

TENTATIVAS DE TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DO “TYPHO EXANTHEMATICO” DE S. PAULO POR PERCEVEJOS (*CIMEX LECTULARIUS*)

POR

J. LEMOS MONTEIRO

O percevejo da cama (*Cimex lectularius*) não tem sido incriminado como provavel transmissor de qualquer das modalidades de febres exanthematicas ou rickettsioses. Este modo de ver é baseado, sobretudo, na observação epidemiologica.

Do ponto de vista experimental, porém, estão já registados os resultados de algumas experiencias. Castaneda e Zinsser (1), trabalhando com o virus do “typho mexicano” (rickettsiose endemica), verificaram poder elle persistir no percevejo (*Cimex lectularius*), inoculado por via rectal, durante 10 dias; conseguiram infectar percevejos, fazendo-os alimentar em ratos infectados e benzolizados, porquanto a inoculação de organs desses percevejos, feita 9 dias após a primeira e 5 após a ultima alimentação, provocava a infecção da cobaia. Foram negativas as experiencias de Castaneda e Zinsser quanto á transmissão pela picada dos percevejos ou pelo esfregaço das fezes dos mesmos na pelle sã. Embora não tenham completado o cyclo demonstrativo da transmissão do “typho mexicano” pelo percevejo, nesse trabalho mostram acreditar na possibilidade de sua interferencia no caso do homem, mais sensivel do que os animaes de experimentação.

Desconhecemos outro qualquer trabalho systematico sobre as relações dos percevejos com virus de outras rickettsioses, principalmente das do grupo da “febre maculosa”, que mais nos interessa. A esse respeito apenas podemos registar algumas pesquisas feitas entre nós.

Relativamente ao “typho exanthematico” de S. Paulo (rickettsiose neotropica), foram negativos os resultados obtidos em Butantan (2), quanto á pesquisa de percevejos naturalmente infectados e colhidos no leito e em casas de doentes. Não foram diversos os resultados das inoculações praticadas no Instituto Bacteriologico.

Mais recentemente, porém, Moreira e Magalhães (3), estudando o "typho exanthematico" de Minas Geraes, descreveram uma serie de experiencias que fizeram com percevejos (*Cimex lectularius*) e a cuja luz salientaram, embora não tirassem conclusões definitivas, o papel possivelmente desempenhado por taes insectos na transmissão natural da rickettsiose de Minas Geraes. Assim é que assignalaram terem conseguido a infecção característica da cabaia com a inoculação de percevejos colhidos em casas de onde, 2 e 10 dias antes, haviam sahido doentes. Registaram, além disto, resultados positivos da infecção de cabaia, por inoculação ou por picada, com percevejos criados no laboratorio e experimentalmente infectados pela alimentação em animal doente e mesmo a transmissão congenita do virus aos ovos e larvas (4). Dadas certas relações que Moreira e Magalhães (4) verificaram entre o "typho exanthematico" de Minas Geraes e o "typho exanthematico" de S. Paulo, embora não os tivessem identificado, julgamos de grande interesse pratico e scientifico verificar a possibilidade de ser o virus do "typho exanthematico" de S. Paulo transmittido tambem pelos percevejos.

Os resultados experimentaes que obtivemos são registados neste trabalho.

Material de estudo e orientação das experiencias

Fizemos até agora 3 series de experiencias: na primeira, foram usados percevejos adultos (*Cimex lectularius*) colhidos numa casa no bairro de Pinheiros; na segunda, as experiencias foram feitas partindo de larvas de desova processada no laboratorio; na terceira, empregando-se adultos que foram creados e evoluíram na laboratorio.

1.^a SERIE — Um lote de 30 percevejos adultos, após varios dias sem alimentação, foi posto a sugar a cabaia No. 1965, no 1.^o dia de reacção febril e 3.^o da inoculação. Sobre esta cabaia, infectada com o "typho exanthematico" de S. Paulo (1 cc. de sangue da colonia No. 1947) e correspondente á 17.^a passagem da amostra Nymph. Llb (isolada de nymphas de *Amblyomma cajennense* infectadas), os percevejos permaneceram durante 3 dias, de 6 a 9-VIII-934, por meio de um dispositivo especial. No fim deste tempo foram recolhidos 25 exemplares bem cheios de sangue, os quaes foram conservados num tubinho, na temperatura de 23° e em boas condições de humidade. A infecção da cabaia ficou confirmada pela inoculação de emulsão de cerebro na cabaia No. 1977.

No fim de 5 dias (14-VIII-934) os percevejos foram transferidos para novo tubinho; as fezes accumuladas nesse prazo no primeiro tubo, foram emulsionadas e inoculadas na cabaia No. 1996; 5 exemplares, após lavagem conveniente, foram emulsionados e inoculados na cabaia No. 1997. Os exemplares restantes foram divididos em 2 lotes: a) 9 percevejos foram postos a alimentar-se na cabaia nor-

mal No. 1998 durante 4 dias sendo recolhidos; b) outros continuaram no tubinho nas condições anteriores. Ovos encontrados no tubinho foram convenientemente lavados, emulsionados e inoculados na cobaia No. 1999.

No fim de 11 dias, em 20-VIII-934, as fezes acumuladas no tubinho do lote b), do 5.º ao 11.º dia, foram emulsionados e inoculadas na cobaia No. 2019; os exemplares vivos deste lote, em numero de 4, foram postos a alimentar-se na cobaia normal No. 2020 durante 4 dias, sendo recolhidos no fim deste prazo.

No fim de 15 dias, em 24-VIII-934, os exemplares do lote a) foram de novo postos a alimentar-se na cobaia No. 2049, durante 3 dias, sendo recolhidos.

No fim de 20 dias após a alimentação infectante, em 29-VIII-934, os exemplares vivos, em numero de 2, do lote b) foram postos a alimentar-se na cobaia normal No. 2074 durante 24 horas, sendo, em 30-VIII-934, emulsionados e inoculados na cobaia No. 2080.

No fim de 25 dias após a alimentação infectante, em 3-IX-934, o exemplar vivo do lote a) foi posto a sugar na cobaia normal No. 2093, sendo 2 dias depois, em 5-IX-934, juntamente com outros 4 exemplares do mesmo lote e encontrados mortos no tubinho, emulsionados e inoculados na cobaia No. 2100.

2.ª SERIE — Numerosas larvas, de criação feita no laboratório, foram postas a alimentar-se, em 28-VIII-934, no coelho No. 67, infectado com o nosso "virus" L (correspondente á 208.ª passagem), estando no 2.º dia de reacção febril (40º0) e 5.º da inoculação (1 cc. de sangue da cobaia No. 2015). As larvas, famintas, rapidamente começaram a sugar o sangue e, em pouco tempo, tornaram-se vermelhinhas. Uma vez saciadas, desprenderam-se espontaneamente e foram recolhidas. O coelho No. 67, foi sacrificado no 12.º dia após a inoculação e, para confirmação da infecção, emulsão de seu cerebro foi inoculada na cobaia No. 2095.

Outro lote de larvas nas mesmas condições foi alimentado, em 4-IX-934, na cobaia No. 2077, infectada com a amostra Nymph. Llb do virus (1 cc. de sangue da cobaia No. 2050, correspondente á 22.ª passagem), no 2.º dia da reacção febril e 5.º da inoculação. Nesse dia, para confirmação da infecção, a cobaia No. 2077 foi sangrada e inoculada a cobaia No. 2097 com 1 cc. de sangue.

Assim infectadas as larvas, um lote de 20 exemplares, após conveniente lavagem, foi imediatamente inoculado na cobaia No. 2096, afim de se saber si a quantidade de sangue virulento ingerida fora sufficiente para infectar esse animal.

As restantes das larvas foram recolhidas e conservadas em tubinhos nas condições conhecidas.

Decorridos 2 dias, exemplares no mesmo numero (20), já agora de cor mais escura pela modificação do sangue ingerido, processada nesse prazo, foram retirados, lavados convenientemente (alcool e agua physiologica) emulsionados e inoculados na cobaia No. 2081.

Decorridos 8 dias da alimentação infectante, em 5-IX-934, as larvas que se haviam alimentado no coelho No. 67, foram postas a sugar novamente a cobaia No. 2098, sendo, depois de cheias, separadas 20 que foram lavadas, emulsionadas e inoculadas na cobaia No. 2099. Decorridos 16 dias, em 13-IX-934, larvas deste mesmo lote, que já haviam sofrido muda da pelle por 2 vezes, foram postas a alimentar-se na cobaia No. 2139, sendo, depois de cheias, separadas 20 que foram emulsionadas e inoculadas na cobaia No. 2140. Nesse mesmo prazo, em 20-IX-934, isto é, 16 dias, e após nova alimentação em cobaia normal (No. 2096), as larvas infectadas na cobaia No. 2077 foram postas a sugar novamente a cobaia No. 2177 e, depois de cheias, 12 exemplares foram emulsionados e inoculados na mesma cobaia.

No mesmo prazo, 16 dias, outros exemplares do lote infectado na cobaia No. 2077, em numero de 12, foram postos a sugar novamente, porém agora a cobaia infectada No. 2147 (no 2.º dia de reacção e 5.º da inoculação) e, no dia seguinte, após, portanto, 24 horas, emulsionados e inoculados na cobaia No. 2178.

Com a ultima experiencia tinhamos em vista verificar si o virus havia resistido por 24 horas no organismo das larvas, pois, em experiencia acima exposta, tinha sido verificada a avirulencia das larvas inoculadas após 48 horas da alimentação infectante.

3.ª SERIE — As experiencias desta serie foram feitas com percevejos já adultos que evoluíram no laboratorio. Ao serem iniciadas, em 23-X-934, haviam decorridos 33 dias após a ultima alimentação dos exemplares usados. Antes de sua alimentação em animal infectado, foram separados 6 que, após lavagem conveniente, foram emulsionados e inoculados na cobaia No. 2279. Os exemplares restantes foram postos a se alimentar na cobaia No. 2264, infectada (1cc. de sangue da cobaia No. 2251, correspondente á 215ª. passagem da amostra L do virus) no 3.º dia da reacção febril e 6.º da inoculação. Como confirmação da infecção, a cobaia, na vespera, havia sido sangrada, sendo inoculada com 1 cc. de sangue, a cobaia No. 2276.

Decorridas 24 horas, em 24-X-934, os percevejos foram mudados e as fezes accumuladas neste prazo no tubinho, emulsionadas e inoculadas, por via sub-cutanea, na cobaia No. 2280; 5 exemplares foram lavados, emulsionados e tambem inoculados, por via sub-cutanea, na cobaia No. 2281; 10 exemplares foram postos a alimentar-se na cobaia No. 2282. Este lote de 10, em tubo separado, repetiu a alimentação na *mesma cobaia*, de tempos em tempos (de 2 em 2 ou 3 em 3 dias) durante os primeiros 20 dias.

Decorridas 48 horas, em 25-X-934, as fezes accumuladas nesse prazo e, conjunctamente com 5 exemplares, foram, nas mesmas condições, inoculados, respectivamente, nas cobaias No. 2289 e No. 2290; tambem 10 exemplares foram separados e postos a alimentar-se na cobaia No. 2291, repetindo-se na mesma cobaia as alimentações successivas durante os primeiros 20 dias.

Decorridas 72 horas, em 26-X-934, o mesmo se repetiu, sendo utilizadas, respectivamente, as cobaias Nos. 2292, 2293 e 2294.

Finalmente, decorridos 13 dias, em 5-XI-934, foram emulsionados 5 exemplares e inoculados na cobaia No. 2319 e separados 10 que foram postos a alimentar-se, desde então, e successivamente, na cobaia No. 2320.

Os resultados destas 3 series de experiencias, orientadas nas condições expostas, forneceriam certamente elementos bastantes para esclarecer a possibilidade de o percevejo poder transmittir, em condições experimentaes, o virus da rickettsiose de S. Paulo e, portanto, sobre o papel por elle porventura desempenhado em condições naturaes.

Todos os animaes em experimentação foram observados com rigor, a temperatura rectal tomada diariamente, ás mesmas horas (12 horas). Os que morreram foram necropsiados, sendo observadas as lesões macroscopicas e feitos outros exames para determinação da causa da morte assim como pesquisada a rickettsia nas cellulas da parede peritoneal.

Os que resistiram foram, em prazo differente, não inferior a 20 dias, conforme a experiencia em curso e seus resultados, reinoculados com o virus activo para prova ou verificação da immuniidade.

Resultados das experiencias

Mostraremos estes resultados, separadamente, em cada uma das series de experiencias, resumindo somente os dados registados com os animaes inoculados, uma vez que já foram expostas a technica e as directrizes de cada uma.

1.^a SERIE — *Cobaia No. 1965 (♂)* — Inoculada com o virus em 4-VIII-934. Início de reacção febril no 3.^o dia (39°8), quando os percevejos iniciaram a alimentação, que perdurou 3 dias; nos dias immediatos apresentou 40°0 e 40°5; no 6.^o dia, parecendo mal, foi sacrificada, sendo retirados os percevejos. Para confirmação da infecção da cobaia em que se alimentaram, emulsão de cerebro foi inoculada na cobaia No. 1977 em 9-VIII-934. Esta, após incubação de 4 dias, apresentou reacção caracteristica (39°8; no 5.^o dia; 40°2; 40°0; 40°2), morrendo durante a noite de 16 para 17. No 3.^o dia de reacção (40°0) foi sangrada e o sangue inoculado na cobaia No. 2001. Esta, por sua vez, teve infecção caracteristica (incubação de 3 dias, reacção febril por 4 dias) e morte na noite do 7.^o para o 8.^o dia. Durante a reacção, com seu sangue foi feita nova passagem, repetida successivamente para manutenção da amostra do virus.

Experiencia 1 — Cobaia No. 1996 (♀) — Inoculada em 14-VIII-934, por via sub-cutanea, com emulsão de *excreta* emittidos por percevejos que, 5 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 1965, infectada. Não apresentou reacção

febril, pelo que, em 3-IX-934 (decorridos 20 dias), foi inoculada com o virus (emulsão de cerebro da cobaia No. 2064), apresentando, após incubação de 3 dias, reacção febril característica ($40^{\circ}0$; $40^{\circ}4$; $40^{\circ}0$; $40^{\circ}3$; $40^{\circ}0$) e morrendo na noite de 11 para 12-IX-934. Não se mostrou, portanto, imunizada.

Experiencia 2 — Cobaia No. 1997 (♀) — Inoculada em 14-VIII-934 com emulsão de 5 percevejos que, 5 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 1965, infectada. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 3-IX-934 (decorridos 20 dias), foi inoculada com o virus (emulsão de cerebro da cobaia No. 2064), apresentando, após incubação de 4 dias, reacção febril característica ($40^{\circ}4$; $40^{\circ}4$; $40^{\circ}4$; $40^{\circ}0$; $40^{\circ}2$) e morrendo em 13-IX-934.

Experiencia 3 — Cobaia No. 1998 — Posta a ser sugada, de 14 a 18-VIII-934, por 9 percevejos que se haviam alimentado, 5 dias antes, na cobaia No. 1965, infectada. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 3-IX-934 (decorridos 20 dias), foi inoculada com o virus (emulsão de cerebro da cobaia No. 2064). No 5.º dia iniciou-se a reacção febril ($39^{\circ}8$); a cobaia, porém, morreu na noite desse dia, apresentando baço augmentado de volume. Não se mostrou, portanto, imunizada.

Experiencia 4 — Cobaia No. 1999 — Inoculada em 14-VIII-934, por via sub-cutanea, com emulsão de 10 ovos depositados por percevejos que, 5 dias antes se haviam alimentado na cobaia No. 1965, infectada. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 3-IX-934 (decorridos 20 dias), foi inoculada com o virus (emulsão de cerebro da cobaia No. 2064), apresentando após incubação de 3 dias, reacção febril característica ($39^{\circ}8$; $40^{\circ}5$; $40^{\circ}2$; $40^{\circ}8$; $40^{\circ}6$) e morrendo na noite de 11 para 12-IX-934. Não houve, portanto, immuniidade.

Como testemunha do virus das experiencias acima, sangue da cobaia No. 2064 (que o forneceu, em sangria praticada durante a reacção febril) foi inoculado, em 1-IX-934, nas cobaias Nos. 2082 e 2083, que tiveram infecção característica, sendo continuadas as passagens.

Experiencia 5 — Cobaia No. 2019 — Inoculada em 20-VIII-934 com emulsão de *excreta* emittidos por percevejos, desde o 5.º até o 11.º dia após a alimentação infectante. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 12-IX-934 (decorridos 23 dias) foi inoculada com o virus (sangue da cobaia No. 2111), apresentando, após 2 dias de incubação, reacção febril característica ($40^{\circ}0$; $40^{\circ}0$; $40^{\circ}5$; $40^{\circ}5$; $39^{\circ}8$) e morrendo na noite de 19 para 20-IX-934. Não houve, portanto, immuniidade.

Experiencia 6 — Cobaia No. 2020 — Posta a ser alimentada, de 20 a 25-VIII-934, por 4 percevejos que, 11 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 1965, infectada. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 12-IX-934 (decorridos 23 dias), foi inoculada com o virus (sangue da cobaia No. 2111), apresentando incubação de 3 dias, reacção febril característica ($40^{\circ}0$; $40^{\circ}5$; $41^{\circ}0$;

40°7; 38°4), morrendo na noite de 20 para 21-IX-934. Não houve, portanto, imunidade.

Como testemunha do virus das experiencias 5 e 6, foi, na mesma ocasião inoculada com sangue da cobaia No. 2111, a cobaia No. 2137, que teve infecção característica.

Experiencia 7 — Cobaia No. 2049 — Posta a ser alimentada, de 24 a 28-VIII-934, por 8 percevejos que, 15 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 1956, infectada. Não apresentou reacção febril, porém amanheceu morta em 3-IX-934, não apresentando, na necropsia, qualquer lesão característica da infecção.

Experiencia 8 — Cobaia No. 2074 — Posta a ser alimentada, de 29 a 30-VIII-934, por 2 percevejos que, 20 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 1965, infectada. Estes exemplares pertenciam ao lote que se alimentou pela 2ª. vez após 11 dias (Experiencia 6). Não apresentou reacção febril, pelo que, em 19-IX-934 (decorridos 21 dias), foi inoculada com o virus (sangue da cobaia No. 2144), apresentando, após 2 dias de incubação, reacção febril característica (39°8; 40°0; 40°5; 40°8; 40°6; 40°5; 40°0) e morrendo na noite de 27 para 28-IX-934.

Com o mesmo virus (sangue da cobaia No. 2144) foi na mesma ocasião (19-IX-934) inoculada, como testemunha, a cobaia No. 2170, que teve infecção característica com novas passagens do virus.

Experiencia 9 — Cobaia No. 2080 — Inoculada em 30-VIII-934, por via sub-cutanea, com emulsão de 2 percevejos que, 21 dias antes se haviam alimentado em cobaia infectada, e novamente em cobaias normaes no fim de 11 (Experiencia 6) e 20 dias (Experiencia 8). Não apresentou reacção febril, porém amanheceu morta em 19-IX-934. A pesquisa de rickettsias nas cellulas da parede peritoneal foi negativa e para confirmação da sua não infecção, foi, com emulsão de seu cerebro, inoculada a cobaia No. 2167.

A cobaia No. 2167, após 4 dias, apresentou reacção febril durante 3 dias (40°0; 40°0; 39°8), amanhecendo morta em 27-IX-934. Pela necropsia, verifica-se derrame no peritonal; em esfregaços de raspagem da parede peritoneal, não se encontram Rickettsias, porém a pesquisa foi positiva para *Toxoplasma*. Esta a causa da reacção, podendo simular a reacção pelo virus. Ainda durante a reacção febril (40°0), em 25-IX-934, a cobaia No. 2167 foi sangrada e com 1 cc. de sangue inoculada a cobaia No. 2201 que, não apresentou reacção febril (maximo a 39°5), morrendo porém em 3-X-934, por infecção intercorrente.

Experiencia 10 — Cobaia No. 2093 (♂) — Posta a ser alimentada, de 3 a 5-IX-934, por um percevejo que, 25 dias antes, se havia alimentado na cobaia No. 1965, infectada. O exemplar pertencia ao lote que fez novas alimentações em cobaias normaes no fim de 5 (Experiencia 3) e 15 dias (Experiencia 7). A

cobaia morreu, por infecção intercorrente no 6º. dia, não apresentando, pela necropsia, qualquer lesão característica (baço do tamanho e aspecto normal).

Experiencia 11 — Cobaia No. 2100 — Inoculada em 5-IX-934, por via subcutanea, com emulsão de percevejo da experiencia anterior, juntamente com outros 4 exemplares do mesmo lote, encontrados mortos nos tubinhos. Não apresentou reacção febril durante 18 dias, com excepção do 3º. (39º8) e 5º. dia (40º7), sendo sangrada neste dia e com 1 cc. de sangue inoculada a cobaia No. 2119. A cobaia No. 2119 somente após 21 dias começou a ter certos periodos de reacção febril irregular. Num destes periodos (22º. dia da inoculação) foi sangrada e 1 cc. de sangue inoculado na cobaia No. 2222. A cobaia No. 2222 teve, após incubação de 3 dias, reacção febril durante 5 dias, sendo sacrificada. O seu sangue no 3º. dia de reacção (8-X-934) foi inoculado na cobaia No. 2239. Emulsão do cerebro foi, em 10-X-934 inoculada na cobaia No. 2247. A cobaia No. 2239 teve reacção febril nos 3 dias seguintes; a sementeira do sangue permittiu a cultura e isolamento de uma *Salmonella*. A cobaia No. 2247, teve tambem reacção febril simulando a da infecção pelo virus; porém a cultura do sangue do coração mostrou-se tambem positiva, sendo isolada uma *Salmonella*.

Nestas condições, ficou patente ter sido a reacção febril, embora atypica, verificada nas cobaias desta experiencia, determinada por infecção secundaria devida a uma salmonellose.

Verifica-se pelos resultados das experiencias desta 1ª. Serie, que o virus do "typho exanthematico" de S. Paulo não pode ser transmittido, experimentalmente e pela picada por percevejos adultos (*Cimex lectularius*), decorridos 5 dias da picada até 25 dias após; excreta, accumulados até o 5º. dia e desde este dia até 11º., não continham o virus com capacidade infectante ou mesmo capaz de provocar immuniidade; o virus tambem se mostrou destruido ou incapaz de provocar, pelo menos, immuniidade dos animaes, pela inoculação dos percevejos infectados, decorridos aquelles prazos; finalmente, ficou patente que uma infecção intercorrente em animaes inoculados pode ser verificada (toxoplasmose, salmonellose), simulando a infecção pelo virus, tornando-se necessarias pesquisas cuidadas (culturas do sangue do coração, etc.) antes de se chegar a conclusões definitivas.

2.ª SERIE — *Coelho No. 67* — Inoculado em 23-VIII-934 com 1 cc. de sangue da cobaia No. 2015 (correspondente a 207ª. passagem da amostra L do nosso virus). Após 4 dias de incubação, iniciou-se a reacção febril durante 7 dias (40º0; 40º0; 40º0; 39º8; 40º2; 40º4; 40º0). Foi sacrificado no dia seguinte (4-IX-934) e, para confirmação da infecção, emulsão de cerebro foi inoculada na cobaia No. 2095, que teve, após incubação de 5 dias, reacção febril característica durante 4 dias, morrendo na noite de 15 para 16-IX-934. No 1º. dia da reacção febril do coelho No. 67, em 28-VIII-934, numerosas larvas de percevejos,

de postura obtida no laboratório, foram nelle alimentadas, enchendo-se rapidamente.

Cobaia No. 2077 — Inoculada em 30-VIII-934 com 1 cc. de sangue da cobaia No. 2050 (correspondente á 21ª. passagem da amostra Llb do virus, isolada de nymphas de *Amblyomma cajennense* infectadas). Após incubação de 3 dias, apresentou reacção febril característica durante 5 dias, com reacção escrotal, morrendo na noite de 8 para 9-IX-934. Para confirmação da sua infecção, no 2º. dia da reacção febril (40°2) em 4-IX-934 quando foi picada por numerosas larvas também de postura effectuada no laboratório e que se encheram immediatamente, a cobaia foi sangrada sendo 1 cc. de sangue inoculado na cobaia No. 2097. Esta teve, por sua vez, infecção característica (incubação de 3 dias, reacção febril durante 4 dias e morte), sendo continuadas as passagens successivas do virus.

Experiencia 12 — *Cobaia No. 2096* — Inoculada em 4-IX-934, com emulsão de 20 larvas de percevejos (após conveniente lavagem), que se haviam alimentado na cobaia No. 2077, infectada. Após incubação de 6 dias, iniciou-se a reacção febril característica (40°2; 40°5; 40°2), morrendo o animal na noite de 14 para 15-IX-934 com lesões typicas. No 2º. dia da reacção febril (40°5) a cobaia foi sangrada, sendo inoculada, em 12-IX-934 com lesões typicas. No 2º. dia da reacção febril (40°5) a cobaia foi sangrada, sendo inoculada, em 12-IX-934; a cobaia No. 2134, que teve infecção característica, sendo seu sangue em 17-IX-934 (estando a cobaia com 40°5) passado para a cobaia No. 2163, continuando-se a serie de passagem. A cobaia No. 2134 apresentou reacção escrotal com phenomenos hemorrhagicos, sendo positiva (++++) a pesquisa de Rickettsias nas cellulas mesotheliaes da parede peritoneal.

Como se vê por esta experiencia, o virus contido em 20 larvas, immediatamente após terem sugado um cobaia infectada, é capaz de determinar a infecção característica pela inoculação das mesmas.

Experiencia 13 — *Cobaia No. 2081* — Inoculada em 30-VIII-934 com emulsão de 20 larvas que, 48 horas antes, se haviam alimentado no coelho No. 67, infectado. Não apresentou reacção febril, morrendo, porém, 16 dias depois, sem mostrar qualquer lesão característica (baço de aspecto normal).

Já em 48 horas, portanto, o "virus" conservado nas larvas mostrou-se incapaz de provocar a infecção característica pela inoculação das mesmas, ao contrario da Experiencia 12, na qual foi esta provocada pela inoculação de igual numero de larvas, porém inoculadas immediatamente após terem sugado.

Experiencia 14 — *Cobaia No. 2098* — Posta a ser sugada, em 5-IX-934, por numerosas larvas (cerca de 100), que já haviam soffrido mudas e que, 8 dias antes, se tinham alimentado no coelho No. 67, infectado. Não apresentou reacção

febril, morrendo de infecção intercorrente 9 dias depois, sem lesões características (baço de aspecto normal).

Experiencia 15 — Cobaia No. 2099 — Inoculada, em 5-IX-934, com emulsão de 10 larvas (já tendo soffrido muda) que, 8 dias antes, se haviam alimentado no coelho No. 67, infectado. A cobaia não apresentou reacção característica; teve a temperatura de 39°7 no 14° dia, quando foi sangrada e 1 cc. de sangue inoculado na cobaia No. 2168, e 39°8, 39°8 e 40°0, respectivamente nos 17.º, 19.º e 20.º dias; neste ultimo dia, em 25-IX-934, foi novamente sangrada e 1 cc. de sangue inoculado na cobaia No. 2199. Mais tarde, em 19-X-934 (decorridos 44 dias) a cobaia No. 2099 foi inoculada com o virus (emulsão de cerebro da cobaia No. 2252), apresentando, após incubação de 2 dias, reacção febril característica durante 9 dias, morrendo em 30-X-934, com lesões typicas.

Este resultado negativo, confirmado pela prova de immuidade, teve nova confirmação com os resultados nas cobaias inoculadas com sangue da em experiencia. A cobaia No. 2199 não apresentou reacção, morrendo de infecção intercorrente, sem lesões typicas á necropsia. A cobaia No. 2168, inoculada com sangue de cobaia No. 2099, em experiencia, apresentou reacção febril atypica, irregular, sendo, num dos periodos de reacção, sangrada e 1 cc. de sangue inoculado na cobaia No. 2221 que por sua vez não apresentou reacção febril. Ambas, cobaia No. 2168 e No. 2221, foram inoculadas, em 19-X-934, com virus activo (emulsão de cerebro da cobaia No. 2252), e tiveram infecção característica.

Experiencia 16 — Cobaia No. 2139 — Posta a ser sugada em 13-IX-934 por cerca de 100 larvas (já com duas mudas) que, 16 dias antes se haviam alimentado no coelho No. 67, infectado. O mesmo lote alimentou-se novamente na mesma cobaia em 20-IX-934, após 7 dias da primeira alimentação. Não apresentou reacção característica, porém a temperatura elevou-se a 40° nos 12.º e 13.º dias; neste ultimo dia, foi semeado sangue do coração e inoculada com 1 cc. do sangue a cobaia No. 2207. A cultura do sangue do coração foi positiva; a cobaia No. 2207 teve tambem reacção mais precoce, simulando a infecção pelo virus, sendo semeado o seu sangue e inoculada a cobaia No. 2220. A cultura do sangue foi tambem positiva e a cobaia No. 2220 morreu da mesma infecção intercorrente em 3 dias. O exame das culturas feitas demonstrou ter sido uma *Salmonella* a causa da reacção observada nas cobaias desta experiencia.

Experiencia 17 — Cobaia No. 2140 — Inoculada em 17-IX-934 com emulsão de 20 larvas que, 16 dias antes, se haviam alimentado no coelho No. 67, infectado. Não apresentou reacção característica, porém alguns dias com reacção após o 11.º. Como na experiencia anterior foi feita cultura do sangue do coração e passagens em serie para a cobaia No. 2200 e desta para a cobaia No. 2246. Esta ultima, pela exaltação provavel da infecção intercorrente, morreu em 5 dias. O exame das culturas obtidas com estas varias cobaias mostrou

ser a infecção intercorrente uma *Salmonellose*, como nas da experiência anterior (*).

Experiencia 18 — *Cobaia No. 2177* — Posta a ser alimentada, em 20-IX-934, pelas larvas que, 16 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2077. As mesmas larvas já se haviam anteriormente alimentado na cobaia No. 2096 (*Experiencia 12*). Depois de cheias, 12 exemplares foram lavados convenientemente, inoculados na mesma cobaia que acabavam de picar, isto é, a cobaia No. 2177. Esta não apresentou reacção característica, porém morreu no 14.º dia, não mostrando, na necropsia, lesões typicas e sendo negativa a pesquisa de *Rickettsia* no peritoneo.

Experiencia 19 — *Cobaia No. 2178* — Inoculada em 21-IX-934 com emulsão de 12 larvas (do mesmo lote da experiência anterior) que, 24 horas antes se haviam alimentado na cobaia No. 2149 infectada (correspondia á 214a. passagem da amostra L do virus) estando no 3.º dia de reacção febril e 5.º da inoculação do virus (1 cc. de sangue da cobaia No. 2123).

Esta experiência teve em vista completar o estudo do prazo em que o virus pode perdurar ainda virulento no organismo dos percevejos (*Experiencias 12 e 13*).

A cobaia não teve reacção característica do virus, porém infecção por uma *Salmonella*, confirmada pela cultura e passagem de 1 cc. de sangue para a cobaia No. 2245, que morreu em 24 horas.

Mesmo assim, após longo periodo em que apresentou (devido provavelmente á infecção intercorrente) reacção febril, foi, em 5-XI-934, inoculada com o virus (1 cc. de sangue da cobaia No. 2304), morrendo na noite do 4.º para o 5.º dia, tendo tido no 3.º dia 40º. A infecção intercorrente prejudicou qualquer conclusão, sobre esta prova de immuniidade.

Assim sendo, resumindo as experiencias da 2.ª serie, podemos dizer que o virus do "typho exanthematico" de S. Paulo, existente nas larvas de percevejos após se encherem de sangue de um coelho ou cobaia infectados (*Experiencia 12*), já não se mostrou activo após 48 horas (*Experiencia 13*), não provocando sequer immuniidade do animal; o mesmo aconteceu após prazos maiores.

3.ª SERIE — Nesta serie foram usadas nymphas e adultos creados no laboratorio. Os exemplares haviam sido utilizados em experiencias da serie anterior, tendo já decorrido 33 dias após a ultima alimentação. Alguns exemplares foram inoculados antes de serem novamente infectados para as experiencias desta serie.

Todos os exemplares restantes foram infectados por alimentação em cobaia infectada. Decorridas 24, 48 e 72 horas, assim como 13 dias, foram inocula-

(*) Agradecemos a S. Calazans o auxilio prestado no estudo e identificação das culturas insuladas.

das cobaias com emulsão de fezes accumuladas nos 3 primeiros prazos; da mesma forma foi inoculada emulsão de percevejos decorridos os prazos referidos, ao mesmo tempo que lotes separados foram alimentados em cobaias normaes, sendo as alimentações dos respectivos lotes repetidas em dias successivos. Finalmente, foram feitas provas de immuniidade para confirmação dos resultados obtidos.

Cobaia No. 2264 — Inoculada em 17-X-934 com 1 cc. de sangue da cobaia No. 2251 (correspondente á 215a. passagem da amostra L do nosso virus). Apresentou após incubação de 3 dias, reacção febril caracteristica, desde o 4.º dia: 40º0; 41º0 (sendo sangrada e inoculada a cobaia No. 2276 para confirmação da infecção); 40º5 (quando os percevejos desta serie foram nella alimentados); 40º0; 40º0; 40º2; 40º0; 39º8; 39º1; 39º6; 38º8 e morte na noite de 31 para 1-XI-934. A cobaia No. 2276 teve infecção caracteristica com passagem e consequente infecção typica para a cobaia No. 2297; desta para a cobaia No. 2309, sendo continuadas as passagens do virus. Os percevejos foram alimentados na cobaia No. 2264, no 3.º dia de reacção febril (40º5) e 6.º da inoculação, em 23-X-934.

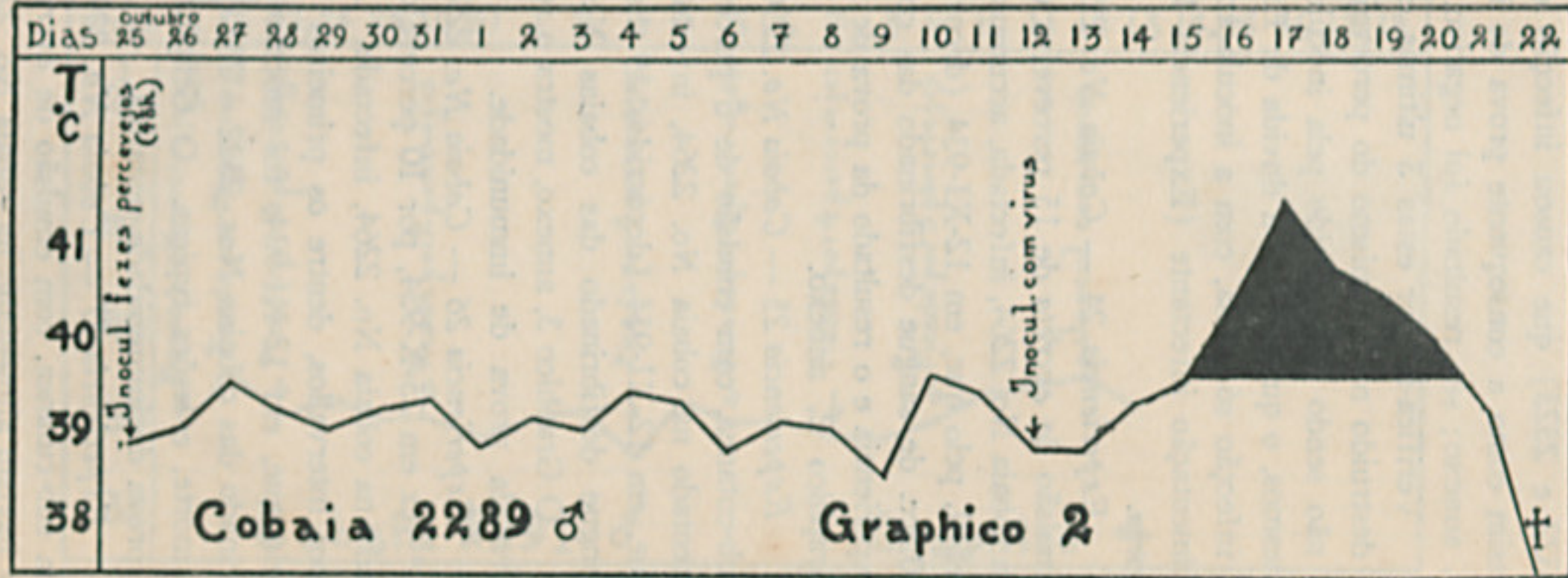
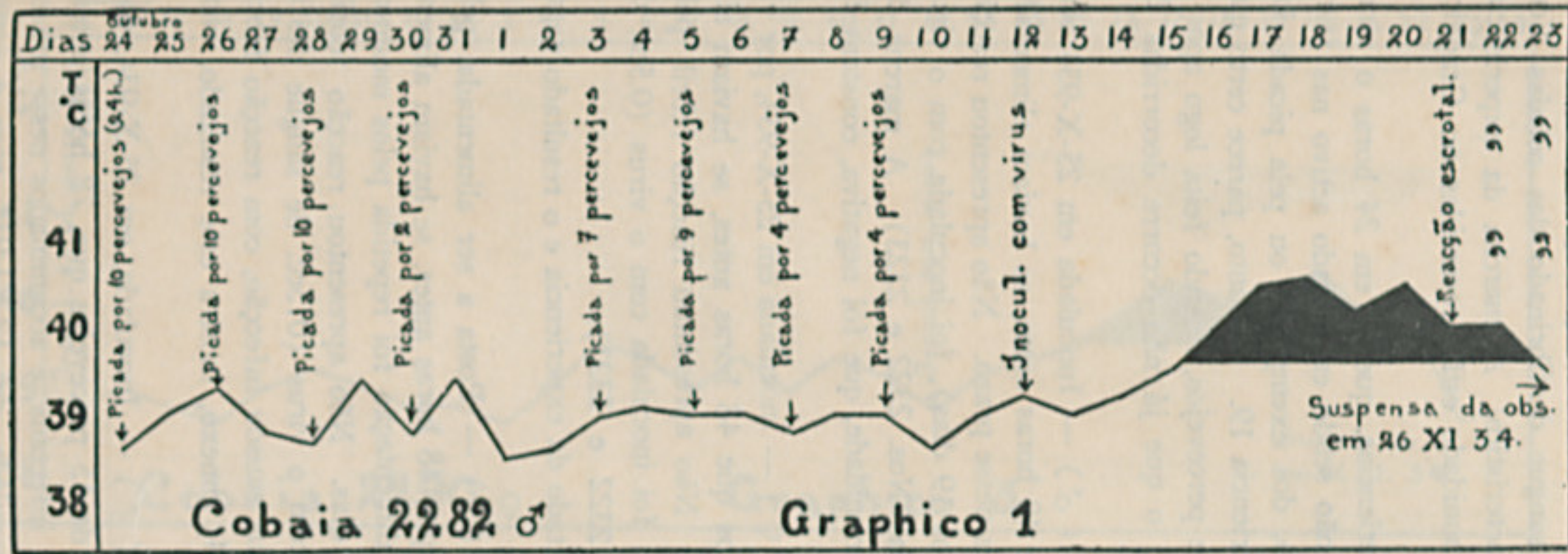
Experiencia 20 — *Cobaia No. 2279* — Inoculada em 23-X-934 com emulsão de 6 percevejos (após conveniente lavagem em alcool e agua physiologica) do lote a ser usado nesta serie, antes da alimentação infectante. Não apresentou qualquer reacção, porém amanheceu morta em 8-XI-934, sendo registada a presença de *Toxoplasma* em esfregaços da raspagem da parede peritoneal.

Experiencia 21 — *Cobaia No. 2280* (♀) — Inoculada por via sub-cutanea, em 24-X-934, com emulsão de excreta de 15 percevejos que, 24 horas antes se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada, e accumulados nesse prazo no tubinho em que se achavam. Não apresentou qualquer reacção caracteristica, pelo que, em 12-XI-934 (decorridos 20 dias), foi inoculada com o virus (0,5 cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323), apresentando, após incubação de 4 dias, reacção febril durante 4 dias (40º5; 40º2; 40º0; 39º8), resistindo porém e sendo suspensa da observação em 24-XI-934.

Foi negativa, portanto, a prova de immuniidade, o que mostra a não existencia do virus nos excretas, nesse periodo, pelo menos em quantidade capaz de provocar a immuniidade do animal inoculado.

Experiencia 22 — *Cobaia No. 2281* (♀) — Inoculada, em 24-X-934, por via sub-cutanea, com emulsão de 5 percevejos que, 24 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. Não apresentou qualquer reacção caracteristica durante 20 dias de observação, pelo que, em 12-XI-934, foi inoculada com o virus (0,5 cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323); morreu, accidentalmente na noite deste dia, porem, pela necropsia, nenhuma lesão apresentava (baço de aspecto normal).

Experiencia 23 — *Cobaia No. 2282* (♂) — Posta a ser alimentada, em 24-X-934, por 10 percevejos que, 24 horas antes se haviam alimentado na



cobaia No. 2264, infectada. Os mesmos percevejos se alimentaram nella novamente em dias diversos. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 12-XI-934, foi inoculada com o virus (0.5 cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323) que causou infecção característica. A marcha da experiencia, assim como a consequente prova de immuniidade estão resumidas no Graphico 1, annexo; seu resultado foi negativo.

Verifica-se por estas 3 ultimas experiencias, que já em 24 horas o virus é destruido no organismo do percevejo, não sendo encontrado activo nas fezes e não sendo transmittido pela inoculação, dos exemplares ou pela picada dos mesmos, o que levanta a duvida da Experiencia 19. Portanto, parece certo que a infecção só se dá, com a inoculação de percevejos, quando feita logo após a alimentação infectante (Experiencia 12), o que já não ocorre decorridas 24 horas.

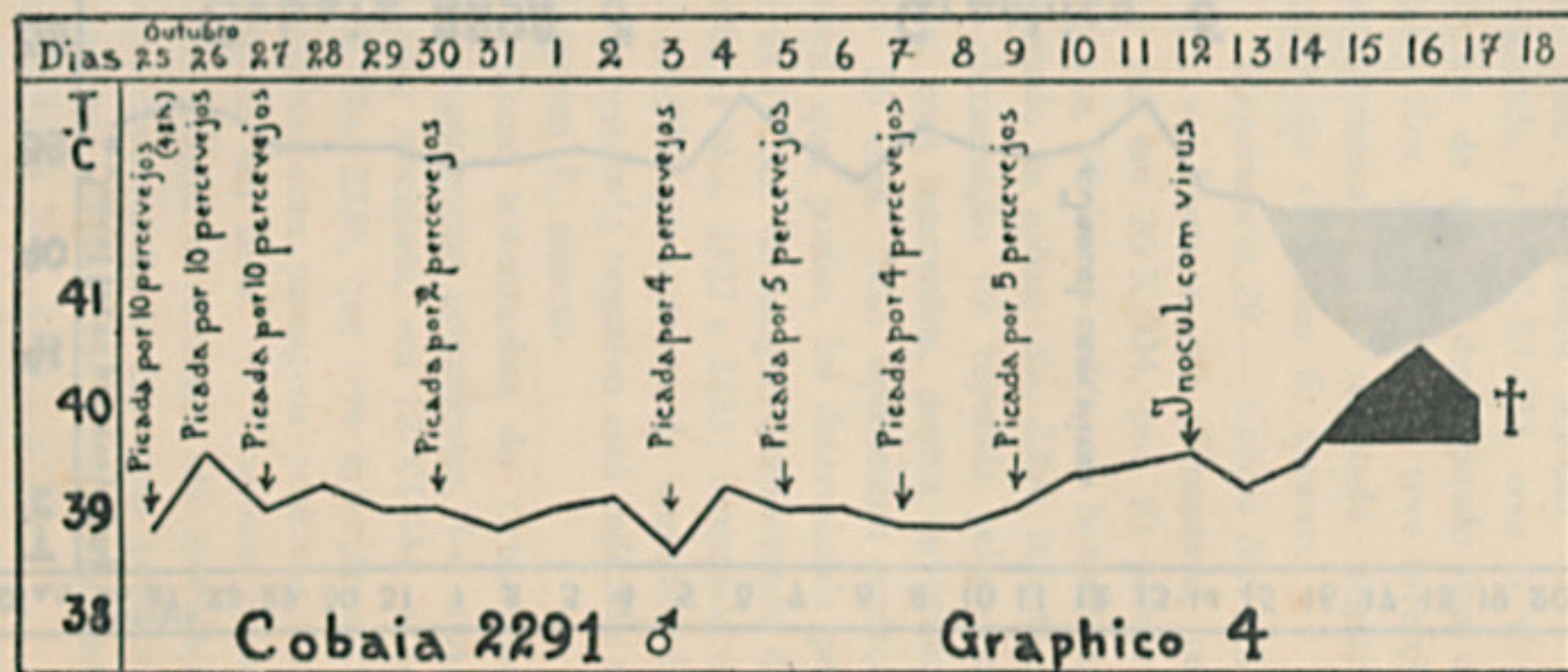
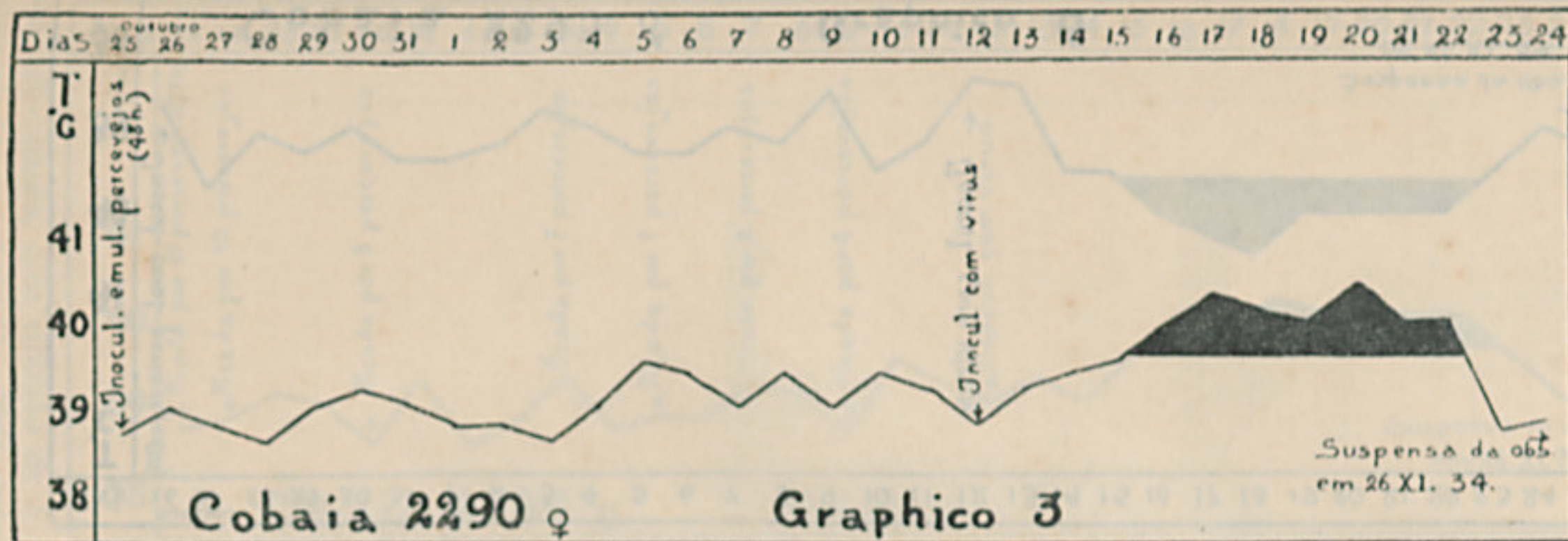
Experiencia 24 — Cobaia No. 2289 (♂) — Inoculada em 25-X-934 com emulsão de *excreta* de 15 percevejos que 48 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada, accumulados nesse prazo. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 12-XI-934 (decorridos 19 dias), foi inoculada com o virus (0.5cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323). A marcha da experiencia e o resultado da prova de immuniidade, que foi negativa, constam do Graphico 2, annexo.

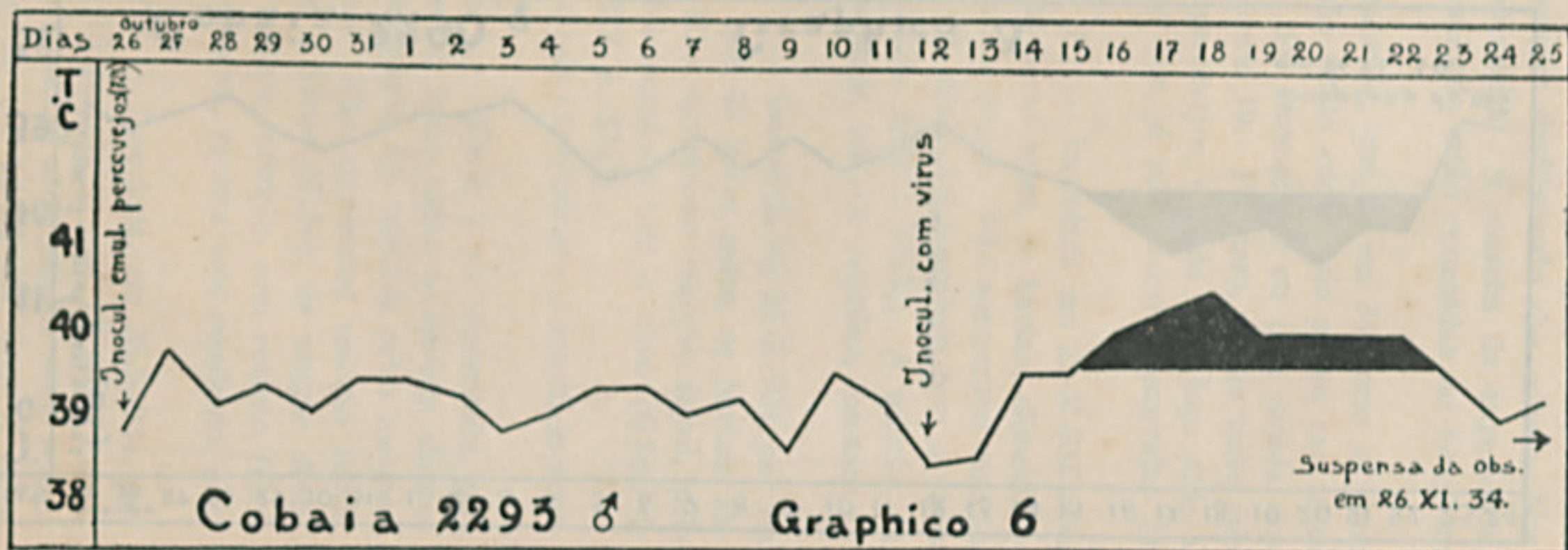
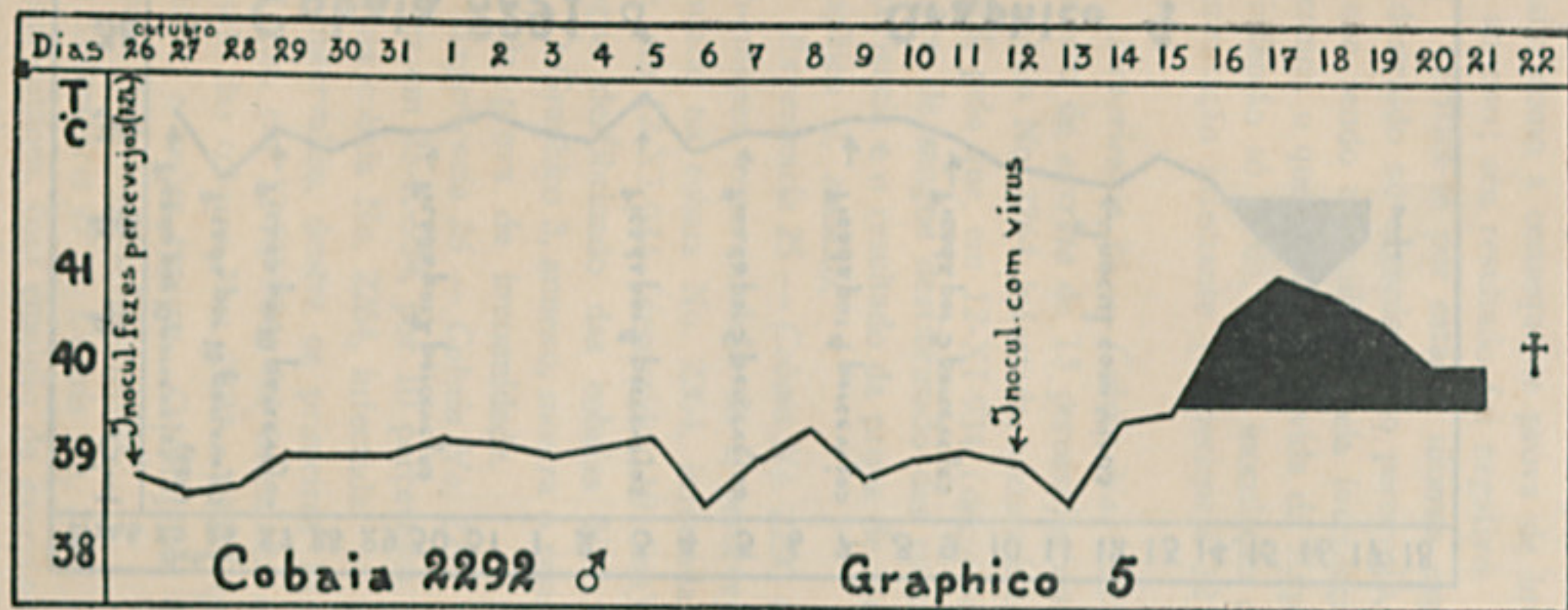
Experiencia 25 — Cobaia No. 2290 (♀) — Inoculada em 25-X-934, por via sub-cutanea, com emulsão de 5 percevejos que 48 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 12-XI-934 (decorridos 19 dias), foi inoculada com o virus (0.5cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323).

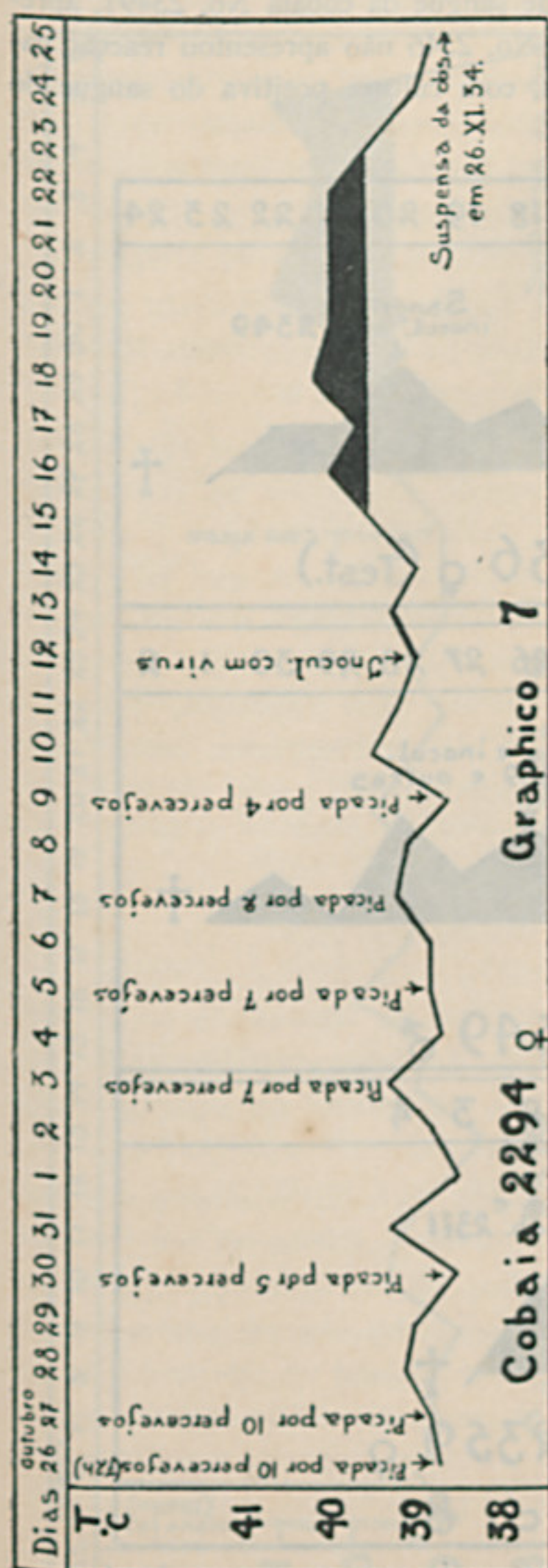
O Graphico 3, annexo, mostra o resultado da experiencia e o resultado negativo da prova de immuniidade.

Experiencia 26 — Cobaia No. 2291 (♂) — Posta a ser alimentada, pela 1.^a vez em 25-X-934, por 10 percevejos que, 48 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. A alimentação foi repetida pelos mesmos, com intervallos, dentre os primeiros 18 dias. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 12-XI-934, foi inoculada com o virus (0.5cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323) que causou infecção, com reacção febril e morte, e lesões typicas. O Graphico 4, annexo, mostra este resultado, com a prova de immuniidade negativa.

Experiencia 27 — Cobaia No. 2292 (♂) — Inoculada, em 26-X-934, por via sub-cutanea, com emulsão de *excreta* de 15 percevejos que, 72 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada, e accumulados nesse prazo. Não apresentou reacção febril, sendo inoculada, em 12-XI-934, com o virus (0.5cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323), que provocou infecção característica. O resultado negativo da experiencia está exposto no Graphico 5, annexo.







Experiencia 28 — Cobaia No. 2293 (♂) — Inoculada, em 5-XI-934, por via sub-cutanea, com emulsão de 5 percevejos que, 72 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. Não apresentou reacção febril e, inoculada, em 12-XI-934, com o virus (0.5cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323), teve infecção característica. Este resultado negativo consta do Graphico 6, anexo.

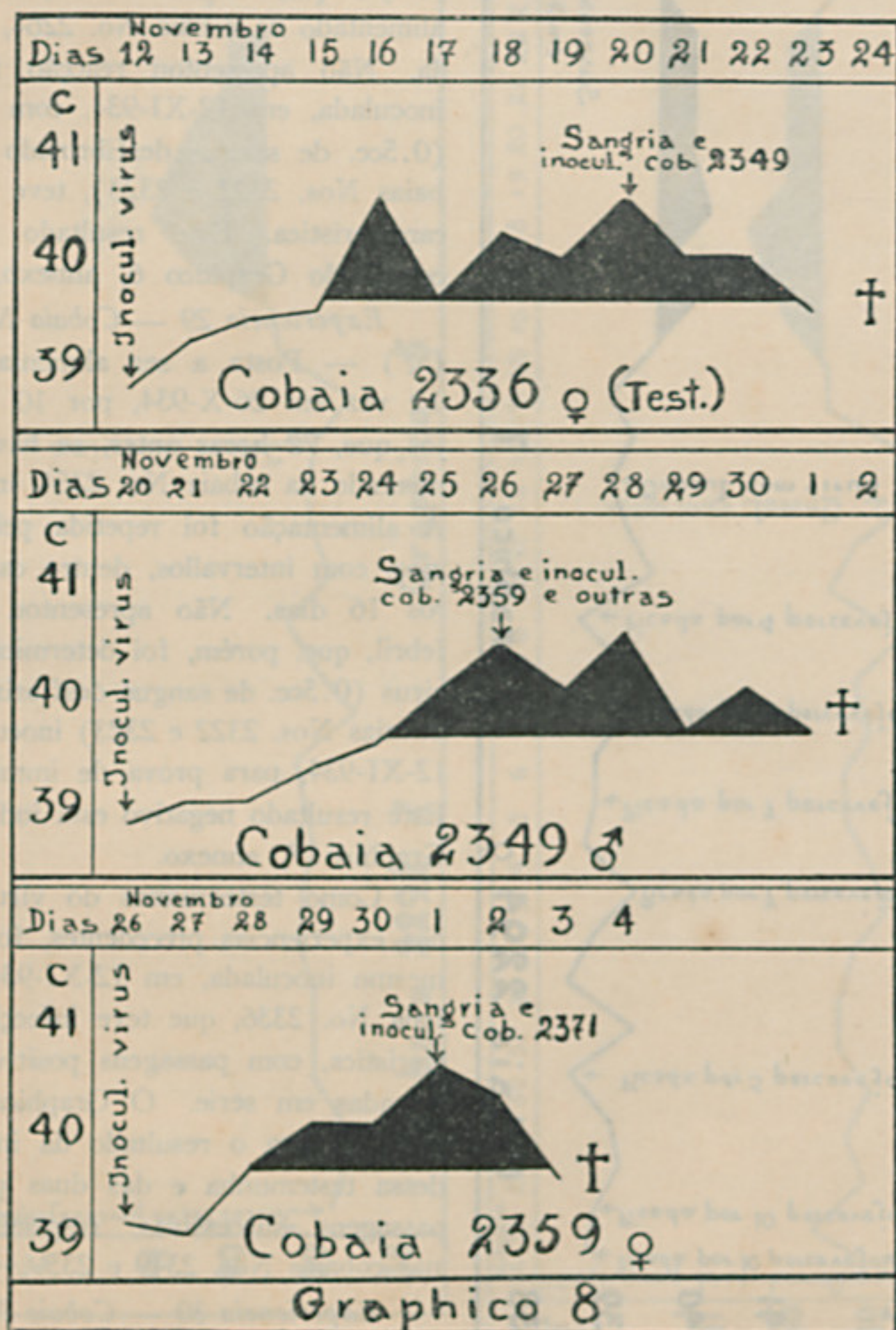
Experiencia 29 — Cobaia No. 2294 (♀) — Posta a ser alimentada, pela 1.^a vez em 26-X-934, por 10 percevejos que, 72 horas antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. A alimentação foi repetida pelos mesmos, com intervallos, dentre os primeiros 16 dias. Não apresentou reacção febril, que, porém, foi determinada pelo virus (0.5cc. de sangue desfibrinado das cobaias Nos. 2322 e 2323) inoculado em 12-XI-934, para prova de immuniidade. Este resultado negativo está indicado no Graphico 7, anexo.

Como testemunhas do virus usado nas experiencias precedentes, foi com o mesmo inoculada, em 12-XI-934, a cobaia No. 2336, que teve infecção característica, com passagens positivas, continuadas em serie. O Graphico 8, anexo, mostra o resultado da inoculação dessa testemunha e das duas primeiras passagens successivas, respectivamente, nas cobaias Nos. 2349 e 2359.

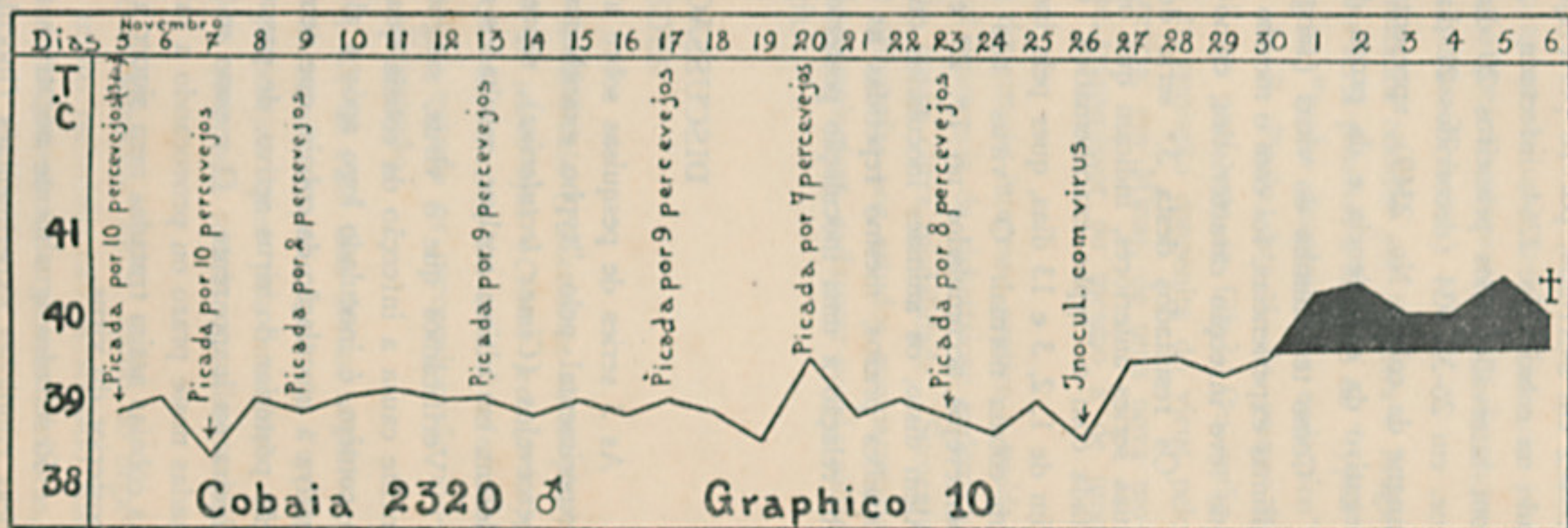
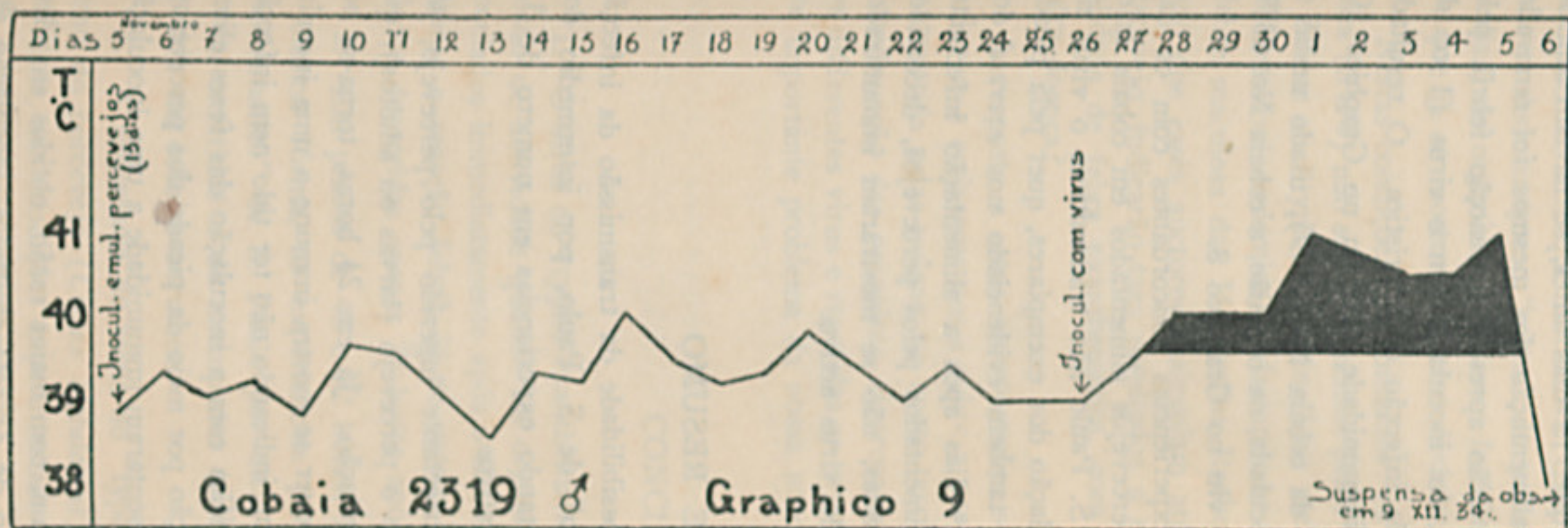
Experiencia 30 — Cobaia No. 2319 (♂) — Inoculada, em 26-X-934, por

via sub-cutanea, com emulsão de 5 percevejos, que, 13 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. Não apresentou reacção; apenas 1 dia verificou-se a temperatura de 40°0. Foi sangrada no 12.^o dia, em 17-XI-934, e 1 cc. de sangue inoculado na cobaia No. 2346. Em 26-XI-934 (decorridos

21 dias) foi inoculada com o virus (1 cc. de sangue da cobaia No. 2349), apresentando infecção característica. A cobaia No. 2346 não apresentou reacção característica, tendo tido alguns surtos febris, com cultura positiva do sangue do



coração, o que os justificou. Seu sangue foi passado para a cobaia No. 2370 que, sacrificada no 6.º dia, com 39º6, não mostrou lesões, sendo negativa a pesquisa de Rickettsias no peritoneo. Foi, portanto, negativo o resultado da experiencia e da prova de immuidade, resumidas no Graphico 9, annexo.



Experiencia 31 — Cobaia No. 2320 (♂) — Posta a ser alimentada, pela 1.^a vez em 5-XI-934, por 10 percevejos que, 13 dias antes, se haviam alimentado na cobaia No. 2264, infectada. A alimentação dos mesmos foi renovada, com intervallos, nos primeiros 20 dias. Não apresentou reacção febril, pelo que, em 26-XI-934 (decorridos 21 dias), foi inoculada com o virus (1 cc. de sangue da cobaia No. 2349), apresentando infecção característica. O resultado negativo da experiencia e da prova de immuniidade figuram no Graphico 10.

Como testemunha do virus (sangue da cobaia No. 2349), usado nestas 2 ultimas experiencias, foi com o mesmo inoculada, na occasião, a cobaia No. 2359, que teve infecção característica, como se viu no Graphico 8.

Os resultados desta 3.^a serie de experiencias concordantes com os das duas series anteriores, indicam que os percevejos alimentados em cobaia infectada com o "typho exanthematico" de S. Paulo não transmittem o virus no fim de 1, 2, 3 e 13 dias, quer pela inoculação dos exemplares, quer pela picada em cobaia normal. O "virus" não foi tambem evidenciado nos *excreta* dos percevejos accumulados no 1.^o, 2.^o e 3.^o dias após a alimentação infectante. Além disto, os animaes inoculados ou alimentados pelos percevejos, decorridos aquelles prazos, mesmo repetidas as picadas, não se mostraram immunizados em relação a uma inoculação posterior do virus activo.

DISCUSSÃO E RESUMO

As 3 series de pesquisas sobre a possibilidade da transmissão da infecção experimental pelo "typho exanthematico" de S. Paulo, por intermedio dos percevejos (*Cimex lectularius*), representando experiencias em numero de 31, deram, em ultima analyse, resultados negativos.

Verificámos que o virus, sangue infectante ingerido pelo percevejo, sómente causa a infecção da cobaia quando o percevejo (larvas ou adultos), que o contém, é inoculado logo após a alimentação. Já em 24 horas, torna-se negativa a inoculação da cobaia, que nem sequer se mostra immune a uma inoculação posterior do virus activo, de passagem, indicando não ter tido nem infecção ligeira ou inapparente. O mesmo se verifica com a inoculação das fezes eliminadas nesse prazo ou provocando a infecção por meio da picada dos percevejos; as cobaias assim tratadas nem sequer apresentaram immuniidade a uma inoculação posterior do virus.

Resultados igualmente negativos foram, com maior razão, obtidos em identicas condições experimentaes (inoculação de *excreta* emittidos, inoculação dos exemplares triturados ou pela picada) em prazos maiores, de 48 e 72 horas, 5, 10, 13 e mais dias após a alimentação infectante dos percevejos.

Diante dos resultados citados de Castaneda e Zinsser (1) com o "typho mexicano" e dos que obtivemos com o "typho exanthematico" de S. Paulo, pode-se deduzir que o "virus" do primeiro apresenta uma certa resistencia (até 10 dias) no organismo do *Cimex lectularius*, o que não acontece com o do segundo, que já se mostrou inactivo decorridas apenas 24 horas.

Nestas condições, perguntamos: os resultados obtidos por Moreira e Magalhães (3 e 4) não serão elementos pelos quaes seria possível a filiação do "typho" de Minas ao "typho mexicano" ou melhor ao "typho americano ou endemico" (Rickettsiose endemica), afastando-se do de S. Paulo, isto é, do grupo da "febre maculosa das Montanhas Rochosas", ao qual este se filia? Ou então: dado que esses auctores assignalam até a transmissão congenita do virus pelo percevejo, indicarão taes resultados a existencia, em Minas, de uma nova modalidade de febre exanthematica, com este transmissor ou mesmo a de uma outra doença?

A resposta a estas interrogações será de grande interesse pratico e epidemiologico e esclarecer-nos-á sobre a provavel existencia da rickettsiose endemica, transmittida pelas pulgas, no nosso territorio, ou de outra modalidade. Somente a continuação das pesquisas, rigorosamente orientadas por estudos comparativos dos differentes virus e repetidas as provas immunologicas, esclarecer-nos-ão sobre este importante problema da nossa nosologia.

CONCLUSÕES

1. O virus do "typho exanthematico" de S. Paulo (rickettsiose neotropica) dotado de actividade quando no organismo de percevejos (*Cimex lectularius*), inoculados immediatamente após a alimentação dos mesmos em animal infectado, durante a reacção febril, já se mostra inactivo quando os percevejos são inoculados decorridas apenas 24 horas após a alimentação.
2. Em prazos de 48 e 72 horas, 5, 10, 13, 16 e 25 dias foram negativas, da mesma forma, as experiencias para transmissão experimental do "typho exanthematico" de S. Paulo por meio de percevejos, quer pela inoculação de excreta emittidos e de exemplares triturados, quer pela picada ou alimentação repetida em cobaias normaes.
3. A resistencia do virus do "typho exanthematico" de S. Paulo no organismo do percevejo (*Cimex lectularius*) é muito reduzida, não persistindo sua actividade, nas condições experimentaes descriptas, siquer 48 e mesmo 24 horas, após a alimentação infectante.

ABSTRACT

A series of 31 experiments made with bed-bugs to find out if these insects could carry the S. Paulo spotted fever has brought to light the following facts:

1. The virus of the S. Paulo spotted fever is active in the body of bed-bugs (*Cimex lectularius*) only when these insects are inoculated immediately following their feeding on an infected animal and during its febrile reaction; it proves, however, to be inactive when the bed-bugs are inoculated 24 hours after their feeding.

2. All the experiments were negative when the experimental transmission of that infection was attempted 48 and 72 hours or 5, 10, 13, 16 and 25 days later, with bed-bugs, either by means of their sting and of their repeated feeding on normal guinea-pigs.

3. The resistance of the S. Paulo virus in *Cimex lectularius* is very low, its infective power not persisting even for 25 hours following an infecting feeding of this bed-bug under the experimental conditions described in the text.

BIBLIOGRAPHIA

1. Castaneda, R. & Zinsseer, H. — Studies on typhus fever. III. Studies of lice and bed-bugs (*Cimex lectularius*) with Mexican typhus fever — J. Exper. Medicine LII (5):661.1930.
2. Monteiro, J. Lemos; Fonseca, F. da & Prado, A. — Pesquisas epidemiologicas sobre o «typho exanthematico» de S. Paulo. VII. Pesquisa do virus em alguns arthropodos sob condições naturaes — Brasil Medico XLVI(8):169.1932; Mem. Inst. Butantan VI:137.1931.
3. Moreira, J. A. & Magalhães, O. — Typho exanthematico em Minas Geraes — Brasil Medico XLVII(34):599.1933.
4. Moreira, J. A. & Magalhães, O. — Typho exanthematico em Minas Geraes — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XXVIII(2):225.1934.

(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado em dezembro de 1934. Dado á publicação em abril de 1935).