$		
Equino 82 Concentrada	$1/100 = \frac{0}{S}$			$1/125 = \frac{0}{S}$									$1/150 = \frac{++\ 0/16'}{\dagger\ N.}$			$1/175 = \frac{++\ 14'}{\dagger\ N.}$		
Equino 80 Mistura dos plasmas	$1/5 = \frac{0}{S}$						$1/10 = \frac{0}{S}$						$1/20 = \frac{++\ 17'}{\dagger\ N.}$					
Equino 80 Concentrada				$1/50 = \frac{0}{S}$									$1/75 = \frac{++\ 18'}{\dagger\ N.}$			$1/100 = \frac{++\ 7'}{\dagger\ 3/12'}$		
Equino 80 II 1.ª sangria							$1/30 = \frac{+\ 1/12'}{S}$			$1/35 = \frac{++\ 0/46'}{\dagger\ N.}$			$1/40 = \frac{++\ 16'}{\dagger\ N.}$			$1/50 = \frac{++\ 4'}{\dagger\ N.}$		
Equino 83 1.ª sangria	$1/10 = \frac{0}{S}$												$1/20 = \frac{++\ 12'}{\dagger\ 3/10'}$			$1/30 = \frac{++\ 10'}{\dagger\ °/21'\ H.\ N.}$		
Humano L. A. Immunizado com anatoxina	$1/10 = \frac{0}{S}$						$1/20 = \frac{0}{S}$						$1/40 = \frac{++\ 12'}{\dagger\ N.}$					
Mistura de antitoxinas concentradas	$1/50 = \frac{0}{S}$			$1/100 = \frac{0}{S}$			$1/150 = \frac{++\ 15'}{\dagger\ N.}$						$1/200 = \frac{++\ 7'}{1/250}$			$\dagger\ 1/52' = \frac{++\ 15'}{\dagger\ N.}$		

QUADRO 41

Doseamento dos soros dos cavallos 81 e 82, antes e depois de concentrados, pelo methodo da neutralização da acção tetanizante.

L † da toxina = 0.15 / Toxina / Antitoxina	Antitoxina Toxina em 0.4 cc.	Unidades por cc.	Cavallo 81						Cavallo 82					
			% Hemolyse			Effeito tetanizante			% Hemolyse			Effeito tetanizante		
			15'	30'	1 h.	Cobaia 1	Cobaia 2	Cobaia 3	15'	30'	1 h.	Cobaia 1	Cobaia 2	Cobaia 3
0.8 soro a 1/25 0.6 toxina 0.2 salina	0.008 / 0.15	125	N. C	N. C.	N. C.	0 / S	0 / S	0 / S	75	H. C.	H. C.	++ 15' / † N.	++ 14' / † N.	
0.8 soro a 1/50 0.6 toxina 0.2 salina	0.004 / 0.15	250	50	> 50	75	++ 30' / † 3/5'	++ 31' / † N.		H. C.	H. C.	H. C.	++ 6' / † 2/12'		
0.8 soro a 1/75 0.6 toxina 0.2 salina	0.002666 / 0.15	375	H. C.	H. C.	H. C.	++ 14' / † N.			H. C.	H. C.	H. C.	++ 6' / † 1/2'		
0.8 soro a 1/100 0.6 toxina 0.2 salina	0.002 / 0.15	500	H. C.	H. C.	H. C.	++ 6' / † 3/43'			H. C.	H. C.	H. C.			
			após concentração											
0.8 soro a 1/100 0.6 toxina 0.2 salina	0.002 / 0.15	500							N. C.	N. C.	N. C.	0 / S	0 / S	
0.8 soro a 1/225 0.6 toxina 0.2 salina	0.0016 / 0.15	625							N. C.	25	25	0 / S	0 / S	0 / S
0.8 soro a 1/150 0.6 toxina 0.2 salina	0.00133 / 0.15	750							50	75	> 75	++ 16' / † N.	++ 18' / † N.	
0.8 soro a 1/175 0.6 toxina 0.2 salina	0.00114 / 0.15	875	N. C.	N. C.	N. C.	0 / S	0 / S		H. C.	H. C.	H. C.	++ 14' / † N.		
0.8 soro a 1/200 0.6 toxina 0.2 salina	0.001 / 0.15	1.000	N. C.	N. C.	25	0 / S	0 / S	0 / S	H. C.	H. C.	H. C.			
0.8 soro a 1/225 0.6 toxina 0.2 salina	0.00088 / 0.15	1.125	N. C.	25	25	0 / S	0 / S	0 / S						
0.8 soro a 1/250 0.6 toxina 0.2 salina	0.0008 / 0.15	1.250	25	25	25	0 / S	0 / S	0 / S						
0.8 Soro a 1/275 0.6 toxina 0.2 salina	0.000727 / 0.15	1.375	25	50	50	+ 2/12' / S	+ 1/36' / † 48 hs.	+ 1/2' / † N.						
0.8 soro a 1/300 0.6 toxina 0.2 salina	0.000666 / 0.15	1.500	50	75	> 75	++ 19' / † 2/54'								

QUADRO 42

Immunização de cavallos e doseamento pelo methodo da neutralização do effeito tetanizante.

Serie de inoculações com anatoxina					Serie de inoculações com toxina				Mistura dos plasmas de 3 sangrias		Soros concentrados	
Nos.	No. de inoculações	Vol. total de anatoxina inoculado em cc.	No. de dias decorridos da 1a. sangria á 1a. inoculação	Doseamento da 1a. sangria exploradora	No. de inoculações	Vol. total da anatoxina inoculado em cc.	No. de dias decorridos da 1a. á 2a. sangria exploradora	Doseamento da 2a. sangria exploradora	Volume inicial em cc.	Doseamento	Volume final em cc.	Doseamento
80	11	630	71		3	30	21	< 50 < 100	10.000	> 50 < 100	960	> 250 < 375
80 II	8	400	66	> 150 < 200	8	405	52	> 150 < 200	11.200	> 100 < 150	1.650	> 500 < 1.000
81	11	630	70		5	100	39	> 125 < 250	7.800	> 125 < 250	750	> 1.250 < 1.375
82	11	630	70		5	100	39	> < 125	7.000	< 125	680	> 625 < 750
83	8	400	67	> 50 < 100	7	400	52	> 50 < 100	10.900	> 50 < 100	1.580	> 250 < 500
84	9	427	61	> 500	5	155	35	> 350 < 400	10.300	> 300 < 400	1.410	> 2.500 < 3.000
85	9	430	61	> 50 < 100	5	155	35	> 150 < 200	10.500	> 100 < 150	1.330	> 500 < 1.000
86	9	430	61	> 300 < 400	5	155	30	†				

ponto de orientação para as pesquisas nos animaes. O Quadro 41 mostra um desses doseamentos.

E' considerada como unidade de antitoxina a menor quantidade do soro que, inoculada nas 3 cobaias de mistura com a L † da toxina, evita, não só a queda tetanizante nos 30 primeiros minutos, como a morte nas 24 horas.

Este methodo de doseamento foi usado para avaliação das antitoxinas dos differentes cavallos em serviço de immunização e cujos resultados estão resumidos no Quadro 42. Analysando esses valores, vemos que, já no fim da serie de inoculações com anatoxina, se consegue um titulo antitoxico que, na maioria das vezes, perdura no segundo doseamento, feito após as inoculações com toxina activa, o que demonstra o poder antigenico da anatoxina.

Estes resultados mostram-nos ainda a possibilidade de se concentrarem estas antitoxinas pelo methodo commum de precipitações fraccionadas, usado nas varias antitoxinas (diphterica, tetanica, escarlatinica, antivenenos, etc.), chegando-se a obter concentrações de volume e actividade, de 5 a 10 vezes.

Presentemente, temos, distribuida em empolas de 10 cc., antitoxina concentrada, doseando 500 unidades por cc..

Quanto ao seu valor em emprego therapeutico ainda não temos dados que permittam fazer um juizo seguro. Deste ponto occupar-nos-emos em proximo trabalho.

DISCUSSÃO

Os estudos actuaes sobre as propriedades e caracteristicos da toxina estaphylococcica fornecem-nos, não só noções theoricas interessantes, como dados de applicação pratica.

Esta toxi-proteina, existente em estado livre nos meios liquidos e solidos em que foram cultivadas amostras de estaphylococcos toxigenicos, guarda, pelas propriedades que apresenta, um parallelismo evidente com as exotoxinas até agora conhecidas. Com effeito, sua maior elaboração depende, não só da amostra productora, como da constituição do meio de cultura, do pH deste e do ambiente do cultivo; suas propriedades toxicas são especificas, actuam sempre do mesmo modo; a propriedade lytica, que é a principal, é verificavel em doses minimas; a toxina é soluvel na agua e insoluvel no alcool, sendo absorvida pelos precipitados ou coagulos, pelo caolim e pelo alume; é destruida pelos acidos e é sensivel á luz, ao calor e á oxydação; é retida em parte pelos filtros e dialysa lentamente; possue poder antigenico especifico, provocando, no organismo dos animaes injectados, a formação de uma antitoxina, que a neutraliza e possue todos os caracteristicos das verdadeiras antitoxinas; é susceptivel de ser transformada, pela acção do formol, em uma anatoxina, perdendo sua toxicidez, guardando, entretanto, o seu poder antigenico, a capacidade de ser fixada pela anti-

toxina e flocculando especificamente em presença desta (Burnet); age após um periodo de incubação bastante estreito, mas seguramente variavel de accordo com a dose empregada.

Não se trata de um producto de lyse dos germes. Com effeito, a toxina é encontrada com facilidade no estado livre, assim em meios liquidos como em solidos; sua maior elaboração guarda certa relação com o crescimento do germe, baixando o seu teor gradativamente, á medida do envelhecimento da cultura (Julianelle); nem todas as amostras de estaphylococcos pathogenicos são boas productoras dessa toxi-proteina, embora tenham sido isoladas de casos graves, parecendo necessaria a adaptabilidade da amostra ao meio em que se desenvolve; as amostras não pathogenicas não a produzem; necessitam de certas condições de meio de cultivo para elaborarem a toxina em maior quantidade; as amostras boas productoras não a produzem em quantidade apreciavel em meio synthetico (meio de Uschinski) e, bem assim, a toxina não se torna mais abundante após a autolyse das culturas em condições de anaerobiose (Burky); culturas de estaphylococcos lavadas e lysadas (mycolysado de Gratia, bacteriophago) não apresentam a toxina (Gengou); as emulsões de estaphylococcos lavadas, mortas pelo calor ou por outros meios, lysadas (mycolysado) ou submettidas á acção do bacteriophago, têm, quando inoculadas em animaes, acção antigenica diversa da produzida pelos filtrados que contêm a toxina, pois os soros desses animaes não as neutralizam nem flocculam (Gengou); particularmente os centrifugados de cultivos toxicos, lavados e submettidos á acção do bacteriophago, são desprovidos de acção toxica e, inoculados em animaes, não geram do mesmo modo anticorpo que neutralize a toxina ou com esta floccule (Gengou).

Estas razões, hoje bem fundamentadas em pesquisas experimentaes realizadas por não pequeno numero de scientistas (Burnet, Panton e Valetnine, Dolman, Parish e Clark, Gengou, Burky, Nélis, etc.), não nos deixam a menor duvida quanto á natureza desse principio toxico; — trata-se de uma verdadeira exotoxina.

Avulta de valor a natureza deste principio activo elaborado pelos estaphylococcos, quando nos lembramos que este mesmo principio é secretado *in vivo*, conforme revelam as pesquisas que ralizámos e demonstrativas da presença de um principio toxico nos exsudatos de coelhos inoculados por via venosa, com cellulas estaphylococcicas vivas, isentas de toxina, com as mesmas propriedades da toxi-proteina elaborada *in vitro*, inclusive a de ser neutralizada pela antitoxina. A intoxicação do organismo infectado, no decurso de certas septicemais e de certas estaphylococcias apparentemente localizadas, já referidas pelos clinicos, é então um facto real, perfeitamente demonstrado experimentalmente. A elaboração da toxina *in vivo* acarretaria a lyse accentuada das cellulas dos orgãos (figado e rim) e, sobretudo, uma perturbação da circulação pulmonar, reflectindo-se no trabalho do coração esquerdo, processo identico ao verificado

experimentalmente após inoculações intravenosas em coelhos com a toxi-proteina. A diminuição ou abolição completa das defesas organicas, directamente ligada ao ataque mais ou menos accentuado ás cellulas defensivas, pela maior ou menor elaboração da toxina pelo germe infectante, permittiria a invasão cada vez maior do organismo pela bacteria, fornecendo condições optimas para sua maior vitalidade, reproducção e toxigenicidade. Por esse mecanismo, uma infecção estaphylococcica na maioria das vezes localizada, poderia generalizar-se, intoxicar e destruir os elementos mais nobres da economia.

O poder invasor da cellula estaphylococcica, felizmente, é limitado. Menkin (31.ª) demonstrou experimentalmente a existencia de barreira lymphatica, correspondente a uma formação fibrinosa que thrombosa os lymphaticos e que se estabelece em volta de um foco inflammatorio estaphylococcico, já 1 hora depois da inoculação infectante. Nas mesmas condições, seriam precisas, respectivamente, 6 e 30 horas para que em focos inflammatorios provocados por inoculações de pneumococcos e estreptococcos, se estabelecesse o bloqueio da circulação lymphatica. As inoculações subcutaneas, intradermicas e musculares em animaes, de germes medianamente virulentos, provocam lesões localizadas, e, somente com microorganismos altamente virulentos (toxigenicos?) se consegue, por estas vias, uma invasão á circulação sanguinea. A barreira defensiva do organismo só seria efficaz desde que a toxigenicidade da bacteria fosse de pequena monta. Certamente a menor resistencia organica desempenharia papel influente na invasão do organismo pelo estaphylococco; mas, mesmo em organismos normaes, com todo o seu poder defensivo, é possivel a invasão pela bacteria, desde que esta tenha em alto grau o poder toxigenico ou que condições locaes o favoreçam. Seriam, assim, explicadas as septicemias decorrentes de focos limitados e bem localizados, em individuos em pleno estado hygido, tal como foram descriptas e observadas por George e Giroire, Peet, Reed e Stiles, etc. Todavia, que condições locaes seriam essas que poderiam collocar a bacteria em estado optimo de toxigenicidade? Para a producção da toxina *in vitro* ha necessidade de uma certa tensão de CO^2. "A necrose em uma lesão estaphylococcica poderia sobrevir em um foco em que a tensão de oxygenio estivesse diminuida. Fildes, mostrou em seu trabalho sobre tetano que, em um tecido damnificado, uma condição local de anaerobiose pode ser produzida, favoravel á producção da toxina pelo bacillo. Similarmente, um augmento local da tensão de CO^2 pode levar o estaphylococco a produzir a sua toxina" (*72*). Na nossa opinião, o mecanismo deve ser mais complexo. Com effeito, experimentalmente, a elaboração da toxina *in vitro* nem sempre acompanha a gravidade do caso de que foi isolada a amostra em estudo; isto é, estaphylococcos isolados de pacientes que apresentam uma infecção gravissima, com uma intoxicação clinicamente evidente e mesmo intensa, podem ser fracos productores de toxina *in vitro* (em condições de menor tensão de oxygenio e maior de CO^2), enquanto que outros, isolados de lesões localizadas, apparentemente sem exercerem maior

damno para o organismo, a elaboram fortemente. De nossas amostras de estaphylococcos isoladas de septicemia (2) e de meningites (2) mortaes, nenhuma mostrou poder toxigenico comparavel á de certa samostras boas productoras e que foram isoladas de osteo-myelites, pyodermites, furunculose e ulceras. Vemos então, que, pelo menos *in vitro,* as cousas não se passam com a identidade do que se poderia theoricamente suppor. O acertado é que as condições não são as mesmas, e, por enquanto, não temos ainda elementos experimentaes seguros que supportem uma argumentação em prol do facto da maior elaboração da toxina *in vivo* ou *in vitro,* condicionada a este ou áquelle factor. Tudo faz-nos pensar que estas condições existem, tendo sobretudo em vista os symptomas clinicos de intoxicação observados nas septicemias de marcha fulminante e as experiencias demonstrativas da elaboração da toxina *in vivo;* mas esses factores necessarios á elaboração da toxina ainda não estão elucidados e muito menos provados experimentalmente. O problema tambem deve ser encarado sob o ponto de vista da dissociação entre o poder toxigenico e a virulencia das bacterias. Aliás, o facto não é novo, nem sempre as amostras de *C. diphteriae, C. tetani* e *S. dysenteriae,* isoladas de caso sgraves, são as mais toxigenicas *in vitro.* Não conseguimos obter toxinas mais activas de culturas de 3 amostras de estaphylococcos augmentadas de virulencia por passagens successivas no organismo do coelho. Devemos ter em conta, então, a adaptabilidade da amostra ás condições artificiaes de cultura. Altamente toxica no organismo infectado, pode não o ser nos meios artificiaes de cultivo, ou fracamente toxica *in vivo* e muito toxigenica *in vitro.*

Os filtrados de culturas de estaphylococcos pathogenicos e mais toxigenicos por suas condições de adaptabilidade aos meios artificiaes de cultivo, apresentam propriedades diversas. O effeito lytico sobre as cellulas sanguineas e dos tecidos é de todos o de maior evidencia. Hematias, leucocytos, hematoblastos e cellulas dos demais tecidos, soffrem a sua acção lytica. Este effeito lytico é demonstrado por uma previa degeneração hydropica das cellulas, seguida de necrose e dissolução cellular. Van de Velde foi o primeiro a verificar a degeneração bolhosa e a lyse dos leucocytos submettidos á acção da toxina; Parker acompanhou o phenomeno necrosante na pelle do coelho inoculado por via intradermica; identica degeneração hydropica observámos, com Maffey, nas cellulas nervosas do cerebro e do cerebello de cobaias inoculadas com a toxina por via transocular; Nelis registou a degeneração do mesmo typo nas cellulas hepaticas de coelhos inoculados por via intravenosa com doses submortaes de toxina.

Porem, segundo as pesquisas de Gengou, o desapparecimento da estructura cellular não se acompanha da destruição das substancias ás quaes as cellulas devem as suas propriedades. Com effeito, a destruição da estructura cellular pela toxina não teria modificado as seguintes propriedades cellulares: a) a propriedade que têm os leucocytos de transformar em granulos os vibriões cholericos; b) o poder que têm os hematoblastos do coelho de conferir ao soro

deste animal a faculdade de destruir a Bacteridia carbunculosa; c) a participação das substancias fornecidas pelos hematoblastos (cytozymas) na coagulação do sangue; d) a participação do cytozyma das hematias no mesmo phenomeno.

As pesquisas de Gengou, sem duvida interessantes por trazerem um contingente de real valor para o estudo do mecanismo da acção das toxinas sobre os elementos cellulares, não auctorizam uma generalização ás demais substancias a que devem as cellulas suas propriedades especificas, e não será fora de proposito suppor, e é Gengou que lança a hypothese, que "lors de la lyse des cellules, le sort de leurs éléments constitutifs dépend aussi bien de la nature de ces éléments eux-mêmes que de la nature du facteur lytique".

No presente trabalho foram estudadas experimentalmente as seguintes acções toxicas das culturas de estaphylococcos: erythrocytolytica, leucocytolytica, necrosante (dermotoxina), mortal por via venosa para o coelho (leto-toxina), tetanizante e acção coagulante do plasma e fibrinolytica.

A não ser esta ultima, que parece não correr por conta do principio activo filtravel, as demais estão directamente relacionadas á presença da toxi-proteina. Com effeito, a acção coagulante e fibrinolytica das culturas, independentemente de coexistir com poder sempre maior nas culturas em que a toxi-proteina se revela em altos titulos, é em grande parte retida pelos filtros, é mais thermo-estavel do que a erythrocytolysina e a dermo-toxina, não se mostrando neutralizavel pelos soros de portadores de infecção estaphylococcica, bem como pelos soros de coelhos infectados e soros de alto titulo erythrocytolytico. Segundo Sudhues, auctor dessas verificações, o phenomeno da coagulação seria effeito de trocas physico-chimicas não especificas e não dependeria dos phenomenos de immunidade. Seja ou não verdadeira essa interpretação de Sudhues, a coagulação do plasma e a fibrinolyse, dependentes de um mesmo processo (segundo Gengou a coagulação do plasma seria uma phase de fibrinolyse), e independentes da toxina propriamente dita, desempenham papel importante na pathogenia das estaphylococcias, tanto que a prova *in vitro* de Much ainda é hoje um elemento seguro para o reconhecimento de um estaphylococco pathogenico.

A acção gastro-intestinal, tambem referida neste trabalho, observada não só após a ingestão de alimentos contaminados como com filtrados de culturas de estaphylococcos isolados desses alimentos, no julgar de Woolpert e Dack, correria por conta de um outro principio activo, independente da toxina propriamente dita, embora com esta guardasse certa relação de presença e proporcionalidade. Woolpert e Dack, que operaram em macacos, não conseguiram neutralizar pela antitoxina o veneno gastro-intestinal das culturas; igualmente, macacos immunizados passivamente não se mostraram immunes ao filtrado por via oral. Estes auctores, entretanto, não estudaram o veneno gastro-intestinal em relação á acção coagulante do plasma e fibrinolytica das culturas, ficando este ponto ainda aberto aos estudos experimentaes.

No que diz respeito ás demais acções toxicas dos filtrados de culturas de estaphylococcos: lytica para as cellulas sanguineas (hematias, leucocytos, hematoblastos) e dos tecidos (figado, rim, myocardio e cerebro), acção particularmente necrosante para a pelle, acção letal por via venosa e effeito tetanizante, parecem correr por conta de um unico principio activo, filtravel e seguramente neutralizavel por uma mesma antitoxina. Dizemos uma mesma antitoxina, pelo facto de, nas nossas verificações, como nas de Burnet, a neutralização desses varios effeitos toxicos, tomados em suas unidades, guardarem uma relação demasiadamente estreita, que fala a favor, não só da identidade antigenica das toxinas preparadas com varias amostras de estaphylococcos, como da realidade de uma unica antitoxina, neutralizando as differentes acções toxicas de um unico principio activo. Com effeito, no caso da existencia de varios principios responsaveis pelas differentes acções toxicas, os titulos de neutralização desses varios effeitos não se mostrariam em tão estreita e constante relação numerica, dados os graus de antigenicidade differentes que, forçosamente, teriam esses varios principios toxicos.

Ainda corroboram essa opinião as experiencias que realizámos de neutralização da toxina, não mais tomada em unidades toxicas, mas em volume fixo, variadas as quantidades de antitoxina, experiencias demonstrativas da seriação quantitativa da toxina necessaria para a obtenção dos effeitos erythrocytolytico, necrosante, tetanizante e letal, respectivamente. Uma seriação identica é sempre observada na verificção dos effeitos toxicos dos filtrados de culturas de varias amostras, tomando a toxina em quantidades decrescentes. É verdade que, si procurarmos as relações numericas dessas differentes acções toxicas tomadas em suas unidades, poderemos verificar que os numeros não guardam entre si uma relação tão estreita que permitta dizer-se, com segurança, que uma unidade X (poder letal) equivale a tantas unidades, Y, W ou Z (poderes tetanizante, necrosante e erythrocytolytico). Não só o facto da transformação rapida da toxina em toxoide, como as differenças de criterio technico tomado pelos varios experimentadores, e, ainda as variações de sensibilidade dos elementos em ensaio e tambem dos animaes empregados na determinação das varias unidades, tudo concorre para difficultar o assentamento das relações numericas dessas differentes acções toxicas da toxina. Todavia, corrobora ainda o ponto de vista unicista o facto de, sob a acção do formol, todas as propriedades toxicas da toxina diminuirem parallelamente, tal como demonstrou Burnet e nós mesmo confirmamos.

A hypothese pluralista, defendida principalmente por Weld e Gunther e por Panton e Valentin, dissocia o effeito erythrocytolytico do leucocytolytico, e tambem o primeiro do effeito nerosante. Esta hypothese, ante a evidencia de um principio activo unico, affirmado pela neutralização proporcional dos varios effeitos toxicos da toxina por antitoxinas obtidas á custa de filtrados de

culturas de varias amostras de estaphylococcos, parece não mais se poder firmar em boas bases experimentaes.

Encaremos, agora, particularmente o effeito erythrocytolytico.

Como tivemos occasião de verificar, as hematias de differentes animaes, inclusive as do homem, não mostram uma sensibilidade igual ao effeito lytico da toxina. As hematias humanas se teriam mesmo mostrado resistentes á acção de 3 das nossas toxinas altamente lyticas para hematias de coelho e de carneiro. Glenny (em trabalho não publicado, cit. por Parish), encontrou 2 hemolysinas em filtrados estaphylococcicos, com anticorpos especificos. Panton e Valentin tambem assignalam toxinas com alto titulo erythrocytolytico para hematias de coelho, que não chegavam a hemolysar os globulos vermelhos humanos. A saturação dessa toxina com globulos vermelhos humanos não teria reduzido o titulo hemolytico para os globulos de coelho.

Os globulos vermelhos humanos seriam, então, mais resistentes á acção lytica da toxina do que as hematias de carneiro e coelho. Restaria comprovar si, em ensaios com hematias de individuos cujos soros são isentos ou pelo menos contêm pequena quantidade de antitoxina, o poder lytico desses filtrados não se mostraria mais accentuado. Com effeito, Bryce e Burnet, em estudos cuidadosos sobre o desenvolvimento da immunidade natural á toxina estaphylococcica, estabeleceram uma curva do teor antitoxico dos soros de individuos de varias idades, a qual se assemelha á curva da immunidade natural á toxina diphterica; por ella se vê que, nos individuos adultos, o teor anti-erythrocytolytico do soro é sempre elevado. Occasionalmente em coelhos (5%) se poderia observar tambem uma certa immunidade natural.

Por outro lado, Muller (34) pensa que o phenomeno da hemo-destruição, por parte do estaphylococco sobre as hematias, não estaria unicamente ligado á presença do estaphylococco (erythrocytolysina), mas tambem a um principio filtravel existente no sangue humano. Este principio seria thermo-labil e a sua actividade hemo-destructiva seria por sua vez condicionada á presença do estaphylococco.

Por fim, não seria de extranhar que, inversamente, os filtrados de culturas pouco erythrocytolyticos para hematias de coelho ou carneiro tivessem um maior effeito lytico sobre hematias humanas. Estas verificações, ainda não realizadas, merecerão futuramente de nossa parte estudo cuidadoso, dada a sua importancia na explicação de factos até agora obscuros no mecanismo desse effeito lytico.

Os resultados obtidos nos nossos estudos experimentaes, relativamente ás acções necrosante e mortal da toxina, em nada differiram dos já publicados por Parker, Burnet, Dolman, Parish e Clark, Burky e outros.

A acção tetanizante que se segue ás inoculações da toxina directamente no cerebro de coelhos e cobaias, não referida nos trabalhos publicados por aquelles

auctores, foi por nós estudada experimentalmente e os nossos resultados, em parte já publicados, são registados aqui na sua totalidade.

A syndroma experimental obtida pelas inoculações dos filtrados de culturas de estaphylococcos toxigenicos, e só por estes, directamente no cerebro após trepanação ou pelas vias cisternal ou transocular, parece superpor-se á da tetania acerebellada, que occorre nas meningites infectuosas, permittindo esta observação firmar de uma vez a pathogenia do mal como decorrente do ataque aos elementos nervosos (cerebro, cerebello) pelas toxinas bacterianas. Os chamados meningismos, observados concomitantemente a infecções pyogenicas das proximidades (sinusites, otites, mastoidites), teriam assim sua explicação numa infiltração por parte da toxina elaborada pelo germe, alcançando determinado territorio cerebral. Aberto o foco cirurgicamente, o escoamento facil para o exterior logicamente eliminaria a infiltração que no caso seria de ordem mecanica.

A syndroma tetanizante agora observada parece não ser apanagio do producto aggressivo do estaphylococco. Alguns dos nossos filtrados de culturas de estreptococcos hemolyticos e de meningococcos (em meio hormonico de Huntoon) provocaram-na, embora em menor intensidade: os animaes inoculados (cobaias) retomavam o equilibrio em alguns minutos, si bem que a maioria morresse nas 24 horas. Os estudos recentes de Zdrowski e Voronine (73), de Branham e Lillie (74) e os de Ferry e collaboradores (75) sobre a meningite do coelho que sobrevem ás inoculações cisternaes de culturas de meningococcos ou de seus filtrados, falam do mesmo modo nesse sentido. Nas nossas verificações com filtrados de culturas de *E. typhi* ou toxinas dysenterica e tetanica, veneno de jararaca ou soluto de trypsina e com o caldo-Walbum collocado sob as mesmas condições de experiencia, não foi obtido effeito semelhante.

Essa acção toxica dos filtrados estaphylococcicos sobre as cellulas nervosas, demonstrada pela degeneração do typo hydropico em elementos cellulares do cerebro e do cerebello, mostra-se identica ao phenomeno inicial da necrose e lyse cellular, provocado pela toxina sobre differentes tecidos, parecendo não guardar qualquer especificidade. Esta falta de especificidade para o tecido nervoso é revelada nos animaes inoculados por differentes vias, os quaes não demonstram symptomas da syndroma tetanizante. Este ultimo facto foi comprovado pela reproducção das classicas experiencias de Wassermann e Takaki sobre a adsorpção da toxina tetanica pelo tecido nervoso: o filtrado estaphylococcico, após contacto mais ou menos prolongado com esse tecido (cerebro), não perdeu em todo ou em parte o seu effeito mortal e tetanizante. Neste particular a toxina estaphylococcica se afasta inteiramente da toxina tetanica, que apresenta uma especificidade accentuada para aquelle tecido.

A inoculação por via lombar da toxina estaphylococcica é seguida da paralysia dos membros posteriores e, quando inoculadas doses, acima de 0.5cc. ap-

parecem tardiamente os symptomas cerebraes, sobretudo o opisthotono, que progridem muito devagar.

Nas inoculações por via cisternal e transocular de toxinas muito activas e em doses fortes, pode-se ainda observar em certos animaes um ataque aos centros bulbares, frequentemente revelado por um typo de edema pulmonar que se traduz por uma hemorrhagia nasal caracteristica, morrendo os animaes, neste caso, em poucos minutos. Normalmente, a morte dos animaes é verificada após algumas horas da inoculação, notando-se certa relação entre o tempo de morte e a dose de toxina inoculada.

Uma relação chronometrica muito mais estreita poude ser verificada entre a dose de toxina inoculada e o apparecimento da syndroma, tomando-se como criterio de avaliação a queda tetanizante, revelada por perda do equilibrio, contracturas dos membros, opisthotonos. Estes dados, guardado certo criterio technico, permittiram assentar as bases experimentaes para a determinação de uma unidade, a dose tetanizante letal (D. T. L.), que foi usada nas experiencias immunologicas por nós realizadas. A D. T. L. da toxina, pouco superior á dose que limita a actividade da toxina (dose tetanizante symptomatica — D. T. S.), representa, em funcção da concentração, a menor dose de toxina capaz de produzir, systematicamente, a syndroma tetanizante typica, em periodo de tempo não superior a 30 minutos em cobaias de mais ou menos 350 grs. de peso e inoculadas por via transocular e a sua morte constante nas 24 horas. Dizemos em funcção da concentração, porque as experiencias por nós realizadas nesse sentido demonstraram que determinada dose de toxina, que numa concentração mais elevada é capaz de produzir a syndroma tetanizante na cobaia, em certa diluição maior nada produz. Ficou tambem verificado que, alem de um certo limite de diluição do filtrado, não é possivel obter-se qualquer symptoma na cobaia ou mesmo morte tardia, embora as doses de toxina inoculada sejam superiores á menor dose que, na diluição limite, foi capaz de produzir uma syndroma tetanizante completa com morte do animal. Neste particular, a fixação da toxina sobre as cellulas nervosas obedeceria, talvez, ás mesmas leis que regem as colorações vitaes electivas, regulando-se por um coefficiente de repartição, solubilidade e penetração, ou ainda, ás leis de adsorpção por superficies limitadas entre systemas micro-heterogeneos ou colloides. Novas verificações serão futuramente feitas afim de comprovar si a toxina, em seus varios outros effeitos toxicos, guarda um comportamento semelhante.

A toxina estaphylococcica possue um poder antigenico accentuado: os soros de animaes repetidas vezes inoculados com pequenas quantidades de toxina pelas vias subcutanea e intradermica, possuem propriedades antitoxicas evidentes. Os animaes injectados por via venosa mostram-se difficilmente immunizaveis, não supportando na maioria das vezes as inoculações de doses crescentes de toxina.

A antitoxina desse modo obtida, segundo mostraram as nossas experiencias, neutraliza, tanto *in vitro,* como *in vivo,* todas as propriedades toxicas da

toxina, inclusive a acção tetanizante. Este ultimo facto fornece um argumento seguro a demonstrar que o principio toxico dos filtrados, neutralizavel pela antitoxina, é o responsavel pelo effeito tetanizante provocado nos animaes após as inoculações cerebraes, o que é corroborado pela observação de que somente os filtrados toxicos são capazes de provocar semelhante syndroma.

Os nossos animaes immunizados activamente resistiram, por outro lado, ás inoculações venosas de toxina em dose seguramente mortal e, tambem, mostraram-se immunes ás inoculações por via intradermica de quantidades de toxina capazes de produzir lesões necrosantes extensas em coelhos normaes.

O poder preventivo da antitoxina em relação aos effeitos necrosante, letal e tetanizante dos filtrados, ficou tambem demonstrado pelos resultados dos nossos estudos. Neste particular, as nossas experiencias foram mais extensas em relação ao effeito tetanizante da toxina, em animaes immunizados passivamente. Pode-se deduzir dessa serie de experiencias que, em cobaias e coelhos, a antitoxina protege os animaes contra o effeito tetanizante da toxina, por certo espaço de tempo, variavel com a dose de antitoxina e com a via de inoculação desta.

A antitoxina estaphylococcica, que possue uma propriedade preventiva manifesta, mostrou um poder curativo limitado em relação ao effeito tetanizante da toxina. Com 100, 200 e 300 unidades de antitoxina, inoculadas por via transocular e cisternal, não conseguimos restabelecer o equilibrio de 9 e 10 cobaias, 5 minutos depois de declarada a syndroma tetanizante. Sob este ponto de vista, a antitoxina estaphylococcica teria, talvez, acção identica á da antitoxina tetanica: um effeito curativo limitado, não pela falta de neutralização da toxina porventura livre no cerebro, mas pelo facto de não haver *restitutio ad integrum* das cellulas nervosas lesadas mais ou menos profundamente. A antitoxina poderia talvez agir curativamente, nos casos de intoxicação lenta, de marcha subaguda, pela neutralização gradativa da toxina elaborada continuadamente e em pequenas doses, em focos não muito extensos.

Um dos pontos mais interessantes dos estudos sobre a antitoxina seria a verificação do seu poder preventivo contra as infecções estaphylococcicas propriamente ditas. Como se comportariam os animaes possuidores de elevado teor antitoxico no sangue em relação ás infecções estaphylococcicas generalizadas ou localizadas? Burnet , em verificações sobre o poder preventivo da antitoxina na septicemia experimental do coelho, observou uma maior resistencia dos animaes immunizados relativamente aos testemunhas, assignalando embora um augmento do numero de germes na corrente circulatoria, tanto nestes, como naquelles, perecendo todos os animaes, finalmente, em um periodo mais ou menos prolongado. As nossas experiencias, neste particular, tambem demonstraram na serie de animaes immunizados passivamente, em coelhos, tanto jovens como adultos, uma maior sobrevivencia á infecção por via venosa entre os immuni-

zados relativamente aos testemunhas. Nos exsudatos de certos destes animaes, principalmente dos que pereceram após poucos dias da inoculação, foi observada a presença de toxina livre. Que houve, nestes animaes, uma defesa inicial, provavelmente devida á presença da antitoxina, não resta duvida, pois a sobrevivencia por maior tempo dos immunizados em relação aos testemunhas bem a demonstra. Mas, por outro lado, o exgottamento da antitoxina seria um facto real, dada a presença de toxina livre, verificada nos exsudatos colhidos após a morte, principalmente dos animaes que pereceram após poucos dias da inoculação infectante.

A septicemia que decorre das inoculações de doses macissas de culturas, contingencia das condições de experiencia, em animaes de relativa sensibilidade ao germe, não permittiria uma reacção organica maior, mesmo com o auxilio da antitoxina. Os ioelhos jovens, mais sensiveis ao germe, soffrem uma intoxicação mais accentuada, dada a maior concentração que a toxina precocemente attinge (por maior elaboração em menor volume); mesmo immunizados passivamente com doses de antitoxina relativamente elevadas, parecem após um nomero de horas pouco superior ao dos testemunhas. Os coelhos adultos, mais resistentes, soffrem uma intoxicação mais lenta, supportando a infecção por um periodo mais prolongado. Alguns destes, entretanto, resistem por um longo espaço de tempo, vindo a morrer tardiamente por cachexia, apresentando por vezes arthrites e paralysias.

Examinando mais de perto a questão, podemos verificar que, nas mesmas condições experimentaes, existe neste particular certa analogia das infecções estaphylococcicas com as estreptococcicas, que, segundo Parish e Okell (50), possuem 2 modos de ataque: um agudo, inicial, toxico e um outro ataque tardio, septico ou pyohemico. Por inoculações venosas de germes muito virulentos, ou de doses muito fortes de culturas de estaphylococcos regularmente virulentos em coelhos jovens, observa-se uma septicemia pura, sem localizações visceras apparentes, morrendo os animaes em poucas horas por uma intoxicação brutal do organismo. Os estaphylococcos medianamente virulentos, inoculados por via venosa em coelhos adultos, passam do mesmo modo por uma phase inicial toxica, porem menos accentuada, podendo os animaes vir ou não a morrer nesta phase, seguida de uma outra, pyohemica, com abcessos nos rins, figado, pulmões, myocardio, por vezes arthrites, paralysias, etc.

A antitoxina teria a propriedade de neutralizar essa phase toxica, quando em quantidade sufficiente no organismo e desde que não fosse exgottada por uma elaboração maior e constante da toxina por parte do germe infectante. Mas, naquellas condições experimentaes, não evitaria, por seu exgottamento final, o ataque posterior pyohemico ou septico, sempre tardio, do qual decorreria finalmente a morte, por uma intoxicação successiva e lenta. A estandardização de uma dose de cultura de maneira a determinar a dose minima sufficiente para provocar a phase toxica mortal em coelhos adultos ou para permittir a ob-

servação rigorosa dos 2 ataques (toxico e septico) num rythmo chronometrico, é quasi que impraticavel, dada a resistencia individual, differente para cada animal, que responde deste ou daquelle modo. Si partirmos de infecções localizadas na esperança de se obter a generalização da infecção, os resultados ainda mais disparatados se mostrarão e por elles nada se pode concluir. No homem, as septicemias decorrentes de focos bem localizados, ou são brutaes e matam o individuo em poucas horas por uma intoxicação intensa, ou são mais attenuadas e mesmo pouco perceptiveis, só se revelando na phase pyoseptica, por localizações diversas. Uma immunização antitoxica, activa ou passiva, permanente, constante, de maneira a tornar o teor antitoxico do organismo, sinão superior, pelo menos proporcional á quantidade de toxina elaborada, protegendo os elementos de defesa contra a aggressão toxica e permittindo a estes o preenchimento de seus fins, certamente influirá beneficamente. No periodo inicial, focal ou de localização, seria, entretanto, importante debelar a infecção pelo augmento do teor antitoxico do organismo. Não só as nossas verificações therapeuticas com o emprego da anatoxina como as de Dolman, Jamieson (24), Kindel e Costello (76), Parish e Clark e tambem as de Greebaum, Harkins (18) e Weis (69), e outros, com toxina não modificada são demonstrativas da facilidade como se resolvem os furunculos, anthrazes e outras lesões estaphylococcicas, com o emprego deste methodo de immunização.

Por outro lado, si as infecções estaphylococcicas são geralmente localizadas, a intoxicação organica que pode derivar dos focos multiplos, por si só, é sufficiente para orientar uma therapeutica antitoxica concomitante aos demais methodos communs de tratamento. É por uma intoxicação successiva e lenta que, na maioria das vezes, os organismos, muitos já com menor resistencia, não reagem de modo sufficiente e posteriormente não supportam a violencia do ataque cada vez mais intenso. A abertura cirurgica dos focos, sempre que possivel, é indicada como meio de derivar grande parte dos germes e da toxina para o exterior, evitando a infiltração e a diffusão destes no organismo. Taylor (62), cita casos de tetano em tratamento pela antitoxina, com recidivas e que só cederam pela abertura e raspagem do foco antigo, já completamente cicatrizado. A toxina elaborada lenta e successivamente no foco (tecido necrotico e pus do qual foi isolado o *Cl. tetani*), apparentemente inexistente dada a sua completa cicatrização, foi exgottando a antitoxina inoculada pelo prazo de mais de 2 semanas, exercendo posteriormente a sua acção sobre as cellulas nervosas, provocando a volta da syndroma.

As nossas experiencias sobre as infecções localizadas provocadas por inoculações intradermicas de culturas em coelhos immunizados passivamente, por injecções de antitoxina *in loco* ou por via venosa, mostraram o effeito protector do soro contra o desenvolvimento da pustula estaphylococcica. A immunização *in loco* preveniu inteiramente o desenvolvimento da infecção, que, no

testemunha, produziu uma lesão necrosante extensa seguida de uma ulcera, pela eliminação do tecido necrosado. A immunização por via venosa, si não preveniu completamente o desenvolvimento da infecção, contudo não permittiu mais do que uma ligeirissima lesão inflammatoria *in loco,* que cedeu rapidamente.

As inoculações cerebraes em cobaias immunizadas passivamente, mostraram, como vimos, uma maior sobrevivencia destas em relação ás testemunhas. A pequena quantidade de antitoxina inoculada, exgottando-se por sua neutralização da toxina gradativamente secretada, não permittiu uma reacção organica maior, não conseguindo evitar, assim, a maior proliferação da bacteria em terreno muito sensivel e a consequente invasão do organismo.

A immunização antitoxica do homem pode ser obtida activa ou passivamente. Com o emprego da toxina, por inoculações de doses crescentes, Greenbaum e Harkins, Pilot e Afrenow (54), Weise e outros conseguiram augmentar o teor antitoxico dos soros de pacientes portadores de lesões estaphylococcicas diversas, havendo, na maioria dos casos, resultados conclusivos sobre o valor therapeutico do methodo. O emprego da toxina teria o inconveniente de provocar accentuadas reacções locaes, podendo mesmo chegar á necrose, si a dose fosse um pouco mais forte. Todavia, os estudos de Burnet sobre a possibilidade de a toxina estaphylococcica transformar-se, quando tratada pelo formol, em uma verdadeira anatoxina no sentido de Ramon, com a perda completa do poder toxico e conservação do poder antigenico, permittiram a utilização definitiva deste methodo na therapeutica humana (Dolman, Jamieson e Powel, Kindel e Costello, Parish, O'Meara e Clark).

Os nossos estudos sobre a anatoxina estaphylococcica mostraram que, conforme a dose de formol empregada, a temperatura de incubação e o pH do meio, obtêm-se productos atoxicos que, inoculados em animaes e no homem, lhes elevam de muito o teor antitoxico dos soros. Por inoculações subcutaneas repetidas em cavallos, conseguimos attingir um titulo antitoxico que, mesmo após posteriores inoculações de toxina não modificada, não foi ultrapassado. Este facto mostra que o estimulo primario da anatoxina é sufficiente para attingir o mais alto titulo da curva da immunidade antitoxica nos animaes e demonstra a conservação do poder antigenico pela toxina após tratamento pelo formol. Coelhos inoculados pelas vias intradermica ou subcutanea com esta anatoxina, como vimos, apresentam, não só um maior teor antitoxico no soro sanguineo, como se mostram immunes ás inoculações da toxina, tanto por via intradermica, como por via venosa. A via venosa não se prestou á immunização dos animaes.

Esta anatoxina tambem conserva a propriedade de ser fixada pela antitoxina e, ainda, segundo o demonstraram Burnet e Gengou, floccula especificamente em presença da antitoxina. Outrosim, no homem as inoculações de anatoxina provocaram-lhe o augmento do teor antitoxico do soro. Os resultados therapeuticos por nós obtidos e que serão demonstrados em trabalhos ora em pre-

paro, são favoraveis e recommendam o methodo na pratica corrente das estaphylococcicas localizadas em geral.

Chamou-nos a attenção o facto de os soros de certos individuos portadores de lesões estaphylococcicas chronicas (osteomyelite), apresentarem, sem previa immunização, um titulo antitoxico elevado, muitas vezes proximo ao de outros que o conseguiram á custa de uma immunização activa pela anatoxina. A lesão dos primeiros, chronica, não mostra signaes de regressão, apezar do teor antitoxico elevado do sangue, enquanto que nestes mesmos titulos, as dos ultimos (furunculose, anthrazes) cicatrizam-se totalmente. Este facto talvez esteja ligado á propria natureza da lesão. Na lesão chronica, o foco reveste-se de formações diversas que constituiriam uma parede defensiva, por vezes espessa, que delimita toda a area necrosada da lesão. Ora, sabe-se que a antitoxina não é dialysavel, enquanto que as exotoxinas o são, embora lentamente. A toxina dialyzavel forneceria o elemento antigenico que estimularia a formação da antitoxina, mas esta não poderia transpor a barreira, pelo menos em quantidade sufficiente para collocar o estaphylococco em condições de menor aggressividade. Decorre dahi o facto da necessidade da intervenção cirurgica nos focos chronicos com o fim de retirar essas formações, a qual, acompanhada da immunização antitoxica activa ou passiva, segundo os casos de maior ou menor reacção do organismo, provavelmente facilitará os resultados therapeuticos.

A immunização passiva do homem é feita pela inoculação da antitoxina elaborada em animaes de grande porte (cavallos), hyperimmunizados com a anatoxina ou a toxina. A preparação da antitoxina em escala industrial foi tambem por nós realizada e discutida sob o ponto de vista technico. As inoculações de toxina, em cavallos, segundo as experiencias do Parker, tornam-se perigosas, não supportando os animaes as injecções de uma quantidade maior de filtrado. Alem disso, a acção necrosante da toxina provoca por vezes lesões extensas da injecção, desenvolvendo-se abcessos e escaras. Os nossos cavallos foram immunizados com anatoxina em doses crescentes, supportando bem essas inoculações, mesmo até um volume de 150cc., dado de uma só vez em logares diversos. Nas inoculações posteriores com toxina, quando a dose era elevada, observámos edema e por vezes abcessos. As reacções febris dos animaes foram de pequena monta, mantendo-se numa media de 38°5 e 39°.

Somente com as inoculações de anatoxina conseguiu-se attingir o titulo antitoxico maximo que puderam desenvolver os animaes, titulo que não poude ser ultrapassado após repetidas inoculações de toxina.

Para os doseamentos da antitoxina uma vez que as nossas experiencias, coincidentes com as de Burnet, nos proporcionaram a unidade da antitoxina e, consequentemente, a unidade antigenica dos filtrados, usámos um methodo que se assemelha ao de doseamento das antitoxinas tetanica e diphterica.

Esse methodo tem a vantagem de afastar as causas de erro que foram acima assignaladas. Consiste na determinação previa da menor quantidade de toxina

que, em presença da unidade de antitoxina tomada como padrão, produz systematicamente a queda tetanizante e a morte, em cobaias, dentro de certas bases experimentaes, quantidade essa (L†) que é tomada como unidade para a avaliação do poder neutralizante das antitoxinas a dosear. Tomámos provisoriamente como unidade da antitoxina padrão a menor quantidade de antitoxina que, misturada e após incubação a 37° com 10 D.T.L. da toxina avaliada na vespera, evita, não só a queda dos animaes nos 30 minutos de observação, como a sua morte nas 24 horas. Desde que se possam aperfeiçoar os methodos de immunização, obtendo-se titulos antitoxicos superiores aos actuaes, poder-se-á augmentar a unidade da antitoxina padrão de 10 vezes, como actualmente se faz nos doseamentos de antitoxina diphterica. Com toxinas dessecadas, calculadas relativamente ao peso, é possivel obterem-se as 100 D.T.L. em volume pequeno, dentro das condições requeridas pelo methodo.

Tambem ficou demonstrada pelos nossos estudos experimentaes a possibilidade de concentrar-se a antitoxina pelo methodo commummente usado para a refinação das antitoxinas diphterica, tetanica, etc.. Si bem que, após concentração, tivessemos antitoxinas que alcançaram titulos superiores a 2.500 unidades por cc., por motivos de ordem industrial a distribuimos em empolas de 10 cc. correspondente cada cc. a 500 unidades.

Aguardamos a opportunidade para a experimentação therapeutica deste producto, o que será feito com a cooperação valiosa dos drs. J. A. Arantes e J. T. Piza, do Hospital Emilio Ribas de São Paulo.

SUMMARIO

I — Com certas amostras toxigenicas de estaphylococcos consegue-se preparar uma toxina de alto valor lytico, em culturas, tanto em meio liquido, como em meio solido e mantidas numa atmosphera de 10 a 20 % de CO^2.

II — Os filtrados estaphylococcicos mostram accentuado poder lytico, não só para as cellulas sanguineas (hematias, leucocytos, hematoblastos), como para as cellolas dos demais tecidos. Inoculados por via intradermica, produzem uma lesão necrosante intensa; por via venosa matam o coelho e outros animaes em poucos minutos; por via cerebral produzem uma syndroma tetanizante em curto espaço de tempo, seguida de morte do animal.

III — As culturas de estaphylococcos pathogenicos coagulam o plasma e lysam a fibrina; tambem certas culturas de estaphylococcos, por via oral, produzem uma syndroma gastro-intestinal. A acção coagulante do plasma e o veneno gastro-intestinal parecem separar-se do principio toxico, filtravel, e por conta deste decorrem todas as demais acções toxicas estudadas: acção lytica, acção necrosante, acção letal e acção tetanizante.

IV — Este principio possue as propriedades geraes das exotoxinas.

V — A toxina é elaborada *in vivo*.

VI — A toxina demonstrou possuir um poder antigenico accentuado. Soro dos animaes immunizados neutralizam as acções toxicas do principio activo filtravel. Os animaes immunizados activamente mostram-se immunes ás acções necrosante e letal da toxina. Os animaes immunizados passivamente e por um determinado espaço de tempo, são protegidos segundo a dose de antitoxina inoculada, contra as acções necrosante, letal e tetanizante de toxina. A antitoxina parece não possuir poder curativo manifesto em relação á syndroma tetanizante aguda, provocada na cobaia pela inoculação transocular da toxina.

VII — Coelhos immunizados activa ou passivamente, resistem por maior espaço de tempo do que os testemunhas, quando submettidos a uma injecção intravenosa de cultura de estaphylococcos. O mesmo acontece em cobaias immunizadas passivamente e inoculadas por via cerebral com cultura de estaphylococcos virulentos. Coelhos immunizados passivamente mostram grande resistencia ás infecções localizadas da pelle, provocados experimentalmente.

VIII — A toxina sob a acção do formol transforma-se, em poucas horas, em uma anatoxina no sentido de Ramon. Ella é antigenica, é fixavel pela antitoxina e floccula em presença desta. Do ponto de vista scientifico e pratico é indiscutivel o valor da anatoxina no tratamento das estaphylococcias.

IX — A antitoxina pode ser obtida, em escala industrial, conforme processo descripto no texto. O doseamento corrente da antitoxina baseia-se na sua acção neutralizante sobre o poder tetanizante da toxina, evitando-se por este methodo as varias causas de erro. A antitoxina estaphylococcica pode ser concentrada pelo methodo de precipitações fraccionadas, usualmente empregado na concentração de outras antitoxinas: diphterica, tetanica, escarlatinica, antivenenos, etc..

ABSTRACT

It is possible to prepare a highly lytic toxin by using certain toxigenic samples of *Staphylococcus aureus* in solid or liquid media and maintained under 10 to 20 % CO^2.

The lytic power of the filtrate of such cultures affects not only blood cells (red cells, leucocytes and hematoblasts) but the cells of other tissues as well. When inoculated intradermally the filtrates cause an intense necrosis; intravenously, they kill rabbits and other animals in a few minutes; intracerebrally, they bring about a tetanizing syndrome after a short incubation.

Cultures of pathogenic staphylococci are apt to clot the plasma and to lysate the fibrin; certain of them on oral administration also cause a gastro-enteric

syndrome. The plasma coagulating power and the gastro-enteric poison both seem to be independent from the main filterable principle which is apparently responsible for the remaining toxic actions that have heretofore been investigated: lytic, necrosing, lethal and tetanizing actions.

The filterable principle bears the general properties of exotoxins.

The toxin is elaborated *in vivo* and has shown to bear a highly antigenic power. The serum of animals immunized against it is able to neutralize all of its toxic actions. The animals regularly inoculated with it prove to be immune to its necrosing and lethal effects.

Depending on its dosis the animals passively immunized with the antitoxin appear protected for a while against the toxic, the necrotic, the lethal and the tetanizing effects of the toxin. The antitoxin seems not to bear any definite curative power as regards the acute tetanizing syndrome guinea-pigs develop following transocular inoculation of the toxin.

Rabbits immunized either actively or passively survive for a longer period than the controls to an intravenous injection of a staphylococcus virulent culture. Guinea-pigs passively immunized show an identical resistance when cerebrally inoculated with a staphylococcus virulent culture. Passively immunized rabbits develop a great resistance to experimental infections localized on their skin.

Under the action of formalin the toxin rapidly (in a few hours) changes into anatoxin. It remains antigenic and is apt to be fixated by the antitoxin in the presence of which it also flocculates. From both the scientific and the practical standpoints the value of the anatoxin in the treatment of staphylococcic (*St. aureus*) infections is indiscussable.

The staphylococcic antitoxin may be produced in an industrial scale like other antitoxins. Its principal method of titration is based on its neutralizing action on the tetanizing effect of the toxin. The antitoxin can also be concentrated by the fractionated precipitation method as employed in the case of other antitoxins.

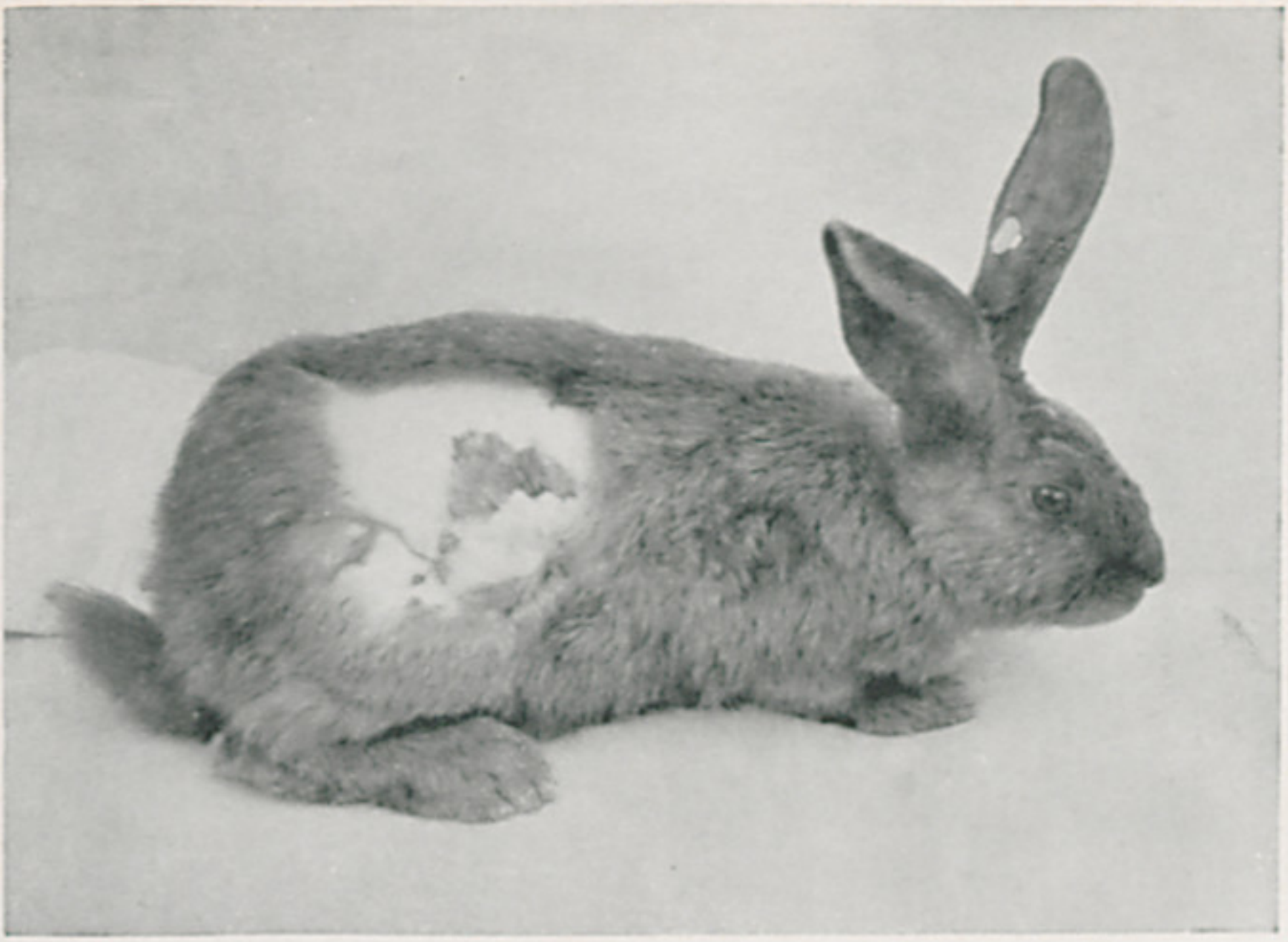
BIBLIOGRAPHIA

1. *Burnet, F. M.* — J. of Path. and Bact. XXXII(4):717.1929; idem XXXIII(1):1.1930; idem XXXIV(4):471.1931; idem XXXIV(6):759.1931.
2. *Brice, L. M. & Burnet, F. M.* — J. of Path. and Bact. XXXV(2):183.1932.
3. *Burky, E. L.* — J. of Immunology XXIV(2):93, 115, 127.1933; idem XXIV(5):419, 513.1933; Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXXI(1):75.1933.
4. *Bail, O.* — Zeitschr. f. Hyg. XXXII:133.1898.
5. *Barker* — Philippine J. of Science IX:515.1914.
6. *Borthwick, G. R.* — Brit. J. of Exper. Path. XIV(4):236.1933.
7. *Bowler, J. P. & Boardman, J. J.* — New England J. Med. CC:327.1929.

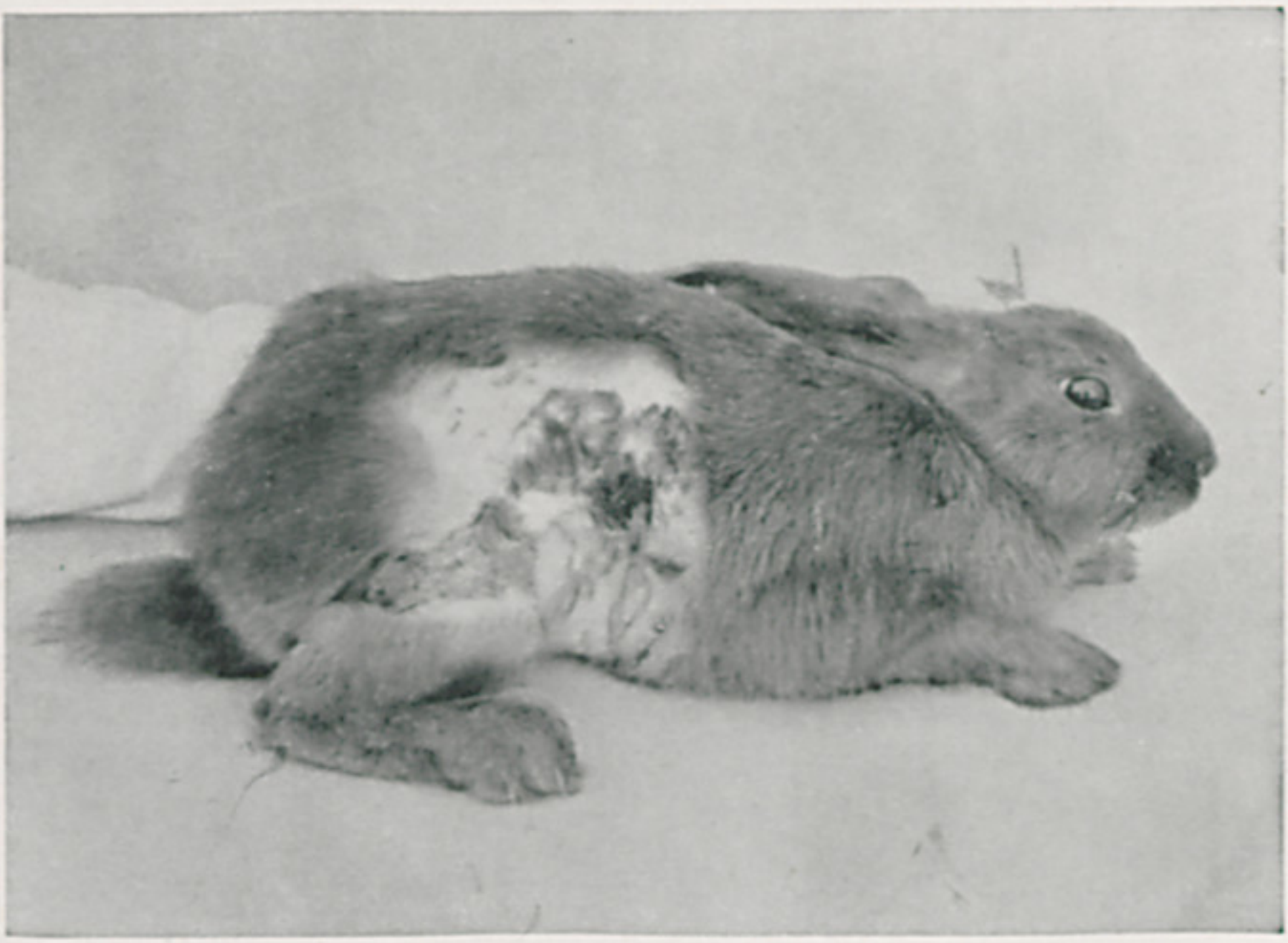
8. *Bigger, J. W.; Boland, C. R. & O'Meara, R. A.* — J. of Path. and Bact. XXX:271.1927.
9. *Bigger, J. W.* — J. of Path. & Bact. XXXVI(1):87.1933.
10. *Christmas* — Ann. Inst. Pasteur II: .1888.
11. *Combiesco, N.; Combiesco, D. & Istrati, G.* — C. R. Soc. Biologie CXIV(30):292.1933.
12. *Dolman, C. E.* — Trans. Can. Publ. Health J. XXIII:125.1932 *in* St. Connaught Lab., Toronto V.1931/32; Trans. Royal Soc. Can. XXVI. Sect. V:309.1932 *in* St. Connaught Lab., Toronto V.1931/32; J. Amer. Med. Assn. C(13):1007.1933.
13. *Dack et als* — J. Prev. Med. IV:167.1930.
14. *Gross, H.* — Klin. Woch. XI:1079.1929; Centralbl. f. Bakt. Ref. XCVI(19/20):14. 1930; Centralbl. f. Bakt. Orig. CXV:367.1930; idem CXXII:359.1931; Zeitschr. f. Immun. LXXIII:14.1931; idem LXXIX:163.1933; Klin. Woch. XII:315.1933; idem XII:907.1933.
15. *Gengou, O.* — Arch. Int. Med. Exper. IV:211, 633.1930; Ann. Inst. Pasteur XLVIII:19, 135.1932; idem LI:14.1933.
16. *Gratia, A.* — C. R. Soc. Biol. XCI:1442.1924; idem XCII:461,1125.1925; idem XCIII: 451.1926; idem XCIV:1267.1927; idem CIV:1058.1930.
17. *George, P. & Giroire, H.* — Presse Méd. XXXIV(39):611.1926.
18. *Greenbaum, S. S. & Harkins, M.* — J. Amer. Med. Assn. XC:1699.1928; idem XCV: 815.1930; Arch. Dermat. Syph. XX:245.1929.
19. *Hektoen, L.* — J. Amer. Med. Assn. XLVI:1407.1906.
20. *Jordan, E. O.* — J. Amer. Med. Assn. XCVII(23):1704.1931.
21. *Jordan, E. O. & McBroon, J.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXIX:161.1931.
22. *Jordan, E. O. & Burrows, W.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXX(4):448.1933.
23. *Julianelle, L. A.* — J. Inf. Dis. XXXI:256.1922.
24. *Jamieson, W. A. & Powell, H. M.* — Amer. J. of Hyg. XIX(1):246.1934.
25. *Kellaway, C. H.; Burnet, F. M. & Williams, F. E.* — J. of Path. and Bact. XXXIII(4): 889.1930; idem XXXV(2):199.1932.
26. *Kraus, R.* — Wien. Klin. Woch. XIII:49.1900.
27. *Kraus, R. & Pribram, E.* — Wien Klin. Woch. XIX:493.1906.
28. *Kendall, A. J. & Walker, A. W.* — J. Inf. Dis. XVII:442.1915.
29. *Lowenstein, P. S.* — J. Amer. Med. Assn. XCVII(5):319.1931; Amer. J. Med. Sc. CLXXXI(2):196.1931.
30. *Lingelsheim* — Aetiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektion, Berlin, 1900.
31. *Leber,* — Fortschr. der Med. (2). .1888.
31a. *Menkin, V. J.* — J. Exper. Med. LVII(6):977.1933.
32. *Mosny & Marcano* — C. R. Acad. Sc. CXIX:962.1894.
33. *McBurney, R.* — J. Amer. Med. Assn. C(25):1999.1933.
34. *Muller, L.* — C. R. Soc. Biol. XCVI:189.1927.
35. *Nicolle, M. & Cesari, E.* — Ann. Inst. Pasteur XXVIII:219.1914.
36. *Neisser, M. & Wechsberg, F.* — Munch. Med. Woch. XLVII:1261.1900; Zeitschr. f. Hyg. XXXVI:299.1901.
37. *Nélis, P.* — C. R. Soc. Biol. CXIII(17):7.1933; CXIII(32):598.1933; Ann. Inst. Pasteur LII(16):597.1934.
38. *Nélis, P. & Bouckaert, J. J.* — C. R. Soc. Biol. CXIII(26):1157.1933.
39. *Nélis, P. & Picard, E.* — C. R. Soc. Biol. CXIII(28):321.1933.
40. *Otten, M.* — Deut. Arch. Koin. Med. XC:461.1907.
41. *Oppenheimer, H.* — Centralbl. f. Bakt. Orig. LIX:188.1911.
42. *Peet, M. M.* — Tice Loose-leaf Practice of Med. V:421.1921, W. F. Prior Company.
43. *Parker, J. T.* — J. Exper. Med. XL:761.1924.

44. *Parker, J. T.; Hopkins, J. C. & Gunther, A.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXIII: 344.1925.
45. *Parker, J. T. & Banzhaf, E. J.* — J. of Immunology XIII:25.1927.
46. *Parker, J. T. (Weld) & Gunther,* A. — J. Exper. Med. LIV(3):315.1931.
47. *Parish, H. J.* — Brit. Med. J. II(3788):277.1933.
48. *Parish, H. J. & Clark, W. H. M.* — J. Path. and Bact. XXXIV:593.1931; idem XXXV(2):251.1932.
49. *Parish, H. J.; O'Meara, R. A. & Clark, W. H. M.* — Lancet CCXXVI(5777): 1054.1934.
50. *Parish, H. J. & Okell, C. C.* — Lancet CCXIV:746.1928.
51. *Panton, P. N. & Valentine, F. C. O.* — Brit. J. Exper. Path. X:257.1929; Lancet CCXXII:506.1932.
52. *Panton, P. N.; Valentine, F. C. O. & Dix, V. W.* — Lancet CCXXI:1180.1931.
53. *Pike, R. M.* — J. of Immunology XXVI(1):69.1934.
54. *Pilot, I. & Afremow, M. L.* — J. Amer. Med. Assn. LXXXIX(12):939.1927.
55. *Reed, A. C. & Stiles, F. E.* — California and West Med. XXVI:492.1927.
56. *Rodet & Courmont* — Revue de Med. XIII:84.1893.
57. *Russ, V. K.* — Zeitschr. f. Exper. Path. Th. XVIII:220.1916.
58. *Ramsy & Tracy* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXVIII:390.1931.
59. *Soper, W. B.* — Proc. New York Path. Soc. XII:225.1912.
60. *Sudhues, M.* — Zeitschr. f. Immun. LXXX:42.1933.
61. *Timmerman, W. A.* — Nederland Tijdschr. Hyg. Mic. Serol. VII:178.1932 ref. Biol. Chemistry XXVII:335.1933.
62. *Taylor, F. W.* — J. Amer. Med. Assn. CII(12):895.1934.
63. *Travassos, J.* — C. R. Soc. Biol. CXIV(30):369,371.1933; idem CXV(12):1354. 1356.1934.
64. *Van de Velde, H.* — La Cellule X(2):403.1894.
65. *Van de Velde, H. & Denys* — La Cellule XI:395.1895.
66. *Woolpert, O. C. & Dack, G. M.* — J. Inf. Dis. LII(1):6.1933.
67. *Walbum, L. E.* — Bioch. Zeitschr. CXXIX:367.1922.
68. *Wadsworth, A. B. & Hoppe, E. N.* — J. of Immunology VI:399.1921.
69. *Weise, E. C.* — J. Amer. Med. Assn. XCV:324.1930.
70. *Willstätter, Krant & Erbacher* — Berl. d. deutsch. Chem. Gesellschaft LVIII:2448.1925.
71. *Wassermann, A. & Takaki, T.* — Berl. Klin. Woch. XXXV:5.1898.
72. ———— Lancet CCXIX(5592):974.1930.
73. *Zdrodowski, P. & Voronine, E.* — Ann. Inst. Pasteur XLVIII(5):617.1932.
74. *Branham, S. E. & Lillie, R. D.* — J. Bacteriology XXV:90.1933; Publ. Health. Rep. XLVII:1683,2137.1932.
75. *Ferry, N. S.; Norton, J. F. & Steeb, A. H.* — J. Immunology XXI(4):293.1931.
76. *Kindell, D. & Costello, M. J.* — J. Amer. Med. Assn. CII:1287.1934.

(Trabalho da Secção de Immunologia Experimental e Sorotherapia do Instituto Butantan, recebido em maio de 1934. Dado á publicidade em dezembro 1934).



Acção dermotoxica da toxina



Lesões necrosantes produzidas pela inoculação da toxina 115, por via intradermica.

Mem. Inst. Butantan
Vol. VIII. 1933-1934.



Fig. 1

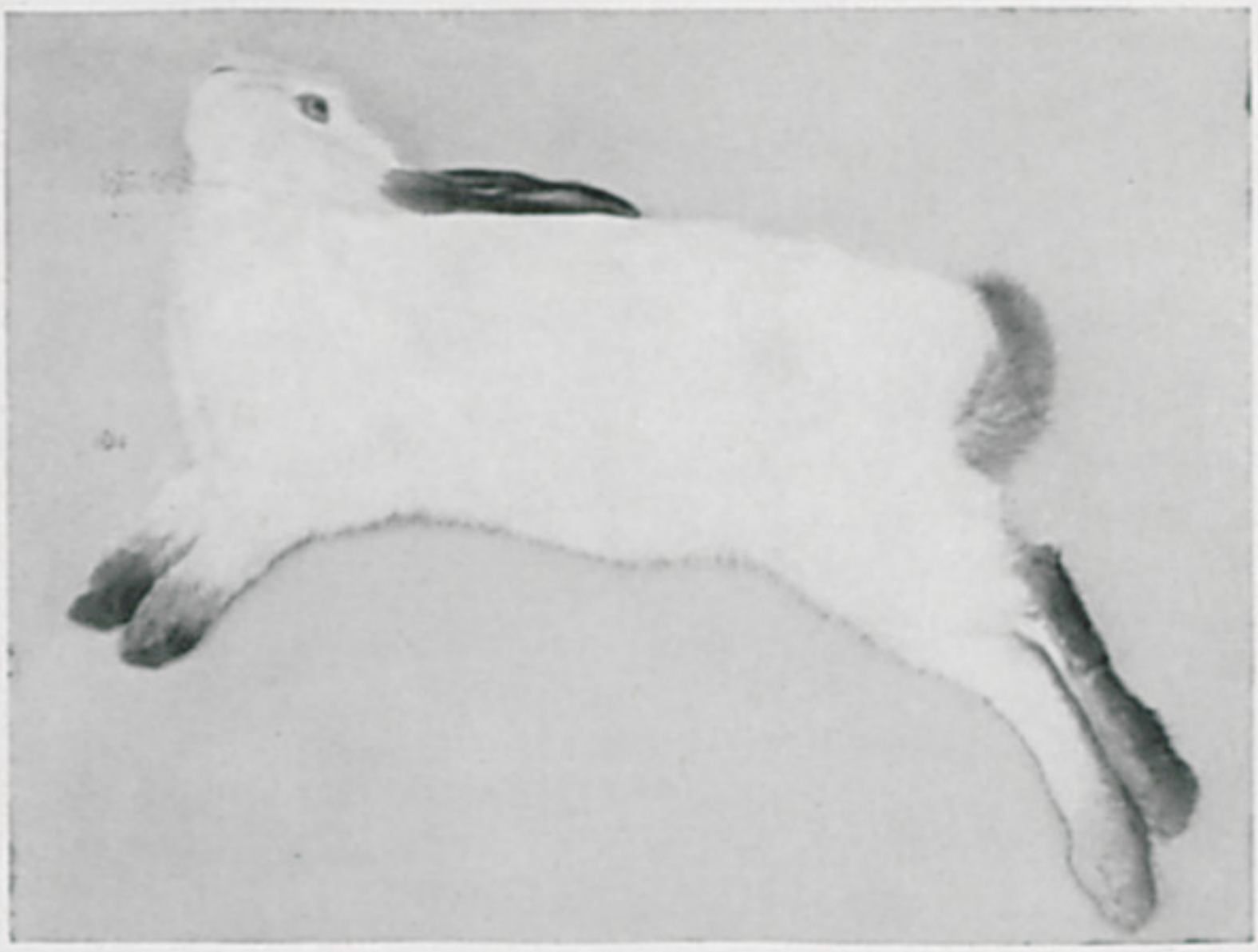


Fig. 2

Cobaias e coelho em tetania, inoculados com a toxina estaphylococcica por via transocular.

ESTUDOS SOBRE GONADAS E HYPOPHYSE

POR

THALES MARTINS

(com 3 gravuras no texto)

612.492

ESTUDOS SOBRE GONADAS E HYPOPHYSE

I. Desenvolvimento precoce dos caracteres sexuaes em gallinaceos tratados com substancias gonado-estimulantes do soro gravidico equino.

POR

THALES MARTINS

Os effeitos biologicos obtidos pela injecção de substancias gonado-estimulantes variam conforme a fonte do material: hypophyse, urina gravidica humana, soro de egua prenhe. O estabelecimento definitivo da identidade desses principios caberá á chimica, mas, até que nossos conhecimentos cheguem a esse ponto, podemos recorrer aos effeitos biologicos para tal caracterização.

Uma das differenças mais importantes entre o "Prolan" (*) e os hormonios extrahidos do lobo anterior vem a ser a completa inactividade do primeiro sobre aves, conforme verificações de Riddle (1), Schockaert (2), Domm (3) e outros. Domm provocou effeitos muito nitidos em gallinaceos, injectando-lhes extractos de lobo anterior.

De nosso lado, procurámos verificar quaes seriam os effeitos produzidos em gallinaceos infantis (pintos) pela inoculação dos hormonios encontrados no soro de egua prenhe, completando, assim, a observação de Cole e Hart (4) e Zondek (5) que, como é sabido, demonstraram a existencia, nesse material, de substancias capazes de estimular fortemente as gonadas de roedores infantis.

Para esse fim, injectámos o soro *in natura,* preparado com o sangue de eguas, de 60 a 90 dias de prenhez. A dose diaria do soro, variante de 0,5 a 2,5 cc., foi bem supportada pelos pintos.

Os primeiros effeitos assignalados consistiram num desenvolvimento accelerado dos appendices carnosos da cabeça (crista, barbela e caruncula), que se

(*) Zondek denominou de «Prolan» aos hormonios gonado-estimulantes do lobo anterior da hypophyse e ás substancias de effeitos semelhantes, encontradas nos humores gravidicos. Tratando-se de substancias provavelmente differentes, é defeituosa essa denominação global. Julgamos que o termo «Prolan» deve ser applicado somente á substancia gonado-estimulante da urina e sangue de mulher gravida. Com Evans, usamos nós tal nome só para esse caso especial.

tornaram perceptiveis já no 4.° dia de tratamento, tanto nas femeas como nos machos, porém mais pronunciados nestes ultimos. Foram injectados 8 pintos, com resultados concordantes, conforme se deprehende dos seguintes exemplos:

a) Serie de pintos da raça gigante negra, de Jersey, da mesma ninhada.

Tratamento iniciado no 13° dia de idade.

No 36° dia: Areas da superficie de uma das faces dos appendices carnosos, decalcadas em papel millimetrado:

Macho tratado: Crista 536 mm²; barbela 203 mm²; carunculas bem desenvolvidas (Fig. 2). Femea tratada: Crista 244 mm²; barbela 80 mm² (Fig. 3). Macho testemunha: Crista 94 mm²; barbelas rudimentares (Fig. 1). O testiculo do injectado cerca de 8 vezes maior que o do controle.

b) Serie de pintos da raça Leghorn, branca.

Tratamento iniciado no 2.° dia de idade.

Mensurações feitas após 19 dias:

Macho tratado: Crista 359 mm²; testemunha 30 mm²; femea tratada: 189 mm²

Os appendices carnosos apresentaram-se turgidos, succulentos e vermelhos escarlate, principalmente nos pintos de raça gigante negra. Figs. 2-3. As cloacas, nos dois sexos, apresentaram-se bem desenvolvidas, rubras e vascularizadas, ficando a da femea muito maior.



Domm, que trabalhou com extractos de lobo anterior, interpretou os effeitos observados sobre a crista e barbela das femeas como devidos ao estimulo da parte medullar dos ovarios, que produziriam hormonio masculino.

Notámos um desenvolvimento precoce do instincto combativo, nos machos injectados, e algumas modificações na phonação. Um canto de gallo, entretanto, não foi possivel observar, pelo menos durante o prazo observado; por questão de dosagem, talvez.

O exame da genitalia mostrou que, tanto os testiculos, como os ovarios, augmentaram de tamanho; a differença foi maior nos testiculos. O canal deferente e, mais ainda, os oviductos adquiriram tambem grande desenvolvimento. O exame histologico revelou, no caso dos testiculos, augmento do diametro dos tubos seminiferos e espermatogenese em franca evolução; intersticios mais desenvolvidos do que no testemunha.

Quaes são as indicações que se podem tirar destes resultados? Podemos resumir assim as principaes acções biologicas provocadas pelas substancias gonado-estimulantes, conforme os dados classicos:

1. Os extractos de lobo anterior da hypophyse são igualmente activos em mammiferos normaes e nos hypophysectomizados, e muito activos em aves.

2. O "Prolan" do sangue e da urina de mulheres gravidas é inactivo, ou age de modo differente, sobre femeas hypophysectomizadas segundo se deprehende dos estudos de Evans e collaboradores (6); elle é completamente inactivo sobre aves.

3. O soro de egua prenhe entre o 2º e o 3º meses é activo em mammiferos normaes e nos hypophysectomizados (Evans e collaboradores); o é tambem em aves, conforme acabámos de demonstrar.

As substancias gonado-estimulantes encontradas no soro gravidico equino são, portanto, do ponto de vista dos effeitos biologicos, muito mais proximas dos hormonios do lobo anterior do que o "Prolan" gravidico humano.

ABSTRACT

Experiments consisting in the inoculation of serum of pregnant mares into chicks have showed the extracts of pre-hypophysis to be equally active on mammals either normal or hypophysectomized. These extracts, however, are very active on birds.

Prolan obtained from blood or urine of pregnant women is inactive or acts differently on hypophysectomized females (Evans and collab.). It is completely inactive on birds.

Serum taken from mares between their 2nd and 3rd month of pregnancy is active on mammals both normal and hypophysectomized (Evans and collab.). It is active also on birds.

The gonado-stimulating substances found in normal equine pregnant serum are, therefore, much closer to the pre-hypophysis hormone than to the human pregnant Prolan from the standpoint of their biological effect.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Riddle, O.* — Endocrinology XV:307.1931.
2. *Schockaert, J.* — C. R. Soc. Biologie CVIII:429.1931.
3. *Domm, L. V.* — Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. XXIX:308 *et* 310.1931.
4. *Cole, H.* & *Hart, G.* — Amer. J. Physiology XCIII:57.1930.
5. *Zondek, B.* — Die Hormone des ovariuns und des Hypophysenvorderlappens — Berlin, 1931.
6. *Evans, H.; Penchar, R.; Simpson, M.* & *Meyer, K.* — Mem. Univ. California XI: 253.1933.

612.492

ESTUDOS SOBRE GONADAS E HYPOPHYSE

II. Sobre os resultados da parabiose de ratos femeas com ratos castrados e hypophysectomizados.

POR

THALES MARTINS E RAUL F. DE MELLO

O methodo da parabiose forneceu, recentemente, alguns esclarecimentos interessantes no dominio da physiologia das glandulas sexuaes e do lobo anterior da hypophyse, tendo demonstrado, por exemplo, que, nos animaes castrados, o sangue se enriquece de substancias gonado-estimulantes. Assim, quando se unem dois ratos infantis, sendo um delles castrado, observa-se, no normal, maturidade sexual precoce; no caso de o normal ser uma femea, os ovarios e utero se desenvolvem, podendo attingir tamanhos monstruosos, conforme o demonstraram Kallas (1), Fels (2), Martins (3) e outros. Ha, portanto, effeitos semelhantes aos observados nos animaes tratados com hormonios pre-hypophysarios, pelo que Kallas e Martins admittiram que as gonadas controlam o funccionamento do lobo anterior, de modo que, depois da castração, a hypophyse entra em hyper-funcção. Experiencias de typos variados (3) têm confirmado esse ponto de vista, sobre o qual não nos podemos extender agora.

Naturalmente, a experiencia definitiva, para demonstrar que os effeitos observados na femea normal em parabiose com uma castrada são devidos a um excesso de hormonios pre-hypophysarios nesta ultima, consistiria em realizar a parabiose de uma femea normal com um parceiro castrado e ao mesmo tempo hypophysectomizado. É esse o assumpto da presente nota.

Para a hypophysectomia do rato, seguimos a technica de Koyama (4). Para controle do exito da operação, cortavamos em serie a hypophyse retirada; alem disso, examinavamos cuidadosamente a região da sella turcica por occasião da necropsia. A parabiose era feita de 3 a 5 dias após a hypophysectomia e a castração no mesmo acto da parabiose.

Embora a sobrevida nos parabioticos de nossas experiencias anteriores fosse em media muito longa, houve uma mortalidade alta nos casos em que um

dos parceiros era hypophysoprivo. De 15 pares assim operados sobreviveram mais de 7 dias somente os cinco pares aqui relatados. Todavia, os resultados são bem itidos: em nenhum delles o parceiro normal apresentou estro; ao passo que, nos pares com um animal simplesmente castrado, o estro se manifestara, na maior parte dos casos, antes do 9º dia. Outrosim, as differenças de peso dos ovarios nos dois grupos de experiencias são suggestivas (Quadro A).

O exame microscopico dos ovarios e da genitalia accessoria mostrou um parallelismo com os effeitos ponderaes. Assim, nos casos de femeas parabiosadas com parceiros simplesmente castrados, viam-se folliculos e corpos amarellos bem desenvolvidos, em numero superior ao normal, e utero e vagina bem crescidos, em estro. Já nos pares em que o parceiro castrado era tambem hypophysectomizado, a genitalia da femea normal não se distinguia da que se observa nos animaes normaes solitarios, do mesmo peso e idade. O papel do traumatismo operatorio fica relegado, pois nos pares controles A1, A2 e F4K, sujeitos á mesma intervenção, o fragmento do lobo anterior restante foi sufficiente para estimular os ovarios da parceira normal.

Conclusão: Em experiencias de parabiose de ratos femeas com ratos castrados, verificámos que a ablação da hypophyse do parceiro castrado impede os effeitos de estimulo á genitalia da rata normal, pelo menos durante os 14 primeiros dias de existencia parabiotica. Trazemos, assim, uma confirmação á interpretação anterior, de que os intensos effeitos de estimulo, observados na genitalia do animal normal em parabiose com um castrado, correm por conta de um excesso de hormonios pre-hypophysarios nos humores deste ultimo.

ABSTRACT

Experiments of parabiosis of normal female rats with castrated rats showed that hypophysectomy performed on the latter inhibits the stimulus exerted on the genitalia of the normal female rats at least during the first 14 days of their parabiotic existence. From the data available it is clear that the stimulus on the genitalia is due to the pre-hypophyseal hormones circulating in excess in the castrated rats.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Kallas, H.* — Arch. f. d. ges. Physiologie CCXXIII:232.1929.
2. *Fels, E.* — Arch. f. Gynäkologie CXXXVIII:16.1929.
3. *Martins, Th.* — Suppl. Mem. Inst. Oswaldo Cruz (10):233.1929; C. R. Soc. Biologie CXV:1342.1934.
— *Martins, Th.* & *Rocha, A.* — Endocrinology XV:421.1931.
4. *Koyama, R.* — Jap. J. Med. Sciences V:41.1931.

(Trabalhos da Secção de Physiopathologia Experimental e Endocrinologia do Instituto Butantan, apresentados em setembro de 1934. Dados á publicidade em dezembro de 1934).

QUADRO A

Designação	Typo de parabiose	Duração da vida parabiotica Dias	Dados relativos á ♀ normal				
			Peso inicial	Peso final	Cyclo estral	Peso dos ovarios	Peso dos ovarios % peso do corpo
A1	♀ normal + ♀ castrada e parcialmente hypophysectomizada . . .	15	56 gm.	54 gm.	9º dia, estro	34 mgm.	62 mgm.
A2	Idem, idem	9	40	54	3º dia, estro	21	38
F4K	♀ normal + ♂ castrado e punccionado no craneo	16	42	32	8º dia, estro	95	296
F6K	♀ normal + ♂ castrado	11	35	33	7º dia, estro	29	87
F5K	♀ normal + ♂ castrado	13	36	28	12º dia, estro	20	71
M1	♀ normal + ♀ castrada	16	41	64	7º dia, estro	29,5	46
ML10	♀ normal + ♂ castrado	13	48	67	7º dia, estro	57,5	85
							97 Media
L3	♀ normal + ♀ castrada e totalmente hypophysectomizada. . . .	10	53	48	Sempre diestro	9,5	19
L4	♀ normal + ♂ castrado e hypophysectomizado	8	73	73	Idem	13,5	18
M7	Idem, idem	7	42	41	Idem	12	29
M5	♀ normal + ♀ castrada e hypophysectomizada	9	45	49	Idem	10,5	21
M8	♀ normal + ♂ idem, idem . . .	13	48	53	Idem	8,5	16 20 Media
8K	♀ controle solitaria.	—	—	54	Idem	10,5	19

CONTRIBUIÇÕES Á MATERIA MEDICA VEGETAL DO BRASIL

POR

WALDEMAR PECKOLT

615.328.1

CONTRIBUIÇÕES Á MATERIA MEDICA VEGETAL DO BRASIL

I. Estudo pharmacognostico da *Cucurbita maxima* Duch e *Cucurbita pepo* L. *(Cucurbitaceae)*

POR

WALDEMAR PECKOLT

Nomes vulgares: — Aboboreira, Abobora, A. grande, A. menina, A. moranga, Jurumú, Gerimú, Gerumú (em tupy-guarany "Bago molle"), Taqueira.

Pelo nome de Abóbora, são conhecidos os fructos de diversas Aboboreiras plantas da extensa familia *Cucurbitaceae,* sendo incluidas na Pharmacopéia brasileira: a *Cucurbita maxima* Duchesne, vulgarmente Abóbora moranga, Abobora grande, Jerumú, Jerimú, Jurumú, Gerumú e Gerumú-peba, variedade de fructo menor, á qual os indios Guaranys deram tal denominação, e a *Cucurbita pepo* Linn., vulgarmente Abobora menina, que parece ser variedade daquella, produzindo outras tantas variedades e variações, vulgarmente designadas pelos nomes de Abobora moranga. A. porqueira, A. Chila, etc.. Os indios Guaranys denominam de Veremú ou Jerumú á Abobora moranga e de Gerumú-peba a uma variedade, de fructo pequeno, achatado e de casca lisa, que tambem cultivam. Os franceses chamam indistinctamente ás Aboboras de "Courge" ou "Potiron"; os ingleses, de "Gourd" ou "Pumpion"; os alemães, de "Kürbiss"; os espanhóes, de "Calabacera" e os italianos, de "Zucca".

Patria: — America do Sul, Asia meridional, India e Africa (cosmopolita).

Distribuição geographica: — Perú, Brasil (Amazonas e diversos Estados) e outros paises, onde é bastante cultivada para uso alimentar, inclusive sob a forma de algumas das numerosas variedades e variações, decorrentes do cruzamento entre diversas especies. Predomina, no Rio de Janeiro, a Abóbora menina; em S. Paulo, a A. moranga e a Gerimú; no Norte, a Taqueira e a Gerimú; no Sul, a A. moranga e a Chila; em Minas Geraes, a A. moranga e a A. porqueira; etc..

Historico: — Essas plantas, que pareciam ter como patria a Asia meridional, são, no entanto, originarias da America do Sul (Perú e Brasil), conforme

o provam as investigações do illustrado botanico Whitmark. Diz elle que "a *Cucurbita maxima* existia no Perú, onde era cultivada desde tempos remotos, antes do descobrimento da America, pois suas sementes, em relativo estado de conservação, foram encontradas nos tumulos peruanos do *Arem*, pelos naturalistas Reiss e Stübel." Gustavo Peckolt, em sua "Monographia das Cucurbitaceas brasileiras", diz, com fôros de razão, que devemos consideral-a planta brasileira, por ter sido encontrada na malóca dos indigenas da Amazonia, por occasião do descobrimento do Brasil, sendo por elles cultivada antes daquella epoca e existindo em logares onde se presume não ter anteriormente penetrado algum civilizado. Posteriormente, foi tambem encontrada em estado de plena cultura, entre os indios Nhambiquaras, quando do desbravamento dos sertões matto-grossense e amazonico (Roquette Pinto, *in* Rondonia, 1918).

Do que não se pode duvidar é de ser a Abobora planta cosmopolita, que se acclimatou em todos os paises tropicaes do universo, desenvolvendo-se tão bem na America, como na Africa e na Asia, dahi espalhando-se então para outras partes do mundo. Infelizmente, não se conhece, até agora, a planta primitiva que deu origem ás centenas de variedades e variações, hoje existentes; parece, entretanto, que ella se ficou na India, onde tem sido cultivada desde os mais remotos tempos. Nos escriptos de Olivier de Serres, fins do seculo XVI ou começo do XVII, já se acha mencionada uma noticia sobre a Abobora, provinda da Africa e da India e até mesmo doutros pontos da Asia.

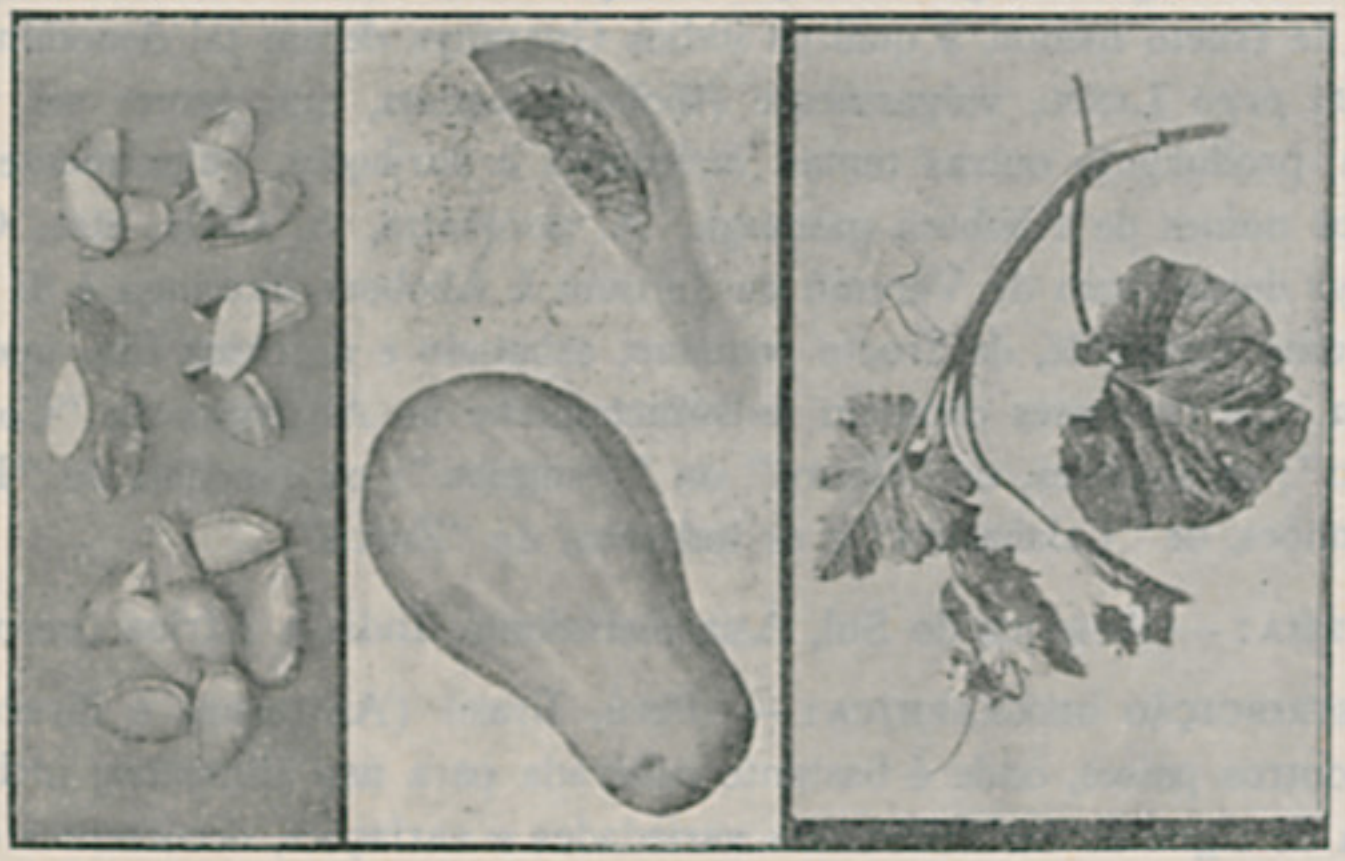


Fig. 1
Semente, fructo e rama da Cucurbita pepo (A. menina).

Phytographia (Figs. 1 e 2): — Planta de caule herbaceo, rasteiro, sarmentoso, cylindrico, caniculado, fistuloso, carnudo e piloso, de 6 a 12 m. de extensão, munido de gavinhas ramosas. Por vezes, alastra-se pelo sólo ou apoia-se sobre os galhos de outras plantas, tornando-se ascendente, subindo sobre arbustos pro-

ximos, aos quaes se prende á custa de suas numerosas e fortes gavinhas. Caule que pode subdividir-se em muitas ramificações, formando tantos outros, radiscentes. Suas folhas são grandes, alternas, longamente pecioladas, de contornos angulosos e denteados, com cinco lobos arredondados e obtusos, aspero-pubescentes, apresentando a nervura mediana principal proeminente na pagina inferior e avelludada. As flores são axillares, grandes, companuladas, de côr amarella caracteristica, monecicas, apresentando 5 divisões unidas inferiormente em calice. A flor masculina possue calice campanulado, afunilado na base, com 5 estames triadelphos synanthereos e inserido na base da corolla. As antheras são lineares, em forma de S, curvas, abrindo-se longitudinalmente; pistillo rudimentar. A flor feminina possue o calice e a corolla da mesma forma que a masculina, tendo, porém, o calice adherente ao ovario. As antheras são estereis; o ovario, infero, com 3 a 5 lojas; estylete curto, apresentando na parte superior 3 grossos estygmatos glandulosos. O fructo (peponideo) é globuloso, achatado, segundo as especies, alcançando grandes dimensões e peso, de superficie lisa, lustrosa, de côr amarello avermelhada, ou pallida, quando maduro. Suas sementes, encerradas na cavidade do fructo, são adherentes á sua polpa ou parede interna; são geralmente largas, achatadas, ellipticas, revestidas, em seu contorno exterior, por rebordo saliente; episperma crustaceo, apresentando uma amendoa, que constitue a droga. Esta amendoa é de côr branca, ou esverdeada, de sabor agradavel, medindo cerca de 1 cm. de extensão por 12 cm. de largura.



Fig. 2
Cucurbita maxima DUCH. Abobora grande.

Droga: Endosperma seminis cucurbitae.

Caracterização da droga: — A semente, tambem chamada "pevide", é oval, mais aguda em uma das extremidades, onde se encontra o hilo com a micropyla, que mede 18 a 23 mm. de extensão, 8 a 10 mm. de largura e 2 a 3 mm. de espessura. Suas faces, ligeiramente convexas, são margeadas por um rebordo saliente, cylindro-circular e recobertas por delgada pellicula, facilmente destacavel, deixando a descoberto o endosperma, duro e de côr branca embacia-

da. A amendoa, alem deste espermoderma espesso e cartilaginoso, é recoberta de tegumento subjacente, finissimo, de côr branco esverdeada, adherente; é composta de dois cotyledones plano-convexos, esbranquiçados, oleosos e ligados, nas suas partes mais afiladas, por uma radicula delgada.

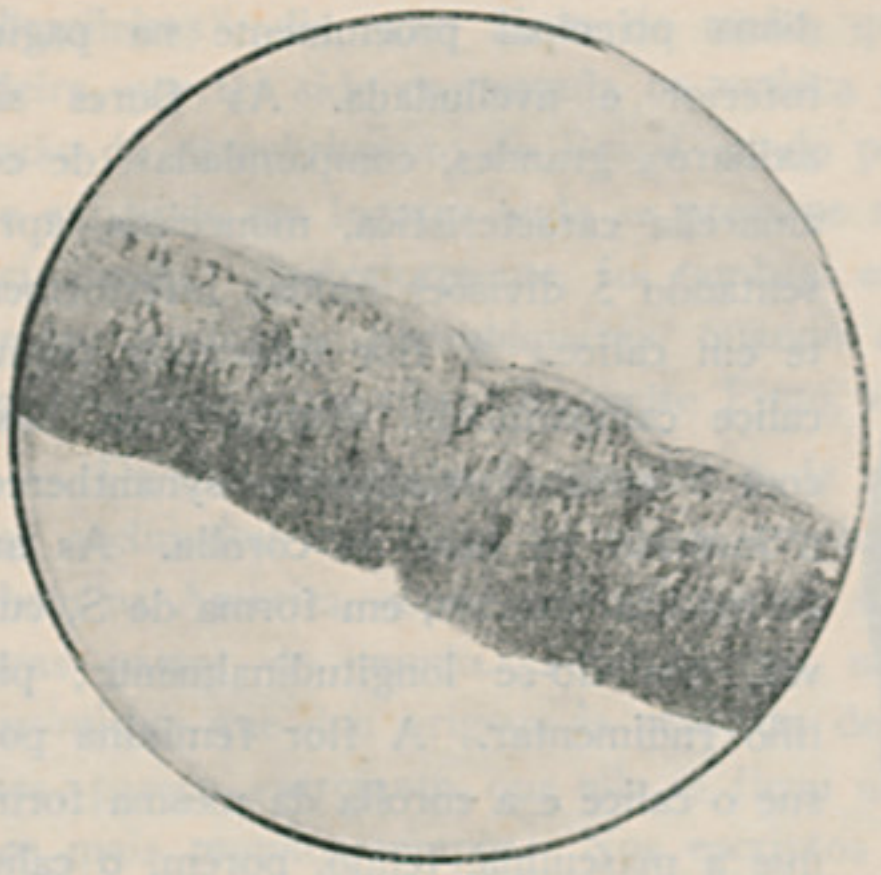


Fig. 3
Corte transverso da semente descorticada da Cucurbita maxima (A. moganga).

Estructura microscopica (Fig. 3) : — "O espermoderma é constituido por 6 camadas differentes: *a*) fileira de grandes cellulas dispostas em paliçada e paredes delgadas; *b*) segundo involucro, formado de 3 a 4 filas de cellulas alongadas na direcção tangencial, com paredes providas de dilatações reticuladas; *c*) camada esclerosa, formada de uma só fila de grandes cellulas alongadas radialmente, de cerca de 75μ de comprimento, de paredes espessas e canaliculadas; *d*) parenchyma formado em sua parte exterior, espessa, de cellulas, irregulares, de paredes não reticuladas; *e*) nova camada de parenchyma interno, do qual é separada por uma a duas filas de pequenas cellulas achatadas; *f*) involucro interno formado de uma só fila de cellulas rectangulares. Os cotyledones são formados de um tecido cellular encerrando numerosos e pequenos grãos de "aleurona" e "gotticulas de oleo." (Pharmacopeia brasileira, R. A. Dias da Silva).

Pharmacochimica — A analyse da Aboboreira e suas principaes partes constituintes, folha, flor, fructo e sementes, foi executada minuciosamente pelos chimicos Theodor e Gustavo Peckolt e publicada em 1888-1901 *in* "Berichte der deutschen pharmaceutischen Gesellschaft". cit. "Monographia das Cucurbitaceas medicinaes brasileiras", por G. Peckolt, A. A. B. 1918. Até então, apezar de se tratar de planta cultivada desde tempos remotos, os trabalhos chimicos sobre este vegetal eram relativamente escassos. Dentre estes, os mais extensos foram os de Braconnet e Geraldini, que, analysando apenas a parte carnosa do fructo, encontraram:

$^0/_{00}$	*Abobora menina*	*A. moranga*	*A. gerimú*
Humidade	941,781 gms.	769,700 gms.	929,400 gms.
Glycose.	2,730 »	25,000 »	6,920 »
Albumina e legumina.	1,630 »	13,630 »	1,400 »
Gordura e materia corante	vestigios	0,080 »	0,060 »
Dextrina, subst. extrat., acido malico, etc. .	29,360 gms.	126,020 »	20,920 »
Saes inorganicos (cinzas)	24,500 »	38,590 »	41,300 »
Azoto (pesquisado por Péligot)	0,271 »	2,181 »	0,224 »
Idem por 100 gms. de substancia secca. . .	4,660 »	10,730 »	3,200 »

As citadas substancias inorganicas são: carbonato de potassio, sulfato de potassio, chloreto de potassio, chloreto de magnesio, phosphato de calcio e magnesio, alumina, oxydo de ferro e silicio.

Pela analyse de Braconnet verifica-se que a A. moranga é a mais rica em substancia nutritiva, tomando-se o azoto por valor nutritivo; comparando-lhe o valor nutritivo com o do trigo, verifica-se que 100 partes de trigo equivalem a 147 partes da polpa do fructo da Abobora moranga, dentre todas as analysadas a mais rica em substancias azotadas.

— Maior interesse do que as demais partes da planta apresenta-nos a *semente,* em virtude da sua acção especifica contra as Tenias ou "Solitarias", plathelminthos que parasitam o homem e os animaes.

G. Peckolt, analysando todas as partes constituintes dessa planta, encontrou, no fructo maduro da Abobora moranga (*Cucurbita maxima*), em 1000 gms. da polpa ou parte carnosa, que constitue sua parte util a fins culinarios:

	gms.
Humidade.	897,000
Principio corante (*Abobrina*) ou *Abobora — carotina*.	3,550
Substancia aromatica especial.	0,120
Acido abobrico	0,250
Principio amargo.	0,220
Amido, substancias albuminoides, gommosas, etc.	32,550
Materia extractiva, saccharina.	55,940
Saes inorganicos (cinzas)	4,120
Cellulosa, etc.	5,450

O principio corante *abobrina* (abobora-carotina) é de côr amarello-ouro, tornando-se, ao contacto do ar, mais escuro ou alaranjado; assemelha-se muito á *carotina,* por suas propriedades tanto physicas, como chimicas.

A substancia aromatica é soluvel no ether sulfurico, sendo ella que empresta á massa da abobora o aroma particular que esta possue. O *acido abobrico* é um acido organico *sui generis,* de sabor identico ao da parte carnosa e polpuda da abobora madura. O principio amargo é soluvel na agua e no alcool de 96°C.

A presença do amido, na massa polpora da abobora madura, é a substancia que representa a liga da massa cosida e que reduz o valor nutritivo do fructo. O valor alimenticio da abobora é comparado ao das cenouras e não deve, portanto, ser desprezado, tanto mais quanto, durante a cocção, elle perde grande quantidade da agua que encerra, fornecendo, em estado secco, cerca de 4,6 % (Péligot) a 10,7 % (Peckolt) de azoto, conforme a "variedade" da planta. Isto sem falar em acidos aminados e, sobretudo, na vitamina A, cuja presença estudos modernissimos têm revelado em quantidade apreciavel, sob a forma de carotenio, na abobora.

Pesquisando todas as demais partes da planta, G. Peckolt encontrou, apenas nas sementes, um acido organico *sui generis,* ao qual denominou *acido cucurbico,* não obtendo outro qualquer principio organico, alcaloide, ou glycoside, embora empregasse diversos methodos de ensaio.

A este acido organico (*acido cucurbico*), que acompanha o oleo em pequena porção, attribuem-se as propriedades tenifugas da semente de abobora.

Na analyse das sementes frescas, privadas da casca (pevides), da *Cucurbita maxima* (Abobora moranga), o alludido chimico encontrou, por 1000 gms.:

Oleo gorduroso	468,321
Acido cucurbico	0,522
Aleurona, acido resinoso, etc.	23,544
Subst. albuminoides, gommosas, acido malico, assucar, etc.	106,527
Saes inorganicos	72,325
Parenchyma, partes insoluveis, etc.	236,117
Humidade	94,540

Identica analyse, pelo mesmo chimico procedida nas sementes descorticadas da *Curcubita pepo* (Abobora menina) revelou, por 1000 gms.:

Oleo pingue	215,300
Acido cucurbico	0,520
Acido malico, etc.	106,550
Emulsina, gomma, etc.	24,630
Saes de acidos inorganicos	72,570
Parenchyma, partes insoluveis, etc.	580,430

— "O oleo é de côr amarello-esverdeada com ligeira fluorescencia avermelhada, transparente, muito fluido, de aroma um tanto semelhante ao da oliveira e quasi do mesmo sabor." Seu peso especifico a + 18°R = 0,917, solidificando-se a — 10°C. E' soluvel no ether de petroleo, no alcool amylico, na essencia de therebintina, no sulfureto de carbono e na benzina. Pouco soluvel no alcool de 36°C e no alcool de 98°C; seu indice de iodo é de 116,5 a 120,5. Este oleo compõe-se de *palmitina, myritina,* e *acido oleico.*

— Segundo o chimico Heckel, a acção tenifuga das sementes de abóbora é devida a um principio resinoso, por elle obtido e denominado *pepo-resina,* o qual achou na proporção de 1|17 na pellicula verde que envolve as sementes.

Os chimicos Schulze e Banceri, examinando os brotos da planta nova, encontraram os acidos aminados, *leucina e tyrosina,* na proporção de 0,15°|°°, aos quaes attribuem valor nutritivo.

— No serviço da Secção de Botanica Medica do Instituto Butantan obtivemos o *oleo cucurbico* e o *acido cucurbico* das sementes frescas e descorticadas, da *Cucurbita maxima,* na proporção de 400 gms. de oleo puro para 1000 gms. das sementes e, igualmente, pelo ether sulfurico, conseguimos isolal-os das sementes integraes (com perisperma), reduzidas a pó, na proporção de 215 gms. de oleo por 1000 de sementes da planta.

O oleo das sementes descorticadas é de côr esverdeada com reflexos vermelhos, consistencia xaroposa e aroma agradavel que faz lembrar o das amendoas.

O oleo obtido das sementes integraes é de côr verde escura, com reflexos sulferinos, mais viscoso e pesado, de sabor acidulo e algo adstringente, aroma especial da abóbora madura.

Este oleo pode ser obtido a frio pela pressão das sementes, quando descorticadas, na proporção de 25 a 28 %. Nós o obtivemos, igualmente, pela fervura em agua, processo este que nos forneceu producto de qualidade inferior, côr amarello esverdeada, consistencia bem mais espessa, de aspecto grosseiro, turvo; quanto ao rendimento, foi muito inferior ao obtido pelo ether sulfurico, ether de petroleo, ou tetra-chloreto de carbono. Podemos adiantar que o melhor methodo se nos revelou ser o da extracção pelo ether sulfurico, a 1:2, pois o producto é de optima qualidade e aspecto, limpido, de côr esverdeada com reflexos avermelhados e de acção mais constante. Experimentámos ainda obtel-o directamente pelo oleo de ricino, mas o producto conseguido não logrou satisfazer-nos, quanto ás suas propriedades geraes, physicas, chimicas e therapeuticas.

O *oleo cucurbico* que obtivemos pelo ether sulfurico é soluvel no chloroformio, no ether de petroleo, no alcool amylico, na benzina, na essencia de therebintina e no sulfureto de carbono; difficilmente no alcool de 96°C, no absoluto na proporção de 1:260 e insoluvel no de 36°C e de 42°C.

Ultimamente na França alguns auctores têm obtido um acido organico (*acido citrulico*), que suppomos seja de outra especie do genero *Cucurbita,* pois a escassez de suas propriedades não permitte que o julguemos analogo ao do *oleo cucurbico,* anteriormente isolado pelo chimico G. Peckolt da *Cucurbita maxima* e da *C. pepo.*

— O *acido cucurbico,* que obtivemos por separação do *oleo cucurbico,* é de sabor amargo acidulo, aroma pouco accentuado (a lembrar o das sementes, quando contusas); é soluvel no ether sulfurico, no chloroformio e difficilmente no alcool de 98 %. Seu soluto aquoso incompleto apresenta turvação fluorescente, mantendo-o em suspensão permanente. Precipitado pela agua destillada e retido por filtração, sêcco na estufa, apresenta-se amorpho, de côr amarellada e sabor acre amargo, fortemente acido, um tanto adstringente, dando reacção franca ao tornasol. Foi obtido na proporção de 0,52 °/∞, ou sejam de 200 gms. de oleo das sementes desprovidas da casca.

— Reacções do *oleo cucurbico,* que obtivemos, pelo ether sulfurico, das sementes descorticadas e frescas da *Cucurbita maxima*:

I. Tratado pelo acido sulfurico (D. = 1.840) a 1:5 — coloração vermelho castanha, que passa ao pardo immediatamente.

II. Pelo acido azotico — não ha reacção.

III. Pelo nitrato acido de mercurio 1:5 — vascolejada, a mistura torna-ra-se amarellada e semi-opaca.

IV. Com a soda caustica liquida (D = 1.15) — a mistura torna-se amarello clara que passa ao esbranquiçado, ficando gelatinosa.

V. Com a ammonia liquida e concentrada — a mesma reacção, passando, porém, á côr leitosa.

VI. Com a potassa caustica liquida (D = 1.21) — vascolejada, a mistura torna-se leitosa e, ao fim de 5 m., transforma-se em massa semi-solida.

VII. Com o acido nitrico fumegante (1:2) — coloração esverdeada na camada de contacto dos dois liquidos, desapparecendo logo em seguida, pela agitação.

— O oleo que obtivemos pela fervura das sementes reduzidas a pó e integras, da mesma planta, é de côr vermelho parda transparente quando em pequeno volume, turvo quando em massa. Tratado pelo acido sulfurico (D = 1.840) a 1:5, adquire coloração vermelha barrosa, mais carregada.

Com o acido nitrico fumegante, dá coloração verde na zona de contacto e, ao fim de 2 m., apresenta nova reacção com desprendimento de vapores nitrosos, tornando-se a mistura de côr amarellada.

Propriedades e indicações therapeuticas: — O oleo das sementes de abobora é um *tenifugo,* bastante reputado e efficaz, actuando igualmente sobre as ascarides.

O oleo das sementes descorticadas pode vantajosamente substituir o oleo de ricino, nas preparações vermifugas de chenopodio, porque, em dose igual á daquelle, actua como laxativo, augmentando o valor da formula, reforçando-a na sua acção vermifuga.

Pharmacologia e emprego official: — As amendoas das sementes frescas descorticadas são usadas como tenifugo, na dose de 40 a 60 gms. para crianças e de 100 a 150 gms. para adultos, uma vez piladas e emulsionadas no leite de vacca, leite de côco, no mel ou na agua; devem ser tomadas em jejum e seguidas de um purgativo salino 1 a 2 horas após. Para esse fim, aconselhamos a seguinte formula:

Electuario tenifugo:

Sementes frescas, descorticadas e piladas, da *Cucurbita maxima*.	100 gms.
Leite de *Cocos nucifera* (Côco da Bahia) . .	100 "
Assucar ou mel para adoçar.	q. s.

Para ser usado em jejum e seguido, 1 a 2 h. após, de um purgativo salino. Ás crianças, 40 gms. do electuario, para cada 5 annos de idade, ou sejam 20 gms. das sementes de abóbora, proporcionalmente.

O *oleo cucurbico* é usado na dose de 15 gms. contra a teniase, conforme indicação da Pharmacopéia dos E. U. do Brasil; Carvalho de Lima, que o ensaiou experimentalmente, recommenda-o, para o adulto, na dose de 20 gms. de uma só vez, em jejum e seguido de um purgativo após 1 hora.

— Preparámos, com o endosperma fresco da semente descorticada da *Cucurbita maxima,* um extracto ethereo, que aconselhamos para succedaneo do *Extracto ethereo de feto macho,* como tenifugo, nas doses de 1 gm. por anno de idade ás crianças e de 20 até 25 gms. aos adultos, administrado em capsulas gelatinosas, ou simplesmente addicionado ao oleo de ricino ou ao mel: esta foi a forma que nos pareceu offerecer maiores vantagens. Dos resultados e observações de seu emprego therapeutico será publicado proximamente minucioso relato, em collaboração com Alcides Prado, que está procedendo ás competentes verificações helminthologicas na Secção de Parasitologia do Instituto Butantan, em cuja Secção de Pharmacologia será feita opportunamente a experimentação meticulosa de todos esses principios.

Com o *oleo, o extracto ethereo,* e a *emulsão* das sementes frescas, nunca observámos, nem tivemos noticia, de qualquer accidente, visto ser essa droga completamente destituida de toxicidez, razão bastante para preferil-a ao *feto macho,* no tratamento da teniose humana.

Emprego officinal: — *Amendoa da semente fresca,* em electuario; *oleo cucurbico* e *extracto ethereo* da semente descorticada da *Cucurbita maxima.*

Usos da Aboboreira: — A aboboreira e suas numerosas variedades são das plantas mais frequentemente cultivadas em nosso país, e raro é o agricultor que de suas multiplas propriedades não se utiliza.

A polpa do fructo maduro é usada como alimento, tanto para o homem, como para alguns animaes. Sob todos os artificios da arte culinaria, ella figura nas mesas dos habitantes do interior do Brasil, mormente dos menos abastados. Seus brotos e pedunculos floraes, bem como as novas folhas, são usados como hortaliça, muito estimada e vulgarmente conhecida pelo nome de "cambuquira". Á "purée" feita com a polpa do fructo maduro se dá o nome de "quibebe". Os doces são muito estimados, quer em compotas, quer como cremes; quando seccos ao sol, chamam-se "cocadas de abobora" e são muito apreciados no país, de norte a sul.

O pequeno valor alimenticio que modicas porções dessa polpa encerram é perfeitamente corrigido pela addição do leite, do assucar e de cereaes moidos, ou da manteiga; desta forma, a abobora pode constituir um bom creme infantil e saborosas e nutritivas sobremesas.

— Em algumas regiões do país, os naturaes preparam, com as flores da Aboboreira, um xarope que empregam nas colicas infantis. Quanto ás sementes, usam-n'as torradas como amendoas, ou sob a forma de emulsão, empregando-as no tratamento do rheumatismo, molestias das vias urinarias e nas dysenterias. A proposito, dizem esses nativos que a "aboboreira é a despensa do pobre"...

Cultura e biologia: — A aboboreira é geralmente plantada em covas de 10 a 40 palmos de distancia, no centro de uma elevação, a qual os nativos chamam "murundú", dispostas entre as ruas do milharal. É necessario abrigal-a das correntezas d'agua ou enxurradas, pois as plantas novas se resentem da humidade excessiva.

A época do plantio occorre do mês de setembro a novembro, quando tardam as primeiras chuvas. É crença popular que, sendo o plantio feito por occasião da lua nova, os fructos serão maiores e mais humidos.

A aboboreira é plantada em logar definitivo, geralmente proximo a alguma sébe ou latada, na qual tende a subir. Deitam-se 2 a 4 sementes em cada cova, ao redor da qual eleva-se a terra para evitar a acção das chuvas.

A aboboreira exige, para sua boa producção, terra fofa, bem adubada e isenta de humidade; é costume entre os sertanejos lançarem u'a "mão cheia" de esterco de curral, curtido, no centro de cada "murundú" e ahi depositar, então, as sementes. Quando a planta attinge 1 m. de extensão, usam cortar o primeiro broto (operação a que denominam "capação"), afim de ramificar-se o caule, extendendo a rama em diversas direcções.

E' vegetal bi-annual, regulando produzir 15 a 30 fructos (aboboras) de diversos tamanhos em cada planta, alcançando alguns a media de 20 e até mesmo 30 kgms., de accordo com a fertilidade do solo. Os sertanejos costumam deixal-os amadurecer ligados ao pedunculo, pois, desta forma, se conservam em perfeito estado por mais de 6 meses, época da proxima colheita. Esta é realizada facilmente, amontoando-se os fructos em pilhas, para serem transportados depois, para logar abrigado da humidade, paiol geralmente.

— A aboboreira é cultivada desde os primeiros tempos do descobrimento do Brasil; tendo sido encontrada pelos primeiros colonizadores, foi por elles espalhada, ao ponto de servir para manter intenso commercio com as colonias da India.

A aboboreira reproduz-se tambem por "mergulhões", assim feitos: quando a planta cresce livremente e deseja-se augmentar o numero de pés, faz-se, sobre o segundo nó acima do fructo, uma incisão longitudinal, abaixo desse nó, firmando-o no solo por meio de uma forquilha, cobrindo-o com terra, de modo a abranger uma parte do caule, o qual não tardará a enraizar, formando uma nova planta.

Para outras plantações, devem-se escolher de preferencia os fructos mais desenvolvidos, e que mais expostos ao sol estiverem, mormente aquelles situados na parte superior da "latada"; para o fim em vista, deve-se colher o fructo escolhido, quando a planta tiver completado o seu cyclo vegetativo, isto é, quando seccar completamente. Os sertanejos usam um methodo original para se certificarem da epoca da completa maturação do fructo; embora este, logo que se inicia o amadurecimento, mude de coloração, passando ao amarello alaranjado em algumas especies, o que tambem coincide com a sécca do pedunculo, preferem, para maior certeza, dar duas a tres pancadas seccas sobre o fructo, o qual, estando completamente maduro, produz um som cavo, semelhante ao produzido pela pancada em um barril vazio e fechado, dando impressão de achar-se ôco, methodo este muito simples e pratico.

O rendimento produzido pela cultura da aboboreira em 1 hectare de terra é muito variavel, pois não se pode calcular da fertilidade do terreno e das condições atmospphericas de um modo geral; em media o rendimento é de 80 a 100 mil kilos por hectare de terra.

O agronomo Joiqueaine diz ser a media geral do peso total dos fructos de uma cultura de aboboreira de 100 a 125 mil kilos por hectare de terreno. Mas esta cifra está na dependencia dos diversos factores necessarios ao desenvolvimento normal dos fructos; algumas vezes se têm alcançado fructos da Abobora moranga pesando 40 ou mais kilos e com 150 cm. de circumferencia!

Quanto á quantidade de sementes em cada fructo, varia ella igualmente; a media é de 120 a 160 litros de sementes integraes, para cada 100 aboboras; geralmente, podemos dizer que um hectolitro de sementes é reduzido a 25 litros,

quando descascadas, dão um rendimento total de 20 litros de *oleo cucurbico*, Para descortical-as, é bastante deixal-as previamente a humedecer em agua durante 12 horas; desse modo, uma ligeira pressão da unha é o bastante para destacar-lhes com facilidade a casca.

— As sementes da abobora, guardadas em logar bem secco e privadas da humidade (previamente enxutas), conservam-se perfeitas durante alguns annos, mantendo o seu poder germinativo.

Sempre que se tiver em vista seleccionar uma qualidade de abobora, é imprescindivel plantar-se de uma unica das especies, porque facilmente degeneram pelo cruzamento, fornecendo outras tantas variações e nunca reproduzindo o typo primitivo.

— Muitas aboboras existem com denominações vulgares as mais diversas, as quaes não passam de simples "variações", provenientes da fórma typica e devidas a successivas culturas e cruzamentos, que modificam, não somente o aspecto, como a fórma e a coloração do fructo.

Os sertanejos do país e agricultores opinam que a *Abobora moranga*, pequena e achatada, de casca durissima e gommos salientes, côr vermelha, carmesim ou verde rosada tal uma maçã, vulgarmente denominada *Abobora paraguaya*, quando cultivada ao lado de outras especies, degenera, dando a *Abobora moranga*, bem maior, mais alta, e ainda apresentando gommos; em outras culturas, passará a apresentar-se oval arredondada, com ligeiras depressões, vestigios dos gommos; transformando-se, finalmente, em outra inteiramente diversa, sem gommo algum e arredondada, que é a *Abobora moranga* ou *Gerumú* (*Curcubita maxima* DUCH.), representada na inclusa Fig. 3. Assim tambem a *Cucurbita pepo* L., "Abóbora menina", "A. de pescoço", dá a "A. orlada", a "A. redonda", a "A. garrafa", etc., nomes que ainda mudam segundo as localidades, as condições ambientes, formas e qualidades dos fructos.

615.328.1

CONTRIBUIÇÕES Á MATERIA MEDICA VEGETAL DO BRASIL

II. Estudo pharmacognostico de *Struthanthus marginatus* (Desr.) Blume *(Loranthaceae)*. Um novo principio da planta.

POR

WALDEMAR PECKOLT e DOMINGOS YERED

Nomes vulgares: — Herva de passarinho miuda, Ocra.

Nome scientifico: — *Struthanthus marginatus* (DESR.) BLUME.

Familia: — *Loranthaceae.*

Parte usada: — Folha.

Droga: — *Folia struthanthi.*

Phytographia (Fig. 1): — Planta arbustiva ramosa, pequena e parasita, que cresce geralmente sobre as arvores as mais diversas.

Possue ramos delgados, compridos, muito esparsos, ascendentes, reptantes, possuindo numerosas radicellas. Suas folhas são geralmente ovaes e muito semelhantes ás de um cafeeiro; agudas, de côr verde escura na face superior, mais clara na inferior, luzidias, ovaes e lanceoladas.

Inflorescencia axillar, em pequenos racimos, com flores de côr branca.

Fructo, pequena baga, oval arredondada, de succo viscoso e acidulo.

Patria: — Brasil.

Distribuição geographica: — Habita geralmente os Estados de S. Paulo, Rio de Janeiro, Minas Geraes, Goiás e Paraná.

Historico: — Esta planta pertence á interessante familia das *Loranthaceas,* verdadeiros parasitas vegetaes, sempre verdejantes e viventes sobre os ramos de diversas arvores, onde se implantam, emittindo abundantes e fortes raizes, que se unem fortemente aos ramos da arvore parasitada e a cuja custa se nutrem.

A denominação desta familia origina-se do genero *Loranthus* e este, do grego λοῖρὸς — *a correia* e ἄνθος — *a flor*, porque suas flores são geralmente coriaceas e parecem cortadas á semelhança de correias.

As *Loranthaceae* são muito prejudiciaes ás arvores sobre as quaes se implantam, nutrindo-se de sua seiva, e, deste modo, exgottando-as progressivamente.



Fig. 1
Struthanthus marginatus a parasitar uma Canneleira.

Seus fructos fornecem "gutta percha" e uma substancia viscosa e resinosa (visgo) que, passando incolume através da via digestiva dos passaros que os comem, facilita a adherencia das sementes excretadas aos galhos e ramos das arvores, onde geralmente elles pousam e dejectam. Verdadeira e curiosa defesa e artificio da natureza sabia para a subsistencia de uma especie que, sem esta circumstancia, talvez não pudesse manter-se no meio ambiente.

Estas plantas habitam geralmente a região intertropical, sendo raras vezes encontradas nas regiões temperadas e frescas do nosso continente.

Caracterização da droga: — Encontradas no commercio em estado secco, as folhas são partidas em pedaços irregulares. Quando inteiras, são ovaes, de vertice agudo ou sub-cordiforme, raramente agudas, curtamente pecioladas, medindo geralmente de 5 a 8 cm. de comprimento e podendo, porém, attingir até 11 cm. por 3 a 6 cm. de largura; são coriaceas, circumdadas por uma margem cartilaginosa sub-diaphana, plana ou arqueada, brilhante na face superior e um tanto opaca na inferior; sua nervura mediana faz saliencia nesta pagina,

sendo as demais pouco pronunciadas. O peciolo é plano-convexo e mede geralmente de 8 a 15 mm..

ESTRUCTURA MICROSCOPICA (Fig. 2): — "O epiderma, glabro e recoberto por espessa cuticula, é formado de cellulas polygonaes largas e de paredes rectas ou ligeiramente curvas e guarnecidas em ambas as faces por estomas volumosos, envolvidos por duas cellulas symmetricas, dispostos em crescente, sendo os estomas mais confluentes na face inferior. O mesophyllo é homogeneo e formado de cellulas polyedricas, levemente arredondadas, mais regulares proximamente ao epiderma. A nervura mediana é bi-convexa, fazendo saliencia na face inferior.

O systema libero-lenhoso é representado por tres feixes ovaes, constituidos por um cordão lenhoso, recoberto em baixo por um *phloema* molle, bastante desenvolvido e por um arco de pericyclo levemente lenhificado. O parenchyma fundamental, rico em cellulas tannicas, encerra algumas cellulas esclerenchymatosas, munidas de paredes espessas e pontuadas" (*apud* Pharmacopeia brasileira — A. D. da Silva) (Fig. 3).

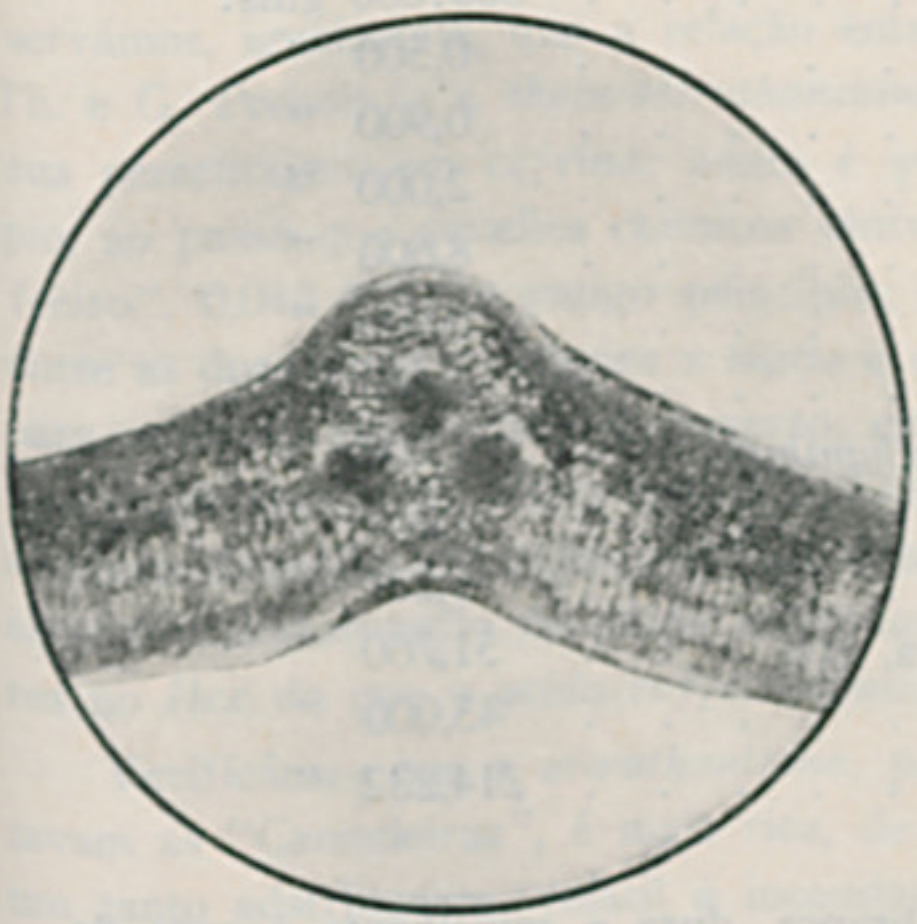


Fig. 2
Corte transverso da folha do Struthanthus marginatus.



Fig. 3
Corte transversal da raiz do Struthanthus marginatus

PHARMACOCHIMICA: — Estas plantas curiosas encerram geralmente principios combinados com os do vegetal parasitado. Differentes analyses o têm provado.

Theodor e Gustavo Peckolt, analysando as folhas de uma planta que vegetou sobre um velho "cafeeiro", encontraram um producto crystallizado, mui semelhante á *cafeina,* mas não possuindo todas as suas propriedades, quer physicas, quer chimicas; essa substancia crystalliza-se em agulhas finissimas, so-

luveis no ether, no alcool e na agua, não o sendo, entretanto, no chloroformio e no benzol. Para differençal-a da *cafeina,* chamaram-n'a *"cafeinstruthanthina";* não encontraram, porém, o *acido coffeatannico,* existente em grandes proporções no *cafeeiro* (*Coffea arabica* L.; *Rubiaceae*), nem tampouco o *acido tannico puro,* frequente em outras *Loranthaceae* que analysaram.

Encontraram, entretanto, *acido gallico,* devido provavelmente a alguma transformação do *acido coffea-tannico.*

As relações obtidas por aquelles chimicos foram de:

"Cafeinstruthanthina" crystalizada. .	0,042 gms. °/°°
Acido gallico	4,460 gms. °/°° nas

analyses procedidas nas folhas do *Struthanthus marginatus* (Herva de passarinho miuda) que parasitava um velho "cafeeiro".

— A analyse, a que procederam em outra planta igual, parasitando um "jambeiro" (*Jambosa malaccensis* D. C.), revelou por mil grammas:

Agua	636.000 gms.
Gomma elastica	0,500 "
Cera vegetal	0,900 "
Chlorophylla	2,000 "
Resina molle	8,600 "
Acido resinoso "a".	3,900 "
Acido resinoso "b".	32,500 "
Principio amargo, amorpho: *estruthanthina* . .	1,700 "
Acido estruthanthino-tannico	1,077 "
Substancia corante vermelha	1,231 "
Substancia album., mat. extractiva, etc. . . .	51,760 "
Saes inorganicos	45,000 "
Cellulose.	214,232 "

A cera vegetal encontrada é de côr branca, dura e semelhante á cera da "carnaúba" - (*Copernicia cerifica* L., *Palmeaceae*); a resina molle é pegajosa, inodora e de sabor particular, soluvel no ether de petroleo, na benzina, no chloroformio, no ether sulfurico e no alcool absoluto fervente.

O *acido resinoso "a"* tem côr amarella, consistencia molle, é inodoro e insipido; completamente volatil na platina incandescente, soluvel no ether de petroleo, no chloroformio, no ether sulfurico, no alcool absoluto e na ammonea.

O *acido resinoso "b"* é de côr pardo escura, pegajoso, sem aroma e de sabor particular; soluvel no chloroformio, no acido acetico concentrado, no alcool e na ammonea. Outro *acido resinoso,* ao qual chamaram *"c"*, que acom-

panha o anterior, em pequena proporção, é de côr castanho escura, pegajoso, sem sabor e aroma; é soluvel no alcool e na ammonea.

O principio amargo *estruthanthina* foi obtido do extracto alcoolico das folhas, tratado pelos meios habituaes.

— Pelo mesmo proceder, obtivemos, no laboratorio da Secção de Botanica Medica do Instituto Butantan, em diversas experimentações e com differentes amostras de *Loranthaceae,* colhidas no "Horto Oswaldo Cruz", actualmente em reorganização como dependencia desse Instituto, quer o principio amargo *estruthanthina,* como o *acido estruthanthino-tannico,* de diversas plantas daquella especie, que parasitavam *Canneleiras* (*Lauraceae*), *Figueiras* (*Moraceae*), *Cesalpinias* (*Leguminosae*), *Mirindibas* e *Pitangueiras* (*Myristicaceae*), *Cedros* (*Meliaceae*), *Angicos* (*Leguminosae*), etc.

— Nas experimentações procedidas com amostras do *Struthanthus marginatus* colhidas em Ilex (*I. paraguayensis* ST. HIL.; *I. theezans MART.; I. pubiflora* REISS; *Ilicineae*), de uma alameda ahi existente, muitas das quaes já fenecidas pelo exgottamento dos parasitos, obtivemos um principio analogo á *"cafein-estruthantina"*, ao qual se poderia chamar de *thein-estruthanthina*. Observámos, igualmente, que a relação entre a *"cafein-estruthanthina"* obtida por Th. e G. Peckolt, e a *thein-estruthanthina* por nós obtida não é proporcional á sua percentagem em *cafeina;* assim é que obtivemos 0,29 °|°° do novo principio, ao passo que aquelles chimicos obtiveram, da planta que parasitava o "cafeeiro", 0,042 °|°° do antigo principio; no entanto, a equivalencia em *cafeina* entre as duas plantas *cafeeiro e matte* é de 2,666 °|°° para o *café* e de 2,510 °|°° para o *matte,* em media. O inverso, entretanto, succedeu com o *acido gallico,* que encontrámos na proporção de 6.320 °|°°, do que se deduz ser verdadeira a asserção daquelles chimicos, para os quaes a presença desse acido derivaria de alguma transformação do acido *matte-tannico,* encontrado em proporções maiores no *Ilex* do que o *acido coffea-tannico* no *Coffea.*

Verificámos que a *estruthanthina,* por nós obtida das amostras que parasitavam as "Canneleiras", é mais rica, de odor agradavel, sabor amargo resinoso um tanto adstringente, volatil á incandescencia, desprendendo aroma especial, e vapores densos, de côr branca, os quaes foram mais espessos, irritantes e de aroma empyreumatico nas amostras colhidas sobre as "Figueiras bravas", ou amarelladas e mais tenues nas amostras que parasitavam "Angicos" e outras *Leguminosae.*

O *acido estruthanthino-tannico,* que obtivemos em maior escala do que a *thein-estruthanthina,* é pulverulento, de côr sepia amarellado e de sabor fortemente acido-adstringente.

É soluvel no alcool e incompletamente na agua destillada. Esse acido foi obtido tratando o extracto alcoolico das folhas pela agua destillada, filtrando-a e tratando o filtrado pelo acetato neutro de chumbo até não apresentar siquer

turvação; recolhido pelo filtro, o precipitado é posto a seccar na estufa e dispersado, resultando um corpo amorpho, de reacção fortemente acida, inodora, de sabor acido-adstringente, cuja sensação na lingua perdura por algum tempo.

Tratado pelo soluto normal de per-chloreto de ferro, cora-se de preto esverdeado.

Com a gelatina, dá abundante precipitado.

—*A estruthanthina crystallizada* foi por nós obtida do seguinte modo: depois da separação do *acido estruthanthino-tannico,* o filtrado resultante foi submettido á passagem de uma corrente de H2S (gas sulfhydrico), até não mais se formar o sulfureto de chumbo. Filtrado o producto assim tratado, foi o filtrado (separado do chumbo) evaporado a B. M. até consistencia xaroposa. Tratado e agitado com ether sulfurico e separado em "frasco extractor", o soluto ethereo foi evaporado espontaneamente; obtivemos, assim, um producto que, secco sobre o chloreto de calcio fundido, crystalliza em agulhas finissimas, de sabor amargo, de aroma fraco e volatil na platina incandescente: é a *thein-estruthanthina.*

Soluvel no ether sulfurico, no alcool de 42° e no de 36° e na agua; insoluvel no chloroformio e no benzol.

Tratada pelo *acido sulfurico concentrado,* cora-se em vermelho tijolo, dissolvendo-se.

Seu soluto aquoso tem reacção neutra.

Com o *reactivo de Meyer,* dá precipitado de côr avermelhada e, com o de *Draggendorff,* precipita em amarello sujo. Com o *acido phospho-molybdico* dá precipitado amarello. Com o *chloreto de ouro* dá abundante precipitado amarello pardo. Com o *bi-chloreto de mercurio* dá ligeira turvação.

— A *estruthanthina,* que obtivemos das amostras que parasitavam as referidas Canneleiras submettidas ás mesmas operações, revelou-se uma substancia amarellada e amorpha, de sabor amargo, de aroma agradavel e volatil na platina incandescente, apresentando-se o liquido, resultante da precipitação pelo gas sulfhydrico, de côr sepia amarellada.

É soluvel nos alcooes, porém incompletamente na agua destillada.

— Dos fructos do *Struthanthus marginatus,* os referidos chimicos obtiveram por °|°°:

Gomma elastica	114,030	gms.
Resina.	1,640	”
Acido resinoso	2,950	”
Saes inorganicos.	16,000	”

No laboratorio da Secção de Botanica Medica do Instituto Butantan, obtivemos, dos fructos maduros daquella planta e nas amostras que parasitavam as

Canneleiras, já citadas, um producto que, lavado em differentes aguas, nos deu uma gomma elastica, que pode satisfactoriamente prestar-se para a confecção da substancia gommosa-elastica com a qual os norte-americanos preparam os seus famosos "chiclets".

PROPRIEDADES E INDICAÇÕES THERAPEUTICAS: — O *Struthanthus marginatus* assemelha-se muito ao "Gui", pela sua acção therapeutica; é um vaso-dilatador peripherico, como o *Viscum album* e energico *vaso-constrictor* interno, podendo *a priori* ser considerado medicamento hypotensor. Abaixa e regulariza a tensão vascular, reforçando a energia do myocardio; é, pois, um cardio-vascular constrictor, energico e de minima toxicidez. Enquanto não se realiza a experimentação cuidadosa de todos os seus principios, o que se fará opportunamente na Secção de Pharmacologia do Instituto Butantan, a "Herva-de-passarinho" poderá ser indicada em cardiopathias arteriaes, hemorrhagias, metrorrhagias, hemorroides, hemoptyses, enterorrhagias e nas dilatações venosas, seguidas ou acompanhadas do augmento da pressão sanguinea.

EMPREGO OFFICINAL: — *Cosimento das folhas frescas; Infuso das folhas seccas em pó; Tinctura alcoolica a* 1:5 (40°C); *Extracto alcoolico das folhas frescas.*

Cosimento, das folhas frescas e contusas: 5 gms. para 150 cc. dagua, ás colheres cada 2 horas.

Infuso das folhas seccas, partidas ou em pó: 15 gms. para 180 cc. dagua fervente, ás colheres cada 1 ou 2 horas (hemorrhagias, metrorrhagias e hemoptyses).

Tinctura das folhas frescas em soluto a 10 ou 15 %, sob a forma de xarope, poção, ou elixir. Nas 24 horas 5 a 15 gms., fraccionadamente.

Extracto alcoolico das folhas frescas na dose de 0,05 a 0,15 em pilulas. Nas 24 horas 2 a 3 gms. fraccionadamente.

CONTRIBUIÇÕES Á MATERIA MEDICA VEGETAL DO BRASIL

III. Estudo pharmacognostico do *Chondrodendron platyphyllum* (ST. HIL.) MIERS *(Menispermaceae)*

POR

WALDEMAR PECKOLT

NOMES VULGARES: — Abutua, A. legitima, A. grande, A. da terra.

SYNONYMIAS VULGARES: — Bútua, Buta, Abuta, Parreira brava, Parreira do matto, Parreira silvestre, Uva do matto, Jaboticaba de cipó, Baga da praia.

SYNONYMIA SCIENTIFICA: — *Chondrodendron tomentosum* RUIZ & PAN., *Cocculus chondrodendron* D. C., *Cocculus platyphylla* ST. HIL., *Botryopsis platyphylla* MIERS, *Cissampelos abuta* VELL., *Abuta platyphylla* MART..

PATRIA: — Brasil.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRAPHICA: — Capital Federal e seus arredores, Estados de S. Paulo, Rio de Janeiro, Espirito Santo, Minas Geraes, Bahia; algumas de suas variedades em Matto Grosso e Amazonas.



Fig. 1

PHYTOGRAPHIA: — É uma das plantas mais communs da familia *Menispermaceae* e a mais empregada na medicina popular, dentre todas as especies de Abutua. Seu caule é reptante, lenhoso, estriado, cylindrico ou levemente deprimido, com o epiderma inferior de côr arroxeada na face inferior ou interna, e de côr verde escura na face superior. Seus ramos são geralmente pendentes ou simples, cobertos de pellos amarellados ou ferruginosos (Fig. 1). Folhas alternas, longo-pecioladas, com

20 a 30 cm. de extensão e forma variavel, geralmente arredondadas, ovaes, elliptícas ou cordiformes; rigidas e estipuladas, lisas na pagina superior e densamente revestidas de cotanilho lanuginoso, de côr branca acinzentada na inferior, mormente no intervallo das nervuras. Inflorescencia monecica, situada na axilla das folhas, apresentando as flores masculinas disposição em racimos alongados, ou espigas de côr amarellada.

O fructo é baga oval, drupacea, lisa, luzidia e de côr arroxeada ou preta, ás vezes avermelhada, disposta em cachos á semelhança de grandes uvas, medindo geralmente 2 a 3 cm. de comprimento e cerca de 2 cm. de diametro. Encerra polpa carnosa e succulenta, de côr vermelha ou carmesim, inodora e de sabor agradavel, doce acidula, um tanto semelhante ao das uvas pretas, encerrando uma semente unica, grande, privada de albume, de sabor particular e amargo.

PHARMACO-ERGASIA OU CULTURA: — Esta planta cresce, espontaneamente, nas mattas sombrias; de preferencia, nos logares sombreados, um tanto humidos.



FIG. 2

Floresce em janeiro e tem fructos maduros de maio a agosto (Estado do Rio); em Minas Geraes, floresce, porém, em abril, fructificando em setembro.

Vive em terreno rico e solo humoso, á sobra dos capoeirões; nestas condições, é passivel de ser cultivada.

PARTE USADA: — Raiz da Abutua.

DROGA: — *Radix abutuae.*

CARACTERIZAÇÃO DA DROGA: — A raiz de Abutua (*Chondrodendron platyphylla*) apresenta-se no commercio em fragmentos irregulares, tortuosos, ra-

mificados, duros, de tamanho variavel (2 a 6 cm. de comprimento e 3 a 8 cm. de largura). Sua superficie externa é constituida por suber de facil desaggregação; côr pardo-escura, quasi preta, com rugas transversaes e sulcos, por vêzes profundos no sentido longitudinal (Fig. 2).

Em corte longitudinal apresenta-se com aspecto grosseiro, fibroso, côr cinzento amarellada, ou ligeiramente esverdeada. Cortada no sentido opposto, transversalmente, apresenta uma serie de zonas irregulares, bastante espessas, encaixadas umas nas outras, em torno de um ponto geralmente excentrico e separadas entre si por uma linha ondeada de côr parda. Estas zonas são formadas de feixes libero-lenhosos, cuneiformes, em numero crescente, do centro para a peripheria, crivados de poros e separados pelos raios medullares. A mais interna dellas é formada de 12 feixes que se prolongam até o centro, onde não existe medulla alguma e são divididos em dois grupos de seis por uma camada de tecido parenchymatoso, mais largo do que os raios medullares, e interrompidos por dois feixes lenhosos primarios. A mais externa é recoberta por uma camada cortical pouco espessa. Esta raiz possue aroma pouco sensivel; porém, quando fresca, é de cheiro penetrante e de sabor pronunciado, mas passageiro (Pharmacopeia dos E. U. do Brasil, R. A. Dias da Silva).

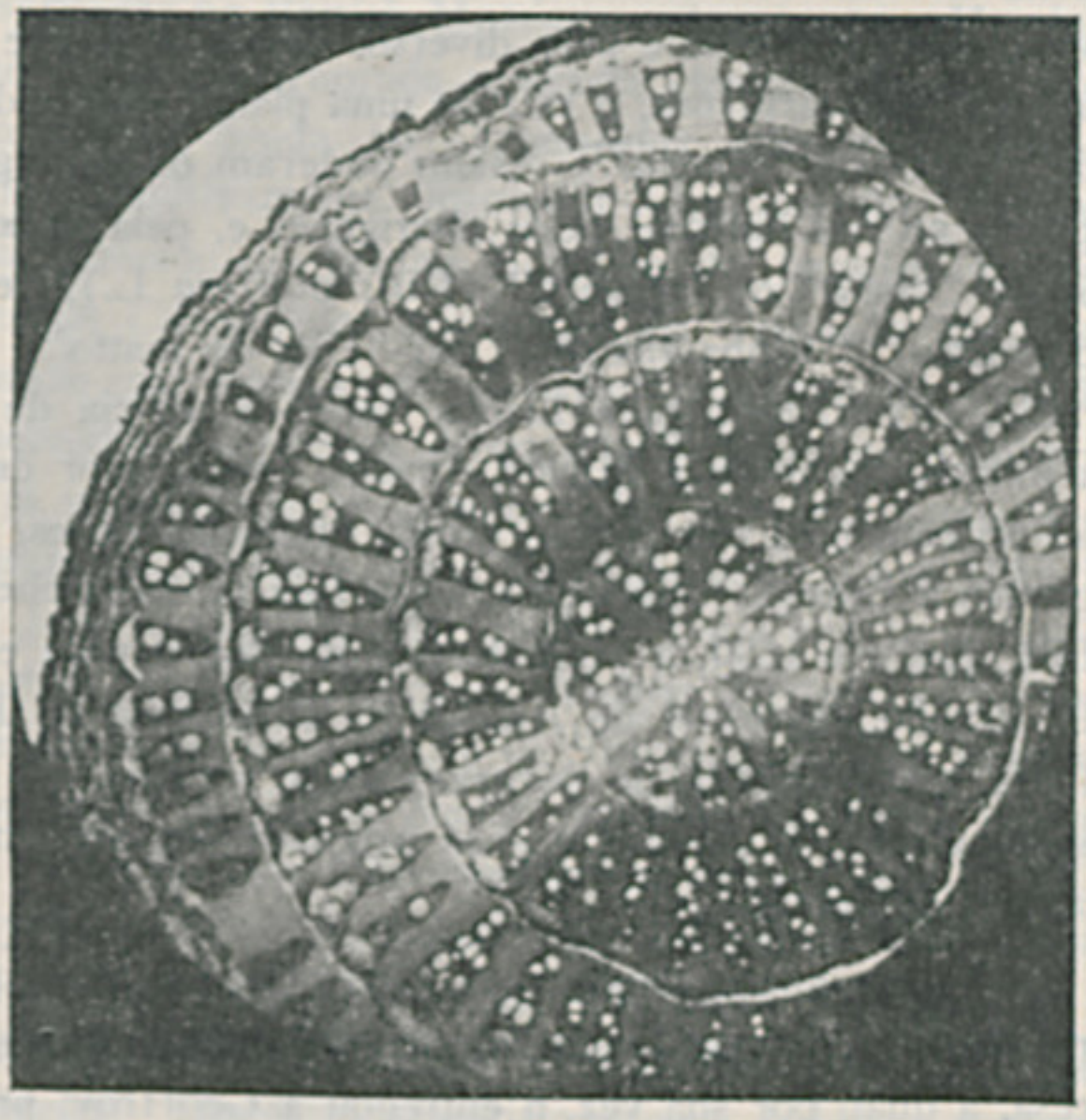


Fig. 3

Estructura microscopica: — "Suber facilmente exfoliavel, de côr pardo-negro; é bastante espesso e formado de cellulas tubulares dispostas em filas radiaes. (Fig. 3).

O parenchyma cortical, pouco desenvolvido, é constituido por cellulas polygonaes alongadas no sentido tangencial e apresenta certo numero de cellulas esclerosas de paredes pouco espessas e pontuadas; é limitado internamente por uma faixa continua de cellulas esclerosas, dispostas sobre quatro a cinco fileiras providas de paredes muito espessas, canaliculadas. Abaixo desta camada esclerosa, nota-se a zona mais externa dos feixes libero-lenhosos, muito numerosos e nitidamente separados entre si por largos raios medullares; estes feixes são cuneiformes, constituidos

por um macisso de fibras de paredes muito espessas e de largos vasos geralmente isolados, recobertos externamente por um liber molle, um pericyclo lenhoso e amarello. Os feixes da mesma zona não têm todos o mesmo comprimento, devido á disposição excentrica do eixo da raiz. Esta disposição reproduz-se em cada uma das zonas concentricas que constituem o cylindro lenhoso; a linha ondeada que os separa uns dos outros é formada de uma camada mais ou menos espessa, de cellulas esclerosas; de estructura semelhante á descripta acima. Estas camadas esclerosas possuem geralmente um contorno externo, bastante regular; em certos pontos, porém, de sua face interna, a esclerose é mais activa; ellas formam então prolongamentos cuneiformes, que se encaixam nos raios medullares que separam os feixes libero-lenhosos." (Pharmacopeia dos E. U. do Brasil, R. A. da Silva).

Historico: — A Abutua (droga) é conhecida na Europa desde os meiados do seculo XVII, quando chegaram ao Brasil os missionarios portugueses, que della tiveram conhecimento através de informações de que os aborigenes usavam constantemente e para diversos males, inclusive os decorrentes do abuso da alimentação carnivora, a raiz de uma planta conhecida pelos nativos com o nome de "buta" ou "abutua". Assim puderam os portugueses surprehender aquella planta no uso habitual pelos aborigenes e, pela semelhança de seus fructos com os da "vinha" ou "videira" (*Vitis vinifera* L.), denominaram-na de "Parreira do matto", "Vinha silvestre" ou "Uva do matto". Com real interesse e admiração, enviaram-na para Lisboa, tendo a noticia de suas propriedades seduzido a muitos, inclusive a Michel Amelot, embaixador de Luis XIV, que presenteou ao rei com uma boa porção dessas afamadas raizes, em 1688, quando de seu regresso á França. Amostras dessa raiz tambem chegaram ás mãos de Tournefort, que, em 1694, a presenteou a R. Pomet para estudos. Posteriormente, Luis R. Rouillé, successor de Amelot na embaixada de Lisboa, levou-a novamente a Paris, acompanhada de pormenorizada noticia; foi esta a primeira "Memoria" sobre a raiz de Abutua e suas propriedades medicinaes, embora fantasiadas ao talante do auctor.

Alguns annos depois, em 1741, De La Mare, official da marinha, obteve no Brasil nova porção da raiz daquella planta, offerecendo-a á Academia francesa, a qual, por sua vez, a entregou a Geoffroy, professor de medicina e pharmacia no Collegio de França, para estudal-a e emittir parecer. Este, experimentando-a, forneceu minucioso e pomposo relatorio, aconselhando-a "nas molestias da bexiga, retenções da urina e suas areias".

Adrien Helvetius, medico das côrtes de Luis XIV e de Luis XV, fez, em 1703, daquella planta uma verdadeira panacéa, empregando-a nos casos indicados por Geoffroy e muitos outros males, para os quaes era o famoso medico consultado; dahi a rapida queda do enorme conceito de que gozava a Abutua, passando em relativo descredito e olvido por alguns annos.

Lochner, de Nuremberg, em 1719 publicou um "Tratado" sobre a pretensa "Parreira brava", referindo-se a uma planta da Africa oriental, desenhada em 1675 por Zanoni, e a qual suppunha produzir a famosa droga, *Radix pareirae,* cuja verdadeira identificação era ainda desconhecida.

Á Inglaterra, em 1728, chegara tambem a influencia de tão discutida droga, tendo Brodie procurado introduzil-a na therapeutica de seu país, reajustando suas reaes propriedades e aconselhando-a apenas nas molestias da bexiga, cystites, lithiase vesical, etc.

Mais se avolumou a confusão em torno da "Parreira brava" quando se attribuiu a um *Cissampelos,* conhecido dos portugueses residentes no Brasil, a producção da discutida droga *Radix pareirae* ou *Radix abutuae;* essa confusão maior ainda se tornou, quando o sabio botanico Linneu, em 1753, creou uma nova especie *Cissampelos pareirae,* para designar a "Parreira brava", erro que perdurou por mais de um seculo!

— Sloane, botanico inglês que recebera de Geoffroy e de Helvetius amostras dessa raiz, ainda conservadas no British Museum, entregou-as a Hambury para identificação, pois até então era ignorada a exacta classificação da verdadeira Abutua ou Parreira brava, ligada ao *Cissampelos pareira* de Linneu. Nesta occasião, procurando definitivamente desvendar essa questão, Hambury procurou obter de Wilson, director do Jardim Botanico da Jamaica, hastes e raizes e alguns exemplares de *Cissampelos* originarios da Trindade, do Brasil e de Ceylão, verificando então que essas amostras differiam muito da verdadeira "Parreira brava", fornecedora da famosa droga *Radix abutuae.* Conhecida a origem do *Cissampelos,* já identificado, restava-lhe saber qual era a planta em apreço, conhecida por Abutua ou Parreira brava legitima, quando em 1859 lhe foram enviadas do Rio de Janeiro, por Theodor Peckolt a seu pedido, amostras completas da verdadeira planta, Parreira brava ou Abutua legitima. Por comparação com os exemplares existentes no herbario de Sloane no British Museum, aquelle sabio chegou á conclusão de que a *Radix pareirae* ou *Radix abutuae* tão discutida e famosa era fornecida pelo *Chondrodendron tomentosum* RUIZ & PAV., ou *Botryopsis platyphylla* MIERS, actualmente *Chondrodendron platyphylla* (ST. HIL.) MIERS; verificou, igualmente, que outra planta, aliás da mesma familia, era tambem conhecida pelo nome de Parreira brava, esta pertencendo ao genero *Cissampelos.* Hambury, identificando-as, publicou então os elementos para a caracterização da verdadeira *Radix abutuae,* pondo assim termo á grande confusão reinante entre esta e especies proximas, além de *Cissampelos pareira* L., com a qual era geralmente confundida, por possuir identica nomenclatura vulgar, recebida dos portugueses, e, ainda mais, por pertencer á mesma familia botanica.

IDENTIFICAÇÃO DA DROGA EM RELAÇÃO A FRAUDES E IMPUREZAS: — A raiz de Abutua legitima é encontrada nas pharmacias e hervanarias do país, em pedaços irregulares, duros, lenhosos, tortuosos, de espessura e dimensões differen-

tes, mas sempre protegidos por uma casca de côr parda, rugosa, com algumas radicellas pretas e estriadas, tendo face interna lenhosa, de côr amarellada ou parda, de fractura fibrosa e grosseira, notando-se, pelo corte transversal, disposição regular e concentrica dos feixes fibro-vasculares em camadas concentricas, o que caracteriza geralmente o genero *Chondrodendron*.

Muitas vezes são encontradas como fraudes, juntamente á droga, raizes de plantas differentes, embora de aspecto e côr identica, mas que, pelo corte transversal, são desvendadas como falsificação da *Radix abutuae*.

Os elementos citados para a caracterização da droga nos dão para ella uma disposição especial das camadas concentricas em numero de 5 a 6, sendo a interna, como já vimos, formada por 12 fileiras que se prolongam até o centro, onde são divididas em 2 grupos de 6, para uma camada de tecido parenchymatoso, mais largo do que os demais raios medullares, fileiras essas interrompidas, para o centro, por 2 feixes lenhosos primarios, compostos de fibras delgadas com paredes espessas.

— Como fraude, encontram-se tambem algumas vezes, junto ás raizes da verdadeira Abutua, hastes da planta, que variam de tamanho e que á primeira vista se confundam com aquellas; mas, si as examinarmos em um corte transversal, veremos apenas 5 a 9 camadas lenhosas e concentricas, possuindo raros grãos de amido, ao passo que, nas raizes da Abutua legitima, cada camada ou zona é separada por uma orla circular de cellulas esclerenchymatosas, de côr amarella, com paredes pontuadas e espessas, notando-se, no meio dessas camadas, numerosos grãos arredondados ou ellipticos, ás vezes truncados, constituidos pelo amido. As hastes da planta, que acompanham como fraude a raiz, constituem impurezas da droga, depreciando sua cotação no mercado.

Parmacochimica: — A Abutua foi, em 1838, analysada na Alemanha pelo prof. Wiggers, que de suas raizes isolou um alcaloide que denominou, impropriamente, de *Cissampelina*, julgando a planta como *Cissampelos pareira* L., confundida ao principio com a verdadeira *Radix abutuae;* mais tarde, porém, foi essa denominação emendada para a de *Pelosina*, que ainda perdura.

Sua determinação atomica $C^{18}H^{21}NO^{5}$ e seu peso atomico 3.741,46 foram estabelecidos pelo chimico Bödiker, que ainda obteve varios saes do alcaloide, taes como o *chlorhydrato, o chromato* e o *sulfato* da *pelosina*.

— Flückiger, estudando a *pelosina* e o processo para obtel-a em estado de pureza, demonstrou que este principio era identico á *buxina*, á *berberina* e á *paricina;* confirmando, assim, a opinião de Walz que, em 1860, já o tinha mencionado, embora obtivesse da raiz da Abutua apenas 0,5 o|oo daquelle alcaloide.

A *pelosina* é um alcaloide amorpho que, pela evaporação do soluto ethereo, se deposita sob a forma de um verniz, o qual, pela addição de agua ao ether e consequente evaporação, se separa em pó amorpho, branco, de sabor amargo, pouco soluvel na agua.

— Seguindo o processo de Wiggers para extracção da *pelosina*, obtivemos no serviço da Secção de Botanica Medica do Instituto Butantan, com material provindo de Ipiabas, Estado do Rio, esse alcaloide pelo seguinte proceder: reduzidas a pó grosso, foram as raizes da Abutua exgottadas pela agua fervente acidulada com acido sulfurico; os liquidos, reunidos e evaporados á terça parte, filtrados e tratados pelo carbonato de sodio em soluto concentrado, até não produzirem precipitado. Separado este, lavado em agua destillada e dissolvido em agua acidulada com acido sulfurico, foi agitado com carvão animal, filtrado e precipitado novamente pelo carbonato de sodio; separado pelo filtro, lavado em agua destillada e secco pela evaporação, foi dissolvido em acido acetico diluido ao terço, precipitado novamente pela sóda; separado, este precipitado foi lavado pela agua destillada e finalmente secco sobre o chloreto de calcio fundido, fornecendo então um pó amorpho, de côr branca, sabor amargo, incompletamente soluvel na agua destillada. Esse pó constitue a *pelosina*.

Pelosina, alcaloide amorpho, é soluvel em 13 partes de ether, cuja dissolução, evaporada espontaneamente, fornece um verniz, que, pela addição d'agua destillada e ether, novamente separado e evaporado, dá um pó amorpho, de côr branca, soluvel em 1.800 partes dagua fervente e 6.600 partes d'agua fria. Soluvel no ether, no sulfureto de carbono, no chloroformio, na acetona e no alcool amylico; muito pouco soluvel no alcool de 42° e no de 96°C, e na benzina.

Seus solutos dão reacção alcalina ao tornasol e alteram-se facilmente em contacto com o ar e o calor. O acido azotico resinifica a *pelosina*.

— Flückiger, William, Th. Peckolt e outros chimicos estudaram e prepararam muitos saes de pelosina, os quaes são precipitados pelos reactivos geraes dos alcaloides; a ella attribuiram as seguintes reacções: "é precipitada de seu soluto chlorhydrico pelo sal ammoniaco e pelo nitro, e pelo iodureto de potassio em soluto muito diluido. Destillada com potassa caustica, fornece *methylamina, dimethylamina* e uma base analoga ao *pyrol.*" (Theodor Peckolt e G. Peckolt, Hist. Pl. Med. Ut. Bras. 1888).

Obtivemos o *chlorhydrato de pelosina,* tratando o alcaloide obtido pelo acido chlorhydrico, em soluto aquoso; o resultado forneceu um precipitado de côr branca, amorpho, que se mostrou completamente soluvel na agua, de sabor amargo, inodoro, constituindo o *chlorhydrato de pelosina.*

Os chimicos Theodor e Gustavo Peckolt, analysando os fructos da Abutua legitima, encontraram:

Um fructo de tamanho regular pesava em media 3,945 gms., dos quaes 2,832 gms. para a polpa e as cascas e 1,113 para as sementes. Em 100 gms. da polpa fresca obtiveram:

Agua 84,583; substancia gordurosa 0,308; materia corante 2,273; glycose 3,430; acido tartarico 0,357; acido malico, pectina, substancias gommosas, etc. 4,331; substancias albuminoides 1,013 e saes inorganicos 1,480. Pela analyse acima, verifica-se que a composição dessa polpa se approxima da da uva (*Vitis*

vinifera) e é passivel de melhorar bastante, ganhando em glycose, pela cultura, ao ponto de se tornar fructo de regalo, como sóe acontecer a muitos outros; é, pois, muito razoavel a sua denominação de Uva do matto ou Parreira brava.

As sementes, igualmente analysadas pelos referidos chimicos, revelaram em 100 gms.: agua 53,004; oleo gorduroso 5,073; *abutuina* ou *pelosina* 0,530; acido botryopsis-tannico 0,914; amido 11,491; substancia amarga e materia extractiva 0,913; materia saccharina 0,814; substancias albuminoides 1,554; substancias gommosas, etc. 3,909; saes inorganicos 1,880. A resina molle é de côr amarella, inodora e sem sabor; o oleo gorduroso é de côr parda, inodoro e de sabor particular.

A *abutuina* ou *pelosina* foi obtida exgottando-se as sementes pelo alcool de 40°C, acidulado com acido acetico, reunidos os liquidos alcoolicos e destillados. O residuo foi exgottado pela agua fervente, e filtrado; o soluto aquoso resultante, precipitado pela soda caustica liquida, e o precipitado, dissolvido no acido acetico diluido, depois novamente precipitado pela soda caustica, separado, lavado, seccado e dissolvido no sulfureto de carbono, que, pela evaporação, forneceu áquelles chimicos a *abutuina* (Theodor e Gustavo Peckolt, Hist. Pl. Med. Ut. Bras. 1888).

Esses fructos fornecem materia corante carmezim mui linda, a qual poderia ser utilizada para coloração de doces, balas e confeitos, como substituta dos corantes syntheticos tão empregados para esse fim e quasi sempre nocivos.

Propriedades e indicações therapeuticas: — Tonico amargo, estomachico, empregado nos embaraços gastricos e na hypopepsia. A Abutua é um amargo isento de adstringencia e de propriedades excitantes; tonifica o estomago sem exercer acção particular sobre o pulso e a circulação; é o succedaneo brasileiro da *Calumba,* aliás da mesma familia.

A *pelosina,* alcaloide da raiz da Abutua legitima, foi em 1857 experimentada na Italia, por Vitali, que affirmou ter obtido grande successo de seu emprego como succedaneo da *quinina,* no tratamento do impaludismo. Mazzolini relatou observações de Tibaldi, Buzzini, Albani e outros, que o experimentaram em dose de 1,20 a 1,50 gms. em 3 ou 6 vezes nas 24 horas, durante a apyrexia, em cerca de 310 casos de febres malaricas, allegando ter alcançado curas rapidas em 235 pacientes ou seja a proporção de 75 % dos casos tratados.

No Brasil, a raiz de Abutua legitima, embora considerada bom tonico amargo, diuretico, emmenagogo e febrifugo, é pouco usada em a nossa materia medica; no entanto, é muito reputada na medicina empirica, entre os naturaes do país. Tem sido usada como *lithotriptico* na lithiase vesical e como *emmenagogo* nas insufficiencias ovaricas; algumas vezes mesmo seus resultados se têm mostrado satisfactorios, como *oxytocico,* por favorecer a expulsão placentaria, após retenções demoradas.

Em doses elevadas produz vomitos e pode intoxicar.

E' prescripto nas diarrhéas, dyspepsias hypochlorhydricas ou hypopepticas, nas colicas gastricas acompanhadas de flatulencia, e nos casos em que a digestão se processa irregularmente, ou, quando a assimilação estiver embaraçada, por ser a Abutua um tonico da funcção digestiva, augmentando ligeira e moderadamente a secreção dos succos gastrico, pancreatico e biliar. Indicada vantajosamente no catarrho gastrico e nas dyspepsias atonicas acompanhadas de inappetencia, que de certo modo beneficia, despertando o appetite, mormente nas dyspepsias dos nervosos e em algumas toxicoses intestinaes.

PHARMACOLOGIA E EMPREGO OFFICINAL: — A Abutua legitima é considerada um amargo puro e como tal usada em *tinctura* a 1:5, *extracto hydro-alcoolico, extracto aquoso* ou *extracto fluido, pó, infuso* e *cozimento*.

A *tinctura das raizes de Abutua legitima,* na dose de 15 a 20 gottas por vez, e 1 a 10 gms. nas 24 horas.

O *extracto alcoolico das raizes de Abutua legitima* na dose de 0,05 a 0,10 cgms. p. vez e 0,20 a 1 gm. nas 24 horas.

O *extracto fluido das raizes de Abutua legitima,* na dose de 0,50 a 2 gms. p. vez e de 2 a 14 gms. nas 24 horas.

O *pó das raizes da Abutua legitima* na dose de 0,50 a 2 gms. p. vez, e de 3 a 4 gms. nas 24 horas.

O *infuso das raizes da Abutua* a 30 °|∞ depois de maceração por 12 horas, na dose de 50 gms. p. vez, e de 200 a 300 gms. nas 24 horas.

O *cozimento das raizes da Abutua* a 50/1500 aos calices, 3 e 4 vezes no dia, como *diuretico* e *lithotriptico*.

SUCCEDANEOS: — A raiz de Abutua pode substituir nas mesmas doses e usos a *Calumba* ou *Colombo*: (*Cocculus palmatus* D. C. ou *Jatrorrhiza palmata* MIERS, *Menispermaceae*) planta exotica originaria da Africa e pertencente, aliás, á mesma familia e como ella considerada entre os "amargos puros não adstringentes", dos quaes fazem parte o *colombo,* a *genciana,* a *quassia* e o *condurango*.

Usos ACCESSORIOS: — Os fructos da Abutua legitima poderiam pela cultura rivalizar com os da Parreira ou Videira (*Vitis vinifera* L.) e constituir artigo de commercio no país, pois se conservam durante muitos meses e, alem de serem aproveitaveis como fructos de regalo, fornecem materia corante carmezim de linda côr, propria para tingir xaropes, doces, balas e liquidos alcoolizados: licores e elixires.

(Trabalhos da Secção de Botanica Medica do Instituto Butantan, apresentados em setembro de 1934. Dados á publicidade em dezembro de 1934.)

SERPENTES VENENOSAS OCCORRENTES EM COSTA RICA

POR

CLODOMIRO PICADO

598.126,

SERPENTES VENENOSAS OCCORRENTES EM COSTA RICA

I. Sobre a especie *Bothrops lansbergii* e formas affins. Seu veneno e microornamentos epidermicos.

POR

CLODOMIRO PICADO

Nosso illustre mestre, dr. Afranio do Amaral, director do Instituto Butantan, em uma revisão publicada alhures (1), logrou felizmente desmembrar o grupo da *B. lansbergii* em 3 especies: *B. lansbergii, B. nasuta* e *B. ophryomegas,* cuja heterogeneidade havia sido recentemente discutida por E. R. Dunn (2).

Durante varios annos só recebémos em Costa Rica individuos que deviam separar-se nitidamente em duas especies. No artigo anterior por nós publicado (3) as microphotographias 6 e 5 correspondiam, respectivamente, á *B. nasuta* e á *B. lansbergii,* esta conhecida por nós havia algum tempo e sobre cuja posição especifica reinava em nosso espirito alguma duvida, embora estivessemos certo de ser ella differente de *B. nasuta,* conforme expusemos em nossa publicação "Serpientes Venenosas de Costa Rica", editada pela Secretaria de Saude Publica de Costa Rica, em 1931.

Foi somente em fins de 1931 que tivemos opportunidade de observar juntas e vivas (Figs. 1-3) as tres especies que A. do Amaral distinguiu entre si no referido grupo. Essas especies acham-se representadas na annexa Estampa, em que se vêem:

1. *B. nasuta,* nascida no laboratorio, com 5 annos de idade, sendo a ultima sobrevivente de uma parição de 18 jovens que se entredevoraram. Esta mordeu em nosso laboratorio a dois empregados que haviam confiado em sua lerdeza, verdadeiramente falsa, porque é uma das poucas serpentes que podem saltar. Manteve-se devorando exemplares de lagartos do genero *Anolis* (2 a 3 por semana) e seu veneno não mostrou differenças resultantes do regime alimentar. Podemo-nos, pois, referir á representante desta especie que apparece na Fig. 1 como a "uma velha conhecida".

2. *B. ophryomegas.* Em um desmonte levado a cabo em "El Coyolar" (vertente do Pacifico), foram mortos, em poucos dias, 180 exemplares. Foram collocados em uma caixa cerca de 12, que recebi ha alguns meses. Separei-os em grupos de 6, guardando cada grupo em pequenas caixas teladas, onde vivem em boa harmonia, amontoando-se uns sobre os outros sem que jamais se molestem, embora se mostrem bastante aggressivos quando retirados da jaula para alimentação forçada por meio de carne de boi. O maior dos exemplares media 72 centimetros e produziu 67 milligrammas de veneno secco, o que representa a quantidade maxima obtida na especie. Parece não haver duvida alguma sobre a homogeneidade de seus representantes, os quaes correspondem ao que havíamos chamado, em publicações anteriores, de *Bothrops lansbergii,* nome que, todavia, segundo a revisão de Amaral, que deve ser acceita, convém ser substituido por *B. ophryomegas* (Fig. 2).

3. *B. lansbergii.* Recebemos, ha algumas semanas, 2 exemplares provenientes de "Chitaría" (vertente do Atlantico), cujo "focinho" voltado para cima recordava a "Tamagá", mas cujo corpo, coberto de escamas pouco finas, assemelha-se ao de uma *Bothrops nummifera.* Estes exemplares correspondem á *B. lansbergii* de Amaral (Fig. 3).

Pelo estudo comparativo dos venenos das tres especies, verificámos, contra toda expectativa, que o veneno de *B. lansbergii* é semelhante ao de *B. ophryomegas* e totalmente differente do de *B. nasuta.* O que se poderia esperar, si se confiasse apenas no "porte" das serpentes, seria a semelhança entre *B. lansbergii* e *B. nasuta.*

O quadro annexo resume os caracteristicos de seus respectivos venenos:

	Bothrops nasuta	*Bothrops ophryomegas*	*Bothrops lansbergii*
Minima mortal para coelho, por via venosa	1 mm. por Kg.	2,5 mm. por Kg.	2,5 mm. por Kg.
Coagulação de sangue normal de coelho	Abrevia a coagulação (0,1cc. a 1‰ por cc. de sangue).	Impede a coagulação em 8 horas. Coagula em 24 (Guardado na geladeira).	Impede a coagulação em 8 horas. Coagula em 24 (Guardado na geladeira).
Agglutinação de hematias de coelho	Ligeira agglutinação	0	0
Hemolyse de hematias de coelho	Ligeira hemolyse em 7 horas	Ligeira hemolyse em 7 horas	Ligeira hemolyse em 7 horas
Hemolyse de hematias humanas	0	0	0
Digestão de gelatina timolada	1 hora	5 1/2 horas.	5 1/2 horas.

De referencia aos microornamentos epidermicos, nota-se na Estampa que, enquanto em *B. nasuta* occorre um desenho comparavel a cellulas finas com paredes delgadas, em *B. ophryomegas* o desenho recorda tecidos vegetaes de cellulas alargadas com paredes grossas, e *B. lansbergii* apresenta cellulas desenhadas regularmente como as de *B. nasuta,* mas cujas paredes são tão grossas como as de *B. ophryomegas* (Figs. 3 A, 3 B, 3 C).

Aproveitamos a opportunidade para agradecer ao dr. Rotter a execução das microphotographias annexas e ao dr. A. do Amaral a gentil versão deste artigo para o português.

RESUMO

O estudo de uma serie de exemplares vivos de serpentes do grupo da *Bothrops lansbergii* confirmou as verificações de A. do Amaral sobre a separação das tres especies *Bothrops lansbergii* (Schlegel), *Bothrops ophryomegas* Bocourt, *Bothrops nasuta* Bocourt.

Na pesquisa de certas de suas propriedades biochimicas, o veneno de *B. lansbergii* revelou-se semelhante ao de *B. ophryomegas,* parecendo estes dois totalmente differentes do de *B. nasuta;* todavia, a observação dos caracteres dos microornamentos epidermicos revelou differenças comparaveis ás assignaladas por A. do Amaral na morphologia geral dessas tres especies.

ABSTRACT

The study of a series of live specimens of serpents of the *Bothrops lansbergii* group confirmed A. do Amaral's revision on the differentiation of the following species: *Bothrops lansbergii* (Schlegel), *Bothrops ophryomegas* Bocourt, *Bothrops nasuta* Bocourt.

On the examination of certain of its biochemical properties the poison of *B. lansbergii* proved to be similar to that of *B. ophryomegas,* both of these venoms being entirely different from that of *B. nasuta;* however, the observation of the characters of the epidermal microornaments of these snakes brought to light differences comparable to those found by A. do Amaral in the general morphology of the three species envolved.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Studies of Neotropical Ophidia XII. On the *Bothrops lansbergii* group — Bull. Antivenin Inst. America III(1) :19-27.1929.
2. *Dunn, E. R.* — Notes on *Bothrops lansbergii* and *B. ophryomegas* — Bull. Antivenin Inst. America II(2) :29-30.1928.
3. *Picado, C.* — Epidermal microornaments of the *Crotalinae* — Bull. Antivenin Inst. America IV(4) :104.1930.

SERPENTES VENENOSAS OCCORRENTES EM COSTA RICA

II. Sobre a especie *Bothrops godmanni*. Seu veneno e microornamentos epidermicos.

POR

CLODOMIRO PICADO

A especie *Bothrops godmanni* (Günther) não fôra até agora assignalada em Costa Rica, mas apenas em certas regiões de Guatemala e de Honduras, a julgar pelas publicações herpetologicas por nós consultadas. Ha alguns annos, vimos recebendo serpentes de quasi todos os districtos costa-ricenses e nunca haviamos visto aquella especie, nem suspeitavamos, mesmo remotamente, de sua existencia no país. Todavia, a partir de 1933, começámos a receber exemplares vivos dessa especie, bem como a ver individuos por ella mordidos, que nos procuravam para tratamento no laboratorio de que somos director.

Assim é que ultimamente tivemos ensejo de observar 4 casos de picada por *Bothrops godmanni,* nos quaes injectámos, com optimo resultado, antivenenos do Instituto Butantan. Nesses individuos picados verificámos pouco intensa reacção local e ausencia de hemorrhagias á distancia, de paralysia e cegueira; todavia, a origem do envenenamento foi confirmada, porque, em um dos casos da mesma symptomatologia, tivemos o feliz e insolito ensejo de examinar a serpente, que fôra morta logo depois de ter produzido o accidente.

Conforme veremos, a pequena gravidade desses casos de picada por *B. godmanni* não é devida á pouca toxicidade do seu veneno, mas sim á quantidade exigua delle secretada.

Dados geraes sobre *B. godmanni*.

Todos os exemplares por nós examinados provinham de districtos altos (de 1700 a 2400 metros sobre o nivel do mar) e distantes cerca de 15 a 30 km. e ao N. E. desta capital, de San José. Alguns delles provinham dos arredores de

uma localidade onde se acha installado nosso sanatorio para tuberculosos, localidade essa bastante visitada ha já alguns annos e em que até agora não se suspeitara da existencia de serpentes venenosas.

O brusco apparecimento de numerosos exemplares desta especie em taes districtos tem coincidido com o augmento, verificado nelles, da especie dendricola do planalto, *Bothrops nigroviridis*. Desta especie quasi todos os exemplares, capturados ultimamente em pontos vizinhos á capital e antes pobres em ophidios solenoglyphos, são jovens, o que parece corresponder a um phenomeno de migração recente e eventual concentração de tal especie nessa zona. No caso dessa especie (*B. nigroviridis*) acreditamos que se possa eliminar a hypothese de ter occorrido uma excessiva multiplicação nesse local, porquanto ella só produz cerca de 5 filhos de cada vez e, portanto, sua multiplicação, sendo lenta, não poderia ter passado despercebida durante varios annos em localidades, como essas, quasi todas cultivadas.

Igualmente podemos pensar que tal phenomeno tenha occorrido em relação á especie *B. godmanni,* de que a Fig. 4 representa um adulto em atitude caracteristica e a Fig. 5 reproduz os microornamentos epidermicos.

Tamanho maximo observado em *B. godmanni*: 660 mm..

Caracteres do veneno de *B. godmanni*.

Quantidade maxima secretada: 23 mgs..

Côr: amarella clara, em estado secco.

Toxicidade: A) *in vivo*. — DML para o coelho = 0,5 mg por kilo. A morte succede a symptomas de asphyxia, convulsões e paralysia das patas posteriores; trepidação dos musculos abdominaes durante 4 minutos. Metade dessa dose não produz taes symptomas.

A acção local é muito energica; dose de 0,1 mg em 1 cc., inoculada por via hypodermica em cobaia, produz, em 1 1/2 hora, grande edema, pouca hemorrhagia e destruição da pelle, conforme se observa tambem com o veneno da cascavel costa-ricense (*C. terrificus durissus*).

B) *in vitro*. — Digestão da gelatina — completa em 1 hora.

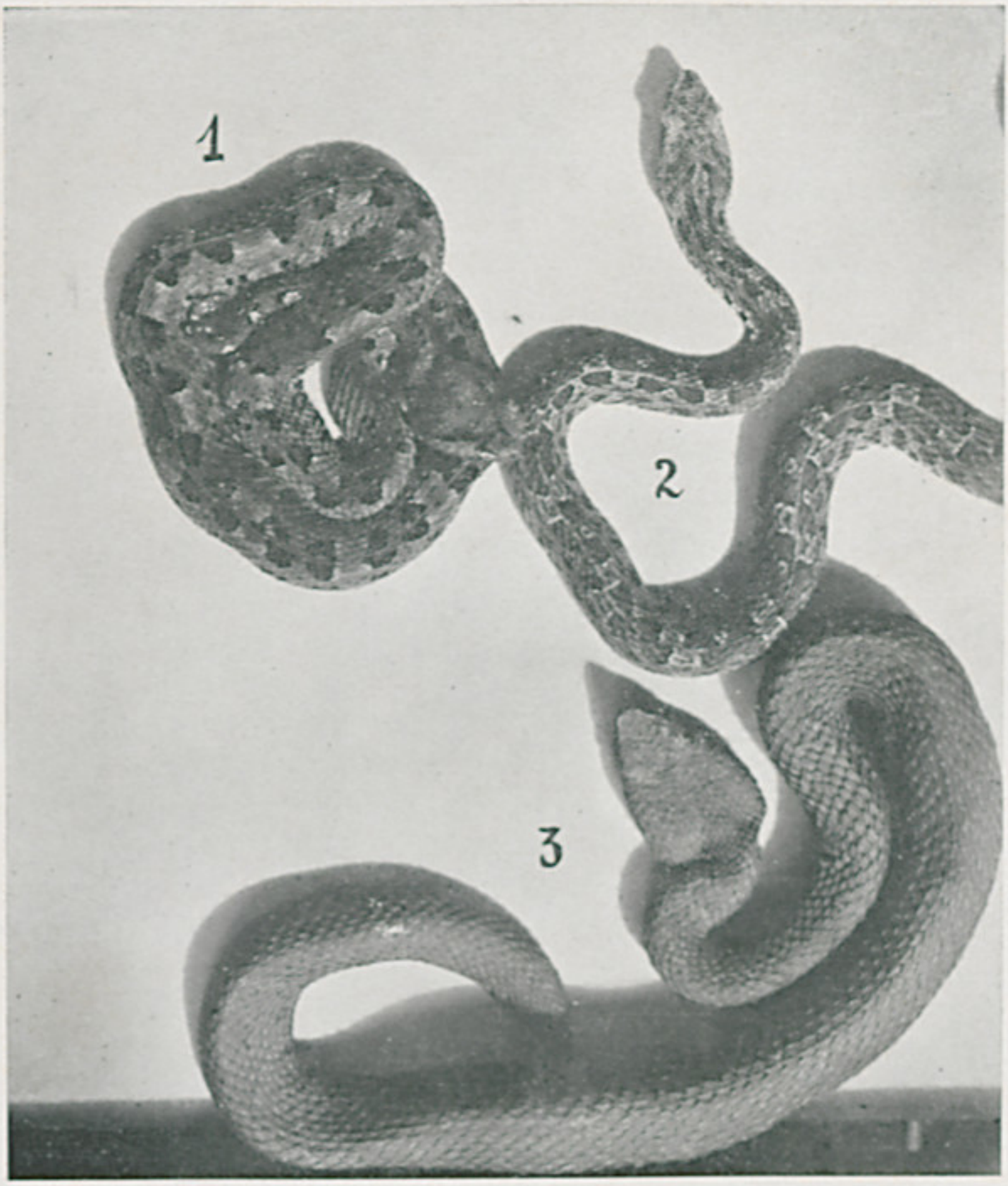
Agglutinação de hematias de homem e de coelho — nitida (mais intensa com as de coelho, conforme se dá com veneno de *Lachesis muta*).

Coagulação do sangue citratado do coelho — até 1:16.000 em 15 minutos; em forte concentração (1:1000), o sangue coagula em 30 segundos.

Lyse de hematias de homem e de coelho — ligeira e em 6 horas (um pouco mais intensa com as de coelho).

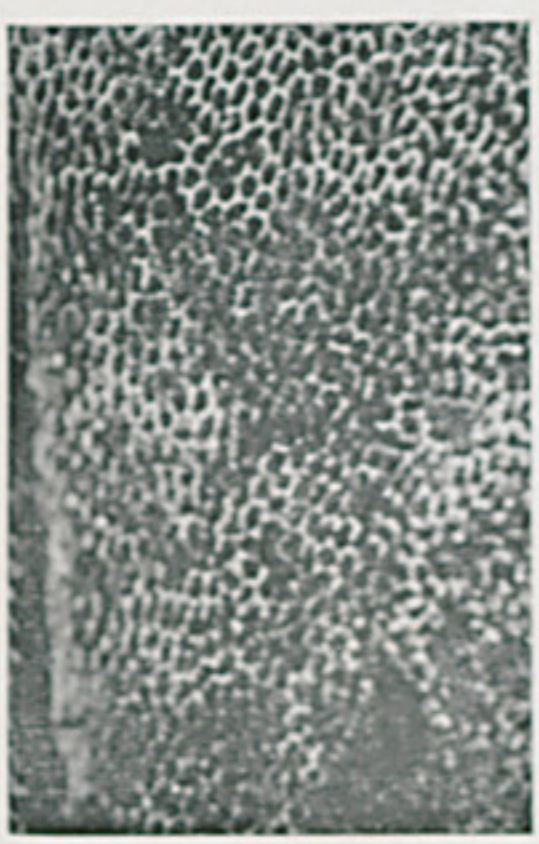
— Servimo-nos deste ensejo para exprimir nossa gratidão: ao dr. Afranio do Amaral, pela verificação da determinação especifica de *B. godmanni,* bem como pela versão deste artigo para o português e sua inclusão nas Memorias do Instituto Butantan; ao dr. W. Rotter, pelo cuidadoso trabalho photomicrographico.

(Trabalhos de collaboração do Laboratorio do Hospital de San José, Costa Rica, recebidos para publicação, respectivamente, em dezembro de 1933 e agosto de 1934 e dados á publicidade em dezembro de 1934).

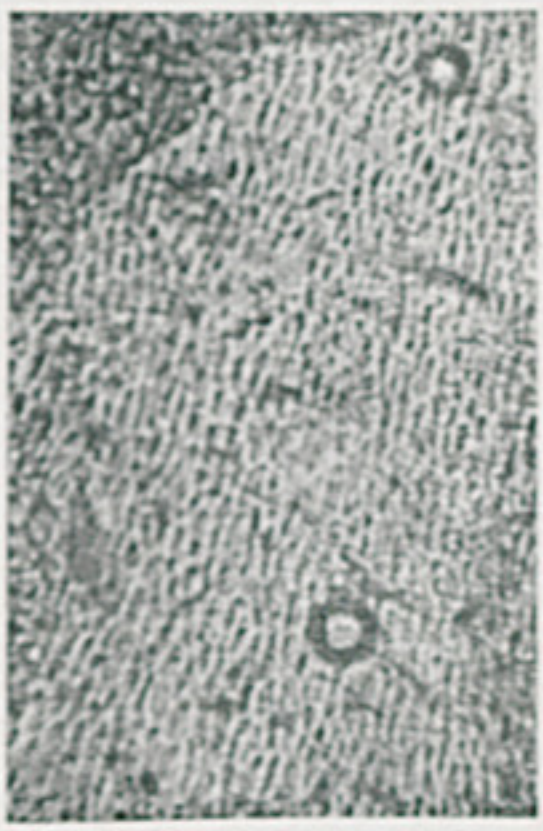


Aspecto geral de:

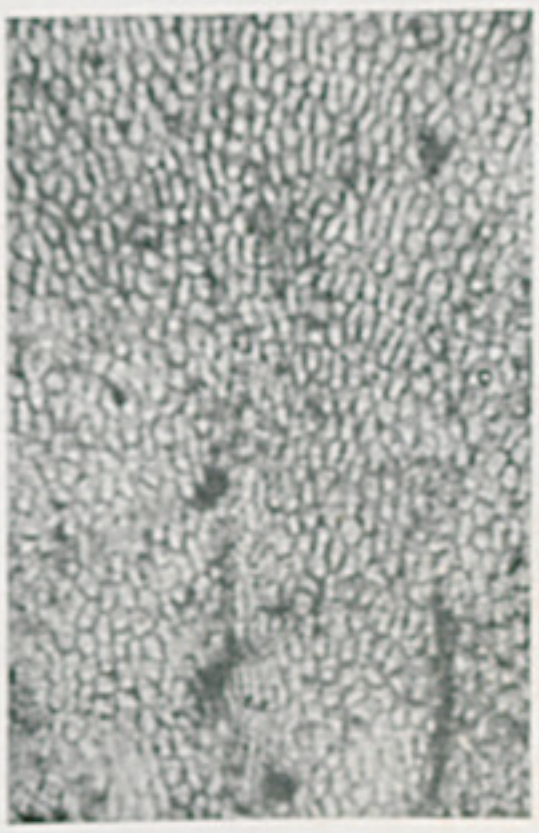
Fig. 1 — **B. nasuta.** Fig. 2 — **B. ophryomegas.** Fig. 3 — **B. lansbergii.**



1 A



2 A



3 A

Microornamentos epidermicos de:

Fig. 1 A — **B. nasuta.** Fig. 2 A — **B. ophryomegas.** Fig. 3 A — **B. lansbergii.**



Fig. 4
Bothrops godmanni, em attitude caracteristica.

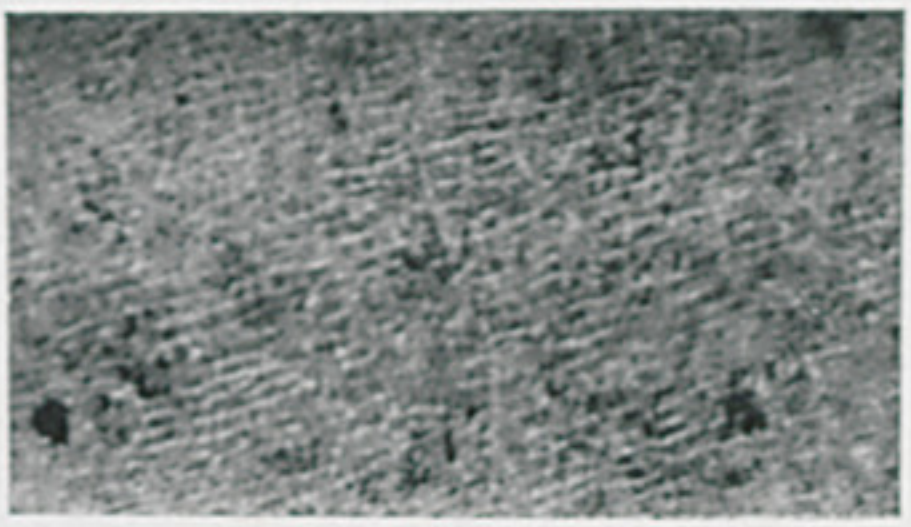


Fig. 5
Microornamentos epidermicos de **B. godmanni.**

TRES ARANHAS NOVAS
NAS COLLECÇÕES DO INSTITUTO BUTANTAN

POR

C. DE MELLO LEITÃO

595.44:981

TRES ARANHAS NOVAS NAS COLLECÇÕES DO INSTITUTO BUTANTAN

POR

C. DE MELLO LEITÃO

Em material que me foi enviado para estudo pelo illustre director do Instituto Butantan, encontrei dois novos generos e tres especies novas, que passo a descrever:

Fam. BARYCHELIDAE

Androthelopsis, g. n.

Olhos anteriores em fila fortemente procurva, os medios bem maiores e mais afastados entre si do que dos lateraes. Olhos posteriores em fila quasi direita, os medios menores, pontudos adiante, subcontiguos aos olhos medios anteriores e dos lateraes posteriores. Olhos lateraes iguaes. Cephalothorace baixo, de fovea thoracica transversa. Comoro ocular cerca de duas vezes mais largo do que longo. Escopulas tarsaes anteriores inteiras; posteriores, divididas por estreita faixa de cerdas. Protarsos I e II com escopulas no terço apicilar; III e IV, sem escopulas. Tibias anteriores do macho sem apophyse apicilar; os protarsos levemente dobrados na base. Tarso dos palpos do macho bilobado; bulbo de inserção basilar, abruptamente afilado na ponta. Sigillas esternaes lineares, quasi obsoletas. Chelicerios com rastello forte, de numerosos espinhos; margens do sulco ungueal inermes. Peça labial trapezoide, muito mais larga do que longa, com uma fila apicilar de pequeninas cuspides. Ancas dos palpos com pequena area cuspulosa. Só duas fiandeiras, de segmento apicilar globuloso, muito menor do que o segmento intermediario. Tuberculo anal conica, muito conspicuo. Todas as patas com espinhos. Unhas denteadas, maiores do que os fasciculos de sustentação.

Este genero, o terceiro genero sul-americano de *Diplothelinae*, é muito affim a *Diplothelopsis* Tullgren, do qual se distingue pela armadura da peça labial, forma da fovea thoracica e forma singular do bulbo do palpo do macho. Typo:

Androthelopsis singularis, sp. n.



Fig. 1
Androthelopsis singularis,
gen. n., sp. n. (♂)



Fig. 2
Androthelopsis singularis,
gen. n., sp. n. (Palpo do ♂)

♂ — 20 mm..

Cephalothorace: 11 × 8,5 mm.. Abdome: 9 × 4,5 mm..

Patas	Femur	Patella	Tibia	Protarso	Tarso	Total em mm.
I	7.5	4.5	5	6.5	4	27.5
II	7.5	4	5	6	4	26.5
III	7	3,5	5	7	4.5	27
IV	9	4	6	9.5	5	33.5

Cephalothorace baixo, cerca de um quarto mais longo do que largo, de fosseta thoracica profunda, transversal, direita. Comoro ocular quasi duas vezes mais largo do que longo. Olhos anteriores em fila fortemente procurva, os medios bem maiores, separados um do outro cerca de um diametro e subcontiguos aos lateraes. Olhos posteriores em fila quasi direita, os medios muito menores, pontudos adiante, subcontiguos aos lateraes e aos medios anteriores, na ponta quasi tangenciando a borda externa destes ultimos. Olhos lateraes anteriores e posteriores iguaes. Chelicerios com forte rastello negro, de numerosos espinhos.

settiformes fortes. Margens do sulco ungueal inermes. Peça labial trapezoide, duas vezes mais larga do que longa, com uma fila apicilar de cinco cuspides; ancas dos palpos com algumas cuspides angulares. Todas as patas com robustos espinhos: tibias I e II com um verticillo apicilar; protarsos I com 1-1 inferiores, robustos, em pequenos tuberculos na metade basilar, 1-1 lateraes e 1 dorsal, e levemente anguloso na base. Escopulas dos tarsos I e II inteiras; dos tarsos III e IV divididas por estreita faixa de cerdas; protarsos I e II com escopulas na metade apicilar; III e IV sem escopulas. Unhas denteadas, tão longas como os fasciculos de sustentação. Segmento basilar das fiandeiras vez e meia mais longo do que o segundo, e este 3 vezes maior do que o apicilar, que é subglobuloso.

Tarso dos palpos bilobado, o bulbo de inserção basilar, piriforme, com estylete pontudo, apicilar, na porção abruptamente estreitada.

Colorido geral negro, os tegumentos revestidos de pelos cervinos, sendo as escopulas tarsaes pardo-acinzentadas.

Habitat: Villa Bomfim, S. Paulo, Brasil.

Typo: N.º 15, na collecção do Instituto Butantan.

Psalistopoides, g. n.

Cephalothorace pouco mais longo do que largo, de fos eta thoracica procurva. Comoro ocular quasi circular, pouco mais largo do que longo, muito alto. Olhos anteriores iguaes, em fila fortemente procurva, os medios um pouco mais afastados entre si do que dos lateraes. Olhos posteriores em fila fortemente recurva, os medios muito menores do que os lateraes e contiguos a estes. Olhos lateraes iguaes. Peça labial bem mais larga do que longa, com uma fila de cuspides apicilares. Sigillas esternaes conspicuas, as posteriores ellipticas e separadas da margem mais de um diametro, as outras marginaes. Chelicerios com rastello fraco, de espinhos settiformes pouco abundantes. Escopulas dos tarsos anteriores inteiras, as posteriores divididas por larga faixa de cerdas. Quatro fiandeiras; as superiores robustas, de segmento apicilar pouco menor do que o intermedio. Tibias anteriores do macho sem apophyse apicilar. Typo:

Psalistopoides fulvimanus, sp. n.



Fig. 3
Psalistopoides fulvimanus,
gen. n., sp. n. (♂)



Fig. 4
Psalistopoides fulvimanus,
gen. n., sp. n. (Palpo do ♂)

♂ — 24 mm..
Cephalothorace: 12 × 10 mm.. Abdome: 12 × 6 mm..

Patas	Femur	Patella	Tibia	Protarso	Tarso	Total em mm.
I	9	5	8.5	8,5	6	37
II	9	4,5	8	8.5	6	36
III	8	4	6,5	9	6	33,5
IV	11	5	10	12	7	45

Cephalothorace baixo, um sexto mais longo do que largo, de fosseta thoracica pouco procurva. Comoro ocular alto, pouco mais largo do que longo. Olhos anteriores iguaes, em fila fortemente procurva, os medios separados entre si mais de meio diametro e a menos de meio diametro dos lateraes. Olhos posteriores em linha fortemente recurva, os medios tres vezes menores do que os lateraes, aos quaes são contiguos e separados entre si mais de quatro diametros.

Os outros seis olhos iguaes. Sigillas esternaes conspicuas, as posteriores ellipticas, pouco mais afastadas entre si do que da margem, as outras sub-marginaes. Peça labial quasi duas vezes mais larga do que longa, com uma fila apicilar de quatro cuspides. Ancas dos palpos com poucas cuspides. Rastello dos chelicerios fraco. Patas I e II de femures e patellas inermes; tibias com *2-2-2* espinhos inferiores, um verticillo de espinhos apicilares, 1-1 anteriores e 3-3 dorsaes; protarsos com *2-2-2-2* espinhos inferiores, 1-1 de cada lado. Tibias e protarsos III e IV com espinhos robustos, verticillados. Tibia dos palpos com 2-5 espinhos apicilares. Segmento apicilar das fiandeiras superiores conico, igual a dois terços do segmento intermedio.

Colorido geral fulvo-escuro, e cephalothorace de margens lateraes mais claras; patas sombreadas de negro na face inferior; esterno e ancas côr de mogno; ventre e fiandeiras côr de mogno claro; palpos fulvo-escuros, com as tibias e tarsos bem mais claros, avermelhados; abdome fusco ou fulvo-escuro, irregularmente pontilhado de claro, de manchas ás vezes indecisas.

Habitat: Alto da Serra, S. Paulo, Brasil.

Typo: N.º 18, na collecção do Instituto Butantan.

O genero *Psalistopoides* é affim a *Psalistops* Sim. e *Leptopelma* Sim.. Distingue-se de *Leptopelma,* por ter o comoro ocular mais estreito, os olhos

Fam. LYCOSIDAE

Porrima callipoda, sp. n.



Fig. 5
Porrima callipoda,
sp. n. (♀)



Fig. 6
Porrima callipoda, sp. n.
(Epigyno da ♀)

lateraes iguaes, a peça labial com uma fila regular de cuspides e o segmento apicilar das fiandeiras menor do que o segundo. Distingue-se de *Psalistops*, por ter os olhos lateraes iguaes e a escopulas tarsaes anteriores integras. De ambos differe pela ausencia de apophyse apicilar nas tibias anteriores do macho.

♀ — 17 mm..

Abdome: 8 × 4 mm..

Patas	Femur	Patella	Tibia	Protarso	Tarso	Total em mm.
I	8	2	6	5,5	3,5	25
II	8	3	5,5	6	3.	25,5
III	6.5	2,5	4,5	5,5	3	22
IV	8	3	7	9	3.5	30.5

Cephalothorace pouco elevado, bem mais longo do que largo, lados da região thoracica arredondados, a região cephalica rectangular. Olhos anteriores em fila procurva, os medios duas vezes menores, contiguos, separados dos lateraes mais de um diametro. Olhos posteriores formando um trapezio mais largo do que alto, de base posterior, e obliquo. Area dos olhos medios mais larga do que alta, os olhos posteriores tres vezes o tamanho dos anteriores. Clypeu mais baixo do que os olhos lateraes anteriores. Sulco thoracico longo e profundo. Margem inferior do sulco ungueal dos chelicerios com quatro dentes fortes, iguaes, equidistantes. Pernas I e II com os femures com tres filas dorsaes de espinhos fracos; patellas com um espinho apicilar; tibias com *2-2-2* espinhos inferiores, os ultimos menores, e com um tufo de pelos na metade apicilar inferior; protarsos com tres verticillos de espinhos e densa escopula na metade apicilar; tarsos densamente escopulados. Pernas III e IV com espinhos mais robustos, só os tarsos com escopulas. Abdome estreito, pontudo atrás. Peça labial mais longa do que larga, ultrapassando o meio das laminas, dilatada e chanfrada adiante; laminas dilatadas adiante, excavadas externamente. Esterno quasi circular, com abundantes cerdas. Fiandeiras posteriores mais longas e mais delgadas do que as anteriores, de segmento apicilar oval.

Tegumentos do cephalothorace côr de mogno, a região ocular fulvo-negra, revestidos de pelos plumosos brancos marginaes, e com uma linha mediana clara que se bifurca atrás do sulco thoracico, dirigindo-se para diante em estreito V, em cujo intervallo ha outra estreita linha mediana, que não chega ao sulco e vai até quasi os olhos posteriores. Chelicerios fulvo-escuros, ennegrecendo para o apice. Esterno amarello com um triangulo fulvo; ancas amarellas; peça labial e laminas pardo-amarelladas. Abdome pardo-claro uniforme; o ventre pardo. Patas I e II do mesmo colorido do cephalothorace, mas os femures com uma faixa negra anterior, as tibias com largo anel negro no terço apicilar; protarsos com os dois terços apicilares negros; os tarsos de face dorsal fulva e escopulas

negras, sendo o pincel apicilar das tibias igualmente negro. Pernas III e IV com estreito anel fusco no apice das tibias; o terço apicilar dos protarsos e os tarsos fuscos.

Epigyno simples, com duas fossetas.

Habitat: Ribeirão Claro, Matto-Grosso, Brasil.

Typo: N.° 5, na collecção do Instituto Butantan.

Distingue-se facilmente esta bella especie das outras do genero, pelo colorido mais claro e pelo desenho muito caracteristico das patas.

ABSTRACT

Two new genera and three new species of spiders are described as based on material existing in the Instituto Butantan collection. These new forms are: *Androthelopsis singularis*, g. n., sp. n., *Psalistopoides fulvimanus*, g. n., sp. n. (fam. *Barychelidae*) and *Porrima callipoda*, sp. n. (fam. *Lycosidae*).

(Trabalho de collaboração do Museu Nacional, Rio, recebido para publicação em janeiro de 1934. Dado á publicidade em dezembro de 1934.)

595.4

NOVAS *GONYLEPTIDAE* NAS COLLECÇÕES DO INSTITUTO BUTANTAN

POR

C. DE MELLO LEITÃO

Estudando as collecções arachnologicas do Instituto Butantan, nellas encontrei as seguintes formas novas, pertencentes á familia *Gonyleptidae* e que passo a descrever:

Subfam. PACHYLINAE

Genero **Afranius**, g. n.

Comoro ocular com um tuberculo mediano. Areas I a V do escudo dorsal inermes; areas I e IV divididas por um sulco mediano. Tergito livre I inerme; II e III com um tuberculo mediano. Operculo anal inerme. Femur dos palpos com um espinho apicilar interno. Todos os tarsos de mais de seis segmentos.

No grupo dos *Pachylinae* de escudo dorsal inerme, approxima-se o presente genero dos que possuem um tuberculo ou espinho nos tergitos II e III (*Pseudogyndes* M. L., *Nesoprachylus* Chamb., *Ampycella* e *Sibollus* Rwr.), distinguindo-se dos tres ultimos, por ter um tuberculo mediano no comoro ocular, em vez de dois tuberculos (*Ampycella* Rwr.) ou espinhos (*Nesopachylus* Chamb. e *Sibollus* Rwr.). De todos se separa por ter mais de 6 segmentos nos tarsos I (5 em *Pseudogyndes* M. L. e *Nesopachylus* Chamb. e 6 nos outros dois generos de Roewer) e o femur dos palpos armado de um espinho apicilar interno. Especie unica:

Afranius amarali, sp. n.

(Fig. 1)

Macho — 8,5 mm.. Largura nas ancas IV — 11,5 mm.. Patas: 17-42-28-53 mm.. Femures: 5-12,5-9-17,5 mm..

Femea — 8 mm.. Largura nas ancas IV — 9,2 mm.. Patas: 12,7-30,2-21,5-37,5 mm.. Femures: 3,2-9-6,5-13 mm..

Borda anterior granulosa. Cepralothorace com granulações esparsas. Comoro ocular com um tuberculo mediano, maior na femea. Areas I a IV inermes, com poucas granulações irregularmente esparsas; areas I e IV divididas por um sulco longitudinal mediano. Areas lateraes, area V e tergitos livres com uma fila de granulos, os tergitos II e III com um tuberculo mediano. Operculo anal granuloso. Esternitos livres, area estigmatica e ancas IV lisos; ancas III e I com uma fila de granulações settiferas. Palpos: trochanter com um espinho apicilar inferior; femur com um espinho basilar inferior e um espinho maior, apicilar interno; patella inerme; tibia com 4 espinhos internos e tres externos e tarsos com tres de cada lado. Femures da femea direitos. Tarsos de 7-13-10-11 segmentos.

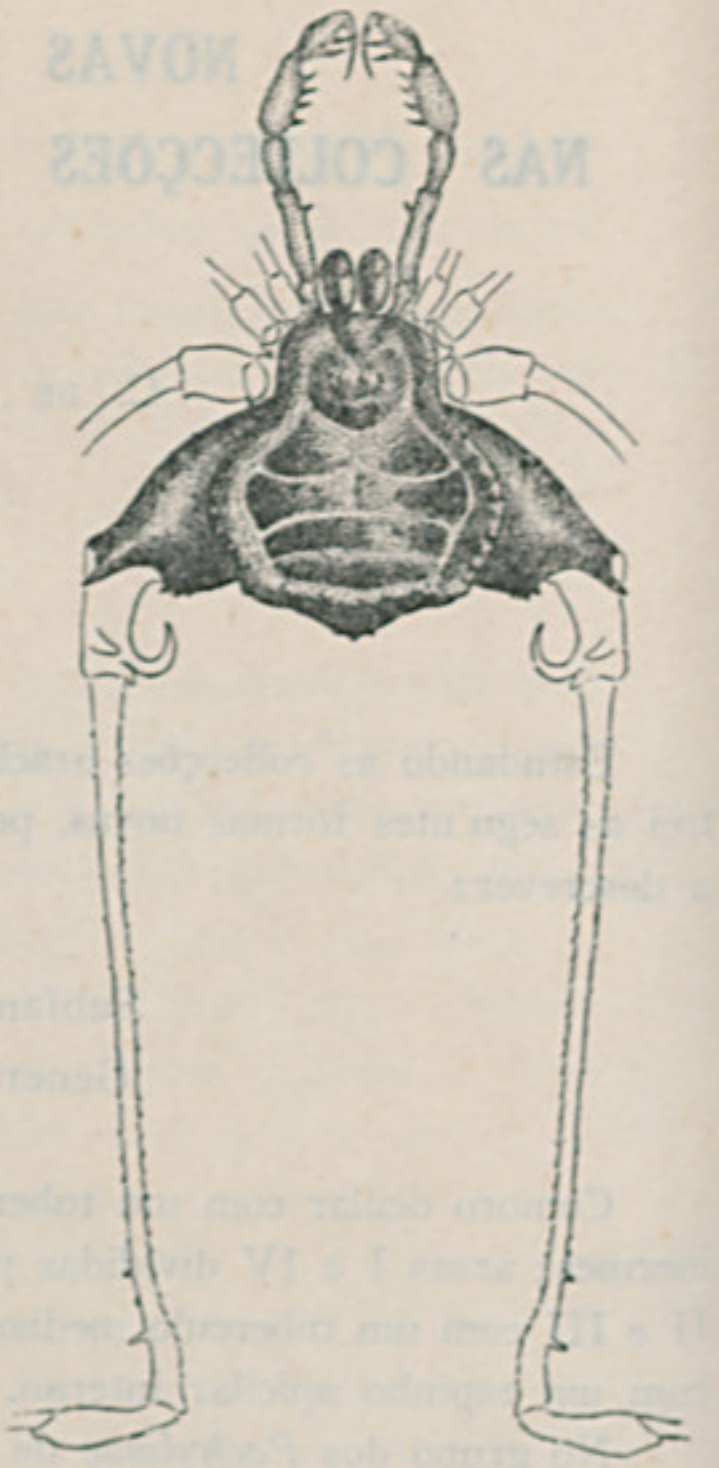


Fig. 1 — Afranius amarali, g. n., sp. n. (♂)

Patas posteriores do macho: anca muito saliente, com algumas granulações (sendo as da face posterior bem maiores e pontudas) e com uma apophyse apicilar externa curta e recurva; trochanter mais longo do que largo, com dois espinhos dorsaes (o apicilar bem maior do que o basilar), um espinho apicilar interno e robustissima apophyse apicilar interna, recurva para dentro; femur granuloso, levemente sinuoso no apice, onde ha alguns dentes um pouco maiores.

Colorido geral castanho-queimado uniforme, de palpos e patas I a III amarellos.

Habitat: Japyra, Paraná, Brasil.

Colleccionador: Estanislau Petruski.

Typo: No. 6 na colleção do Instituto Butantan.

Nota: Dedicados o genero e a especie ao dr. Afranio do Amaral, director do Instituto Butantan.

Genero **Japyra**, g. n.

Comoro ocular com um espinho mediano. Areas I, II, IV e V do escudo dorsal, tergitos livres I e II e operculo anal, inermes. Area III do escudo dorsal com dois espinhos medianos e tergito livre III com um espinho. Femur dos palpos inerme. Tarsos I, III e IV de seis segmentos, II de mais de seis.

Genero muito proximo de *Meteusarcoides* e *Itaoca* M. L., distinguindo-se

do primeiro, por ter dois espinhos, em vez de tuberculos na area III, e de *Itaoca,* por ter um só espinho mediano (em vez de dois) no comoro ocular, e de ambos, por ter o femur dos palpos inerme. Typo:

Japyra regularis, sp. n.
(Fig. 2)

Macho — 6 mm..

Patas: 12,5-20-12,5-17 mm.. Femures: 4-6-4-5 mm..

Borda anterior lisa, sinuosa. Comoro ocular granuloso, com um espinho mediano. Cephalothorace liso, com dois granulos atrás do comoro ocular. Area I do escudo dorsal com dois granulos de cada lado do sulco mediano; area II com uma fila de pequenos granulos e mais dois medianos; area III com uma fila de pequenos granulos e dois espinhos curvos para trás. Areas lateraes com duas filas de granulos. Araeas IV e V, tergitos e esternitos livres com uma fila de granulações, o tergito III com um espinho mediano. Operculo anal granuloso. Ancas IV e area estigmatica muito granulosas; ancas I a III com uma fila de granulações.

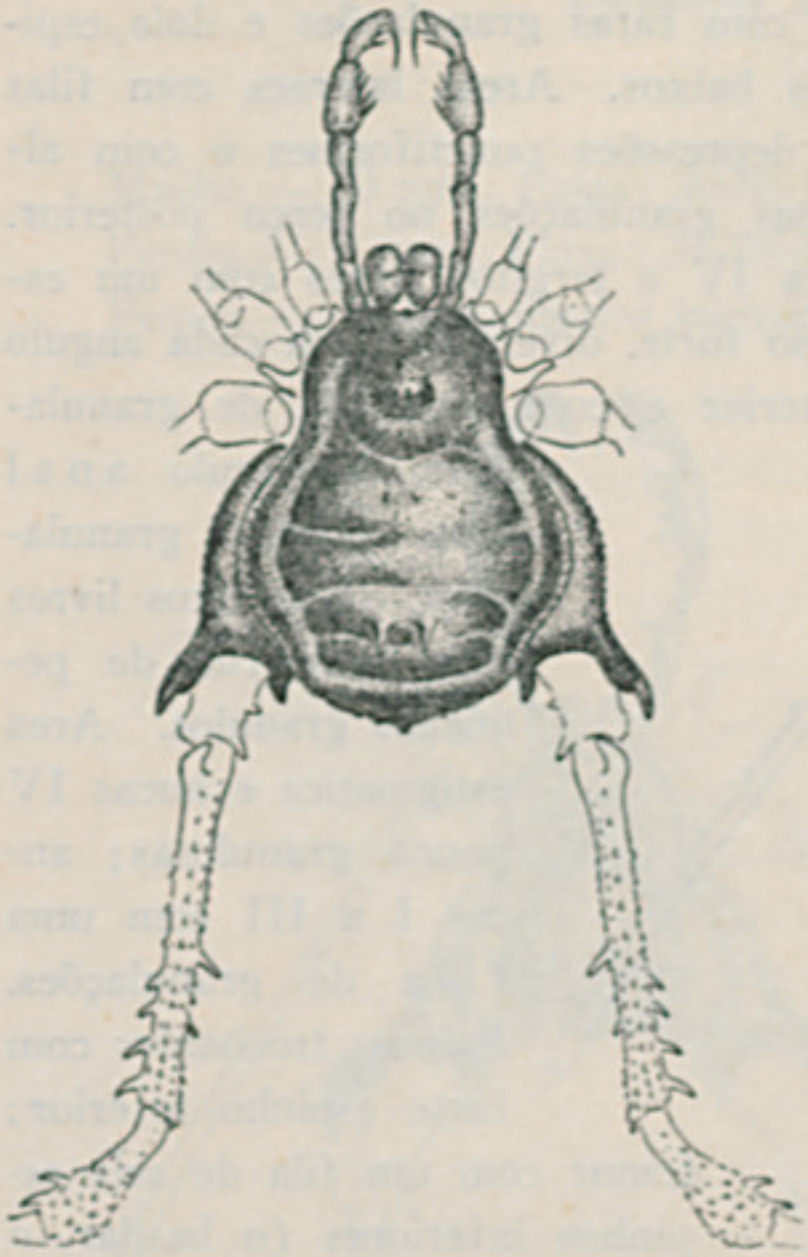


Fig. 2 — Japyra regularis, g. n., sp. n. (♂)

Palpos: trochanter com duas granulações inferiores; femur com uma fila inferior de granulações; patella inerme e lisa; tibia e tarso com tres espinhos de cada lado. Tarsos I, III e IV de seis segmentos; II de nove. Todos os femures direitos.

Patas IV do macho: anca granulosa, com robusta apophyse apicilar externa, muito obliqua e de ramo inferior, e com outra apophyse, apicilar interna; trochanter pouco mais longo do que largo, com dois espinhos internos; femur robusto, com um espinho basilar dorsal, robusto, recurvo, e com uma fila de espinhos menores, de cada lado, no terço apicilar; patella granulosa, com tres espinhos apicilares; tibia granulosa.

Colorido geral amarello-queimado, de cephalo-thorace mais escuro; espinhos da area III e apophyses das ancas posteriores, negros; apophyses dos femures e patellas posteriores castanho-negros.

Habitat: Japyra, Paraná, Brasil.

Colleccionador: Estanislau Petruski.

Typo: No. 7 na collecção do Instituto Butantan.

Subfam. **GONYLEPTINAE**

Genero **Leitaoius** ROEWER, 1930

Leitaoius ornatus, sp. n.

(Fig. 3)

Macho — 9 mm..

Patas: 40-95-63-83 mm.. Femures: 11-30-19-25 mm.

Borda anterior inerme e lisa. Comoro ocular liso, com dois altos tuberculos bem separados. Cephalo-thorace com algumas granulações esparsas. Areas I e II inermes, com alguns granulos; porções da area I muito separadas pelo prolongamento anterior da area II. Area III com raras granulações e dois espinhos baixos. Areas lateraes com filas de depressões punctiformes e com algumas granulações no terço posterior. Area IV e tergitos livres com um espinho forte, divergente, em cada angulo posterior e com uma fila de granulações. Operculo anal com poucas granulações. Esternitos livres com uma fila de pequenos granulos. Area estigmatica e ancas IV pouco granulosas; ancas I a III com uma fila de granulações. Palpos: trochanter com forte espinho inferior; femur com um fila de seis espinhos inferiores (o basilar, o terceiro e o quarto maiores!) e com robusto espinho apicilar interno; patella com pequeno tuberculo inferior; tibia com 4 robustos espinhos internos e 5 externos; tarso com 3 internos e 4 externos. Todos os femures direitos. Tarsos com 11-20-12-14 segmntos.

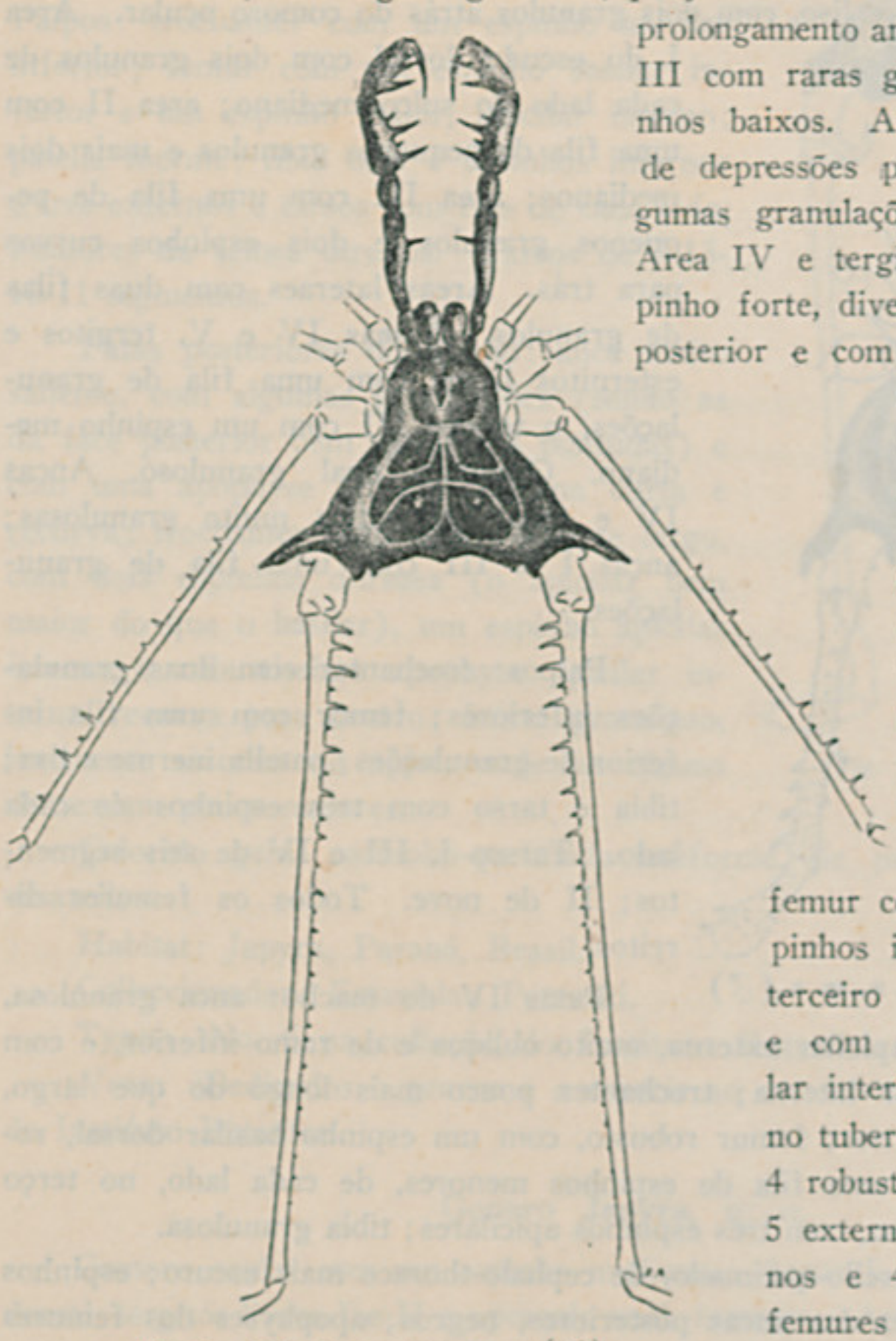


Fig. 3 — Leitaoius ornatus, sp. n. (♂)

Patas IV do macho: anca pouco granulosa, com pequena apophyse apicilar externa; trochanter pouco mais longo do que largo, granuloso, com pequena apo-

physe apicilar dorsal; femur com duas filas de dentes ponteagudos na metade basilar. Femur III com uma fila de dentes semelhantes nos dois terços apicilares.

Dorso castanho-olivaceo, lavado de fusco, com os sulcos esbranquiçados e um Y branco ou amarello no cephalo-thorace, extendendo-se dos tuberculos do como ocular ao sulco 0; patas olivaceas, de patellas mais escuras; femures IV com a metade basilar negra.

Habitat: S. Paulo (?).

Typo: No. 8 na collecção do Instituto Butantan, sem procedencia.

Leitaoius guttulatus, sp. n.

(Fig. 4)

Macho — 10 mm.. Patas: 39-81-56-72,5 mm.. Femures: 11,5-23-18-21,5 mm..
Femea — 9 mm.. Patas: 35-74-50-70 mm.. Femures: 10-21-16-20 mm..

Femea — Borda anterior inerme e lisa. Comoro ocular liso, com dois tuberculos muito pequenos. Cephalo-thorace com duas grossas granulações atrás do comoro ocular. Areas I a IV com algumas granulações esparsas; na area III dois espinhos erectos. Areas lateraes com uma fila media de granulações. Area IV e tergitos livres com uma fila de poucos granulos e um espinho nos angulos posteriores. Esternitos livres com uma fila de granulações menores. Area estigmatica e ancas IV com raras granulações settiferas; ancas I a III com uma fila de granulos. Palpos: trochanter com dois fracos espinhos; femur com uma fila de

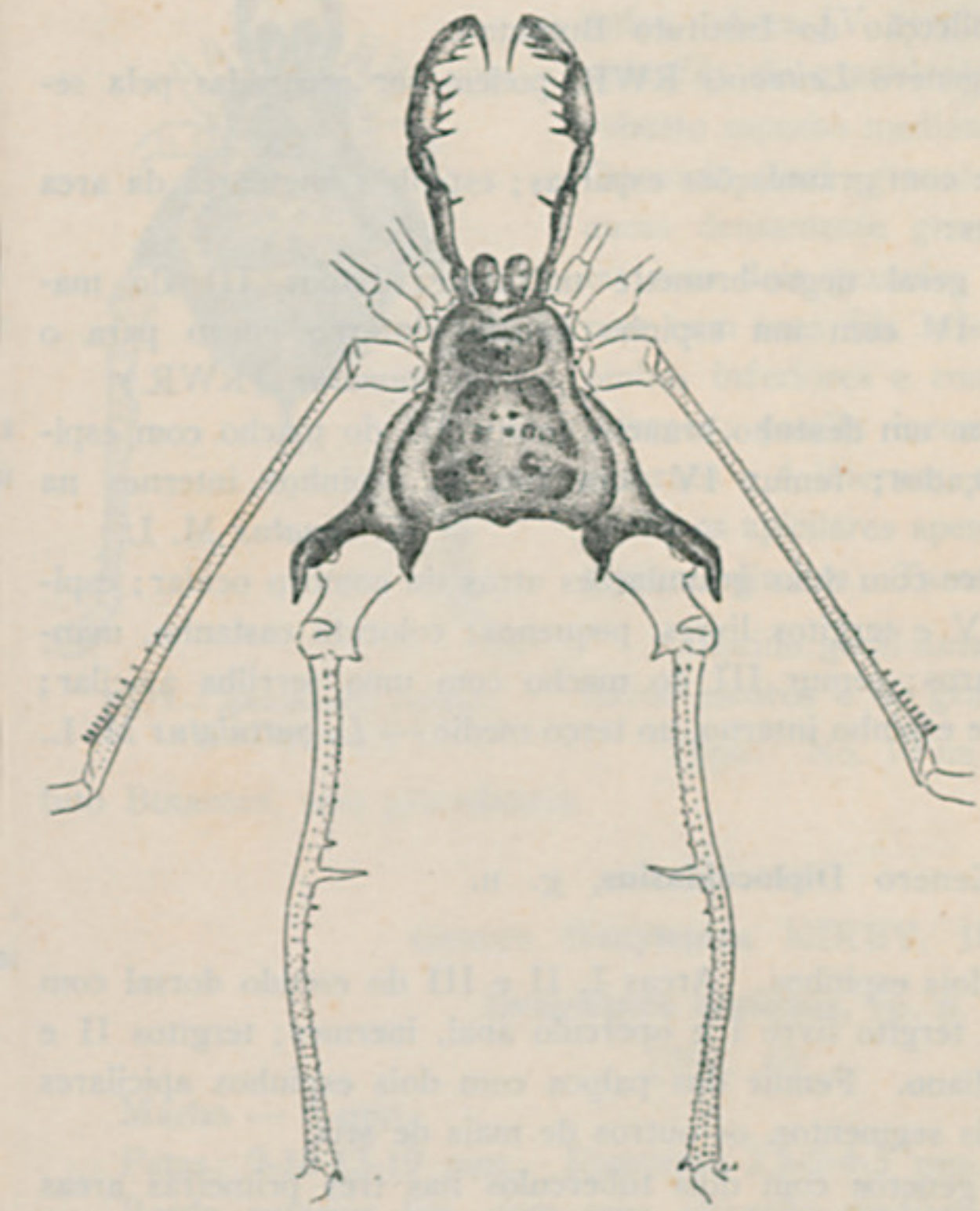


Fig. 4 — Leitaoius guttulatus, sp. n. (♂)

espinhos inferiores e robusto espinho apicilar interno; patella inerme; tibia com 4 espinhos internos e 5 externos; tarso com 3 internos e 4 externos. Todos os femures direitos. Tarsos de 9-19-10-10 segmentos. Região cephalo-thoracica quasi negra; escudo dorsal castanho, com manchas circulares em torno das granulações, e com os espinhos negros; patas castanhas de articulações mais claras.

Macho — Espinhos da area III do escudo dorsal e espinhos angulares da area IV e dos tergitos livres, bem menores. Operculo anal com pequenino cone. Tarsos de 10-21-12-12 segmentos. Femures III com uma serrilha de pequenos espinhos anteriores no terço apicilar.

Patas IV: anca granulosa, com robusta apophyse apicilar externa, quasi transversal e curta apophyse apicilar interna, dirigida para trás; trochanter muito robusto, mais longo do que largo, com uma apophyse basilar erecta, um espinho apicilar interno e outro apicilar dorsal, dirigido para dentro, sobre o segmento; femur curvo em S, com filas de granulos e robusto espinho interno no terço medio.

O resto como na femea.

Habitat: Japyra, Paraná, Brasil.

Colleccionador: Estanislau Petruski.

Typo: No. 9 na collecção do Instituto Butantan.

As tres especies do genero *Leitaoius* RWR. podem ser separadas pela seguinte chave:

A — Cephalo-thorace com granulações esparsas; espinhos angulares da area IV e tergitos livres, fortes:

B — Colorido geral negro-brunette uniforme; femur III do macho inerme; femur IV com um espinho apicilar interno, curvo para o dorso — *L. hamatus* (RWR.)

BB — Dorso com um desenho branco; femur III do macho com espinhos anteriores espaçados; femur IV com fila de espinhos internos na metade basilar — *L. ornatus* M. L.

AA — Cephalo-thorace com duas granulações atrás do comoro ocular; espinhos angulares da area IV e tergitos livres, pequenos; colorido castanho, manchado de pontos mais claros; femur III do macho com uma serrilha apicilar; femur IV curvo, com forte espinho interno, no terço medio — *L. guttulatus* M. L.

Genero **Diplocaldasius**, g. n.

Comoro ocular com dois espinhos. Areas I, II e III do escudo dorsal com dois tuberculos; area IV, tergito livre I e operculo anal, inermes; tergitos II e III com um espinho mediano. Femur dos palpos com dois espinhos apicilares internos. Tarsos I de seis segmentos, os outros de mais de seis.

Ha, descriptos, tres generos com dois tuberculos nas tres primeiras areas do escudo dorsal e um espinho mediano nos tergitos II e III, todos com a mesma

segmentação dos tarsos; *Caldasius* RWR., *Nygoleptes* e *Caldasiella* M. L., *Diplocaldasius* distingue-se de *Caldasius,* por ter dois espinhos no comoro ocular (em vez de um só, mediano) e de *Nygoleptes* e *Caldasiella,* por ter espinhos, em vez de tuberculos, no comoro ocular; de todos, por ter dois espinhos apicilares internos no femur dos palpos (um só em *Caldasius* e *Caldasiella* e nem um em *Nygoleptes*). Fora da serie muito homogenea dos generos do grupo *Goniosoma* PERTY, é este o unico com dois espinhos apicilares no femur dos palpos. Typo:

Diplocaldasius pallidus, sp. n.

(Fig. 5)

Femea — 10 mm..

Borda anterior com uma notavel elevação mediana, armada de dois espinhos. Comoro ocular liso com dois espinhos baixos. Cephalo-thorace com algumas granulações pequenas. Areas I, II e III irregularmente granulosas e com dois tuberculos medianos. Areas lateraes com duas filas de granulos. Area IV, tergitos e esternitos livres com uma fila de granulações; nos tergitos II e III robusto espinho mediano, o do tergito III maior. Operculo anal granuloso. Area estigmatica e ancas densamente granulosas. Palpos: trochanter com dois granulos inferiores, settiferos; femur com uma fila inferior de tres pequenos espinhos inferiores e com dois espinhos apicilares internos; patella inerme; tibia com 3 espinhos externos e 4 internos, tarso com 6 de cada lado, sendo os apicilares apenas settiformes. Todos os femures direitos. Tarsos com 6-10-8-8 segmentos.

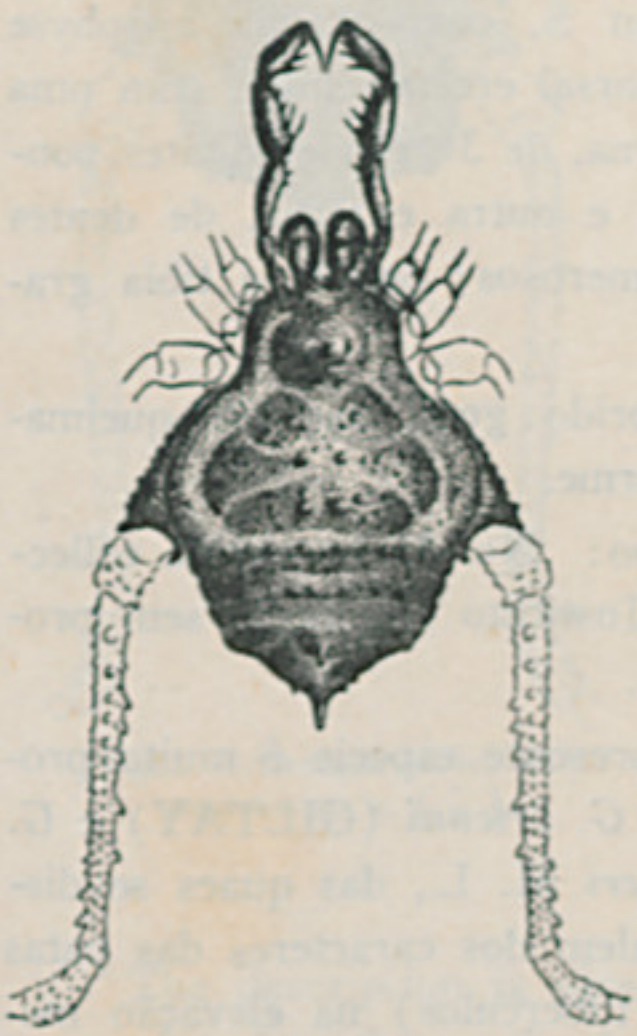


Fig. 5 — iplocaldasius pallidus g. n., sp. n. (♀)

Colorido geral amarello-queimado, com leves laivos escuros e de granulações mais claras.

Typo: No. 10 na antiga collecção do Instituto Butantan, sem procedencia.

Genero **Gonyleptes** KIRBY, 1818

Gonyleptes antiquus, sp. n.

(Fig. 6)

Macho — 6 mm..

Patas: 9-18-13-19 mm.. Femures: 2,5-5-4-5 mm..

Borda anterior lisa, com uma elevação mediana com espinhos. Comoro

granulações esparsas. Areas I a III com granulações esparsas e dois pequenos ocular *chagriné,* com dois pequenos tuberculos. Cephalo-thorace com algumas tuberculos. Areas lateraes com tres filas de granulações. Area IV, tergitos e esternitos livres, com uma fila de granulos. Area estigmatica e ancas IV, fina e irregularmente granulosas. Palpos: trochanter com pequeno espinho; femur liso, com pequeno espinro apicilar interno; patella inerme; tibia com tres espinhos internos e dois externos; tarso com cinco de cada lado. Todos os femures curvos em S. Tarsos de 6-9-7-7 segmentos.



Fig. 6 — Gonyleptes antiquus, sp. n. (♂)

Patas IV do macho: anca granulosa, com uma curta apophyse apicilar externa, robusta, dirigida para trás; trochanter com uma pequena apophyse externa e duas internas; femur curvo em S, com grande apophyse basilar dorsal erecta, em Y, com uma fila interna, de 3 grandes dentes ponteagudos e outra externa, de dentes mais numerosos; patella e tibia granulosas.

Colorido geral castanho-queimado uniforme.

Typo: No. 11 na antiga collecção do Instituto Butantan, sem procedencia.

A presente especie é muito proxima de *G. brienni* (GILTAY) e *G. borgmeyeri* M. L., das quaes se distingue, alem dos caracteres das patas IV do macho, por ter dois espinhos (em vez de tuberculos) na elevação mediana da borda anterior do cephalo-thorace.

Genero **Metagonyleptes** ROEWER, 1913

Metagonyleptes misandrus, sp. n.

(Fig. 7)

Femea — 12 mm..

Patas: 25,5-51,5-36-48,5 mm.. Femures: 7-15-11-14 mm..

Borda anterior do cephalo-thorace com dois tuberculos medianos. Comoro ocular com dois altos espinhos divergentes. Cephalo-thorace liso dos lados e irre-

gularmente granuloso atrás do comoro ocular. Areas I, II e III do escudo dorsal muito granulosas, as duas primeiras com dois tuberculos e a terceira com dois robustissimos espinhos. Areas lateraes irregularmente granulosas nos terços anterior e posterior e com duas filas de pequenos tuberculos. Area IV e tergitos livres com duas filas de granulações; cada tergito livre com uma apophyse mediana quasi igual em qualquer dos tres. Esternitos livres com uma fila de granulos. Area estigmatica e ancas granulosas. Palpos: trochanter com um espinho apicilar inferior; femur com um fila ventral de granulações settiferas; tibia com 4 espinhos fracos de cada lado; tarso com dois espinhos internos e tres externos e algumas cerdas. Femures I a III direitos; IV levemente curvos. Tarsos de 6-11-7-8 segmentos.

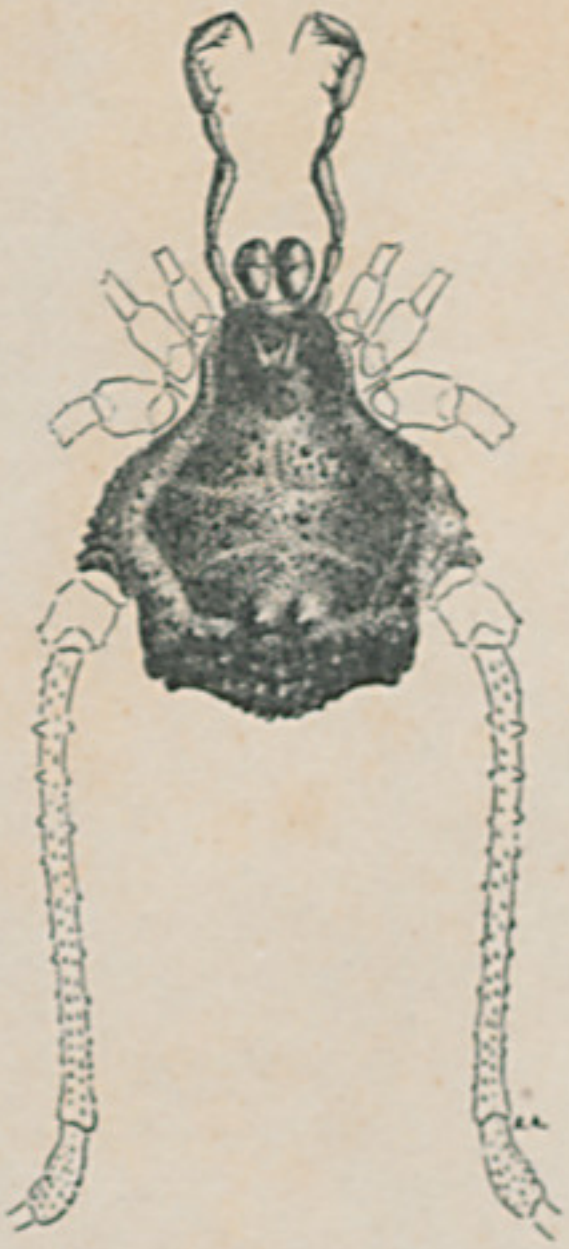


Fig. 7 — Metagonyleptes misandrus, sp. n. (♀)

Colorido geral negro; tuberculos da borda anterior do cephalo-thorace e espinhos do comoro ocular amarello-queimados; granulações do terço anterior das areas lateraes amarello-pallidas.

Typo: No. 12 na collecção do Instituto Butantan; sem procedencia.

A presente especie é muito proxima de *M. fallax* M. L., da qual se distingue pela armadura da borda anterior do cephado-thorace e pelos altos espinhos da area III do escudo dorsal.

ABSTRACT

The description is given of seven new forms of Gonyleptid Opiliones as represented in the arachnological collection of the Instituto Butantan. Of these two belong to the *Pachylinae*: *Afranius amarali*, g. n., sp. n. and *Japyra regularis*, g. n., sp. n.; the other five belong to the *Gonyleptinae*: *Leitaoius ornatus*, sp. n., *L. guttulatus*, sp. n., *Diplocaldasius pallidus*, g. n., sp. n., *Gonyleptes antiquus*, sp. n. and *Metagonyleptes misandrus*, sp. n..

(Trabalho de collaboração do Museu Nacional, Rio, recebido para publicação em agosto de 1934. Dado á publicidade em dezembro de 1934.)



Empreza Graphica da
REVISTA DOS TRIBUNAES
Rua Xavier de Toledo, 72
São Paulo - Brasil — 1934