

## PESQUISAS EPIDEMIOLOGICAS

### SOBRE O TYPHO EXANTHEMATICO DE SÃO PAULO

POR

J. LEMOS MONTEIRO, F. DA FONSECA E ALCIDES PRADO

#### I

#### Possibilidade da transmissão experimental do virus por *Ixodidae*

Como consequencia do interesse ultimamente observado pelo typho exanthematico, appareceram na literatura deste anno varios trabalhos referentes á possibilidade de infecção, natural ou experimental, de carrapatos com virus de varias das modalidades dessa molestia.

Depois dos trabalhos fundamentaes que demonstraram ser a febre das Montanhas Rochosas transmittida por Ixodideos e de verificação semelhante feita sobre uma infecção dos ruminantes (heart-water), a primeira demonstração da transmissão de infecções deste grupo por carrapato foi dada, no corrente anno, por Paul Durand e E. Conseil (1), no Instituto Pasteur de Tunis, ficando provado que o virus da febre botonosa se encontra no *Rhipicephalus sanguineus* Latr., carrapato muito commum, e, que, capturado sobre o cão, triturado e inoculado no homem, reproduz a infecção. Verificaram ainda estes pesquisadores que o virus pode permanecer varias semanas no *Rhipicephalus sanguineus*.

Ainda este anno verificaram Georges Blanc e J. Caminopetros (2) que a infecção é transmittida hereditariamente pela fema do *Rhipicephalus sanguineus* á sua prole, sendo infectantes, não só os ovos, como as larvas delles oriundas, verificação esta da mais alta importancia para a epidemiologia da infecção, pois vinha mostrar a desnecessidade do contacto do carrapato infectante com o doente, a possibilidade de grande propagação da infecção, bem como a possibilidade da persistencia do virus em determinadas regiões, mesmo na ausencia de doentes.

Charles Joyeux e J. Pieri, finalmente (3), acabam de verificar que o *Rhipicephalus sanguineus* pode conservar durante lapso de tempo relativamente

longo o virus da febre exanthematica mediterranea, ainda se mostrando infectante depois de hibernar durante uma parte do anno.

Não só em relação á forma mediterranea do typho exanthematico possuímos hoje dados sobre o papel desempenhado pelos carrapatos; tambem os temos sobre o typho endemico norte-americano. Hans Zinsser e Ruiz Castaneda (4) conseguem infectar experimentalmente carrapatos (*Dermacentor nitens*, *Dermacentor andersoni* e *Amblyomma* sp.) com o virus e transmittir a infecção a animaes de laboratorio, verificando que os carrapatos podem permanecer infectados durante o lapso de 14 dias.

Experiencias negativas não têm, certamente, faltado. Mooser e Dummer (5), trabalhando com o typho dos Estados do Atlantico do Sul, não conseguiram infectar, fazendo-os sugar cobaias doentes, os seguintes carrapatos: *Amblyomma americanum*, *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodoros talaje* e *Ornithodoros turicata*.

Interessado o Instituto Butantan, na pesquisa da modalidade paulista do "typhus", que nelle vem sendo estudado desde o inicio de 1931 por um dos signatarios do presente trabalho, decidimos emprehender algumas experiencias no sentido de verificar si os *Ixodidae* tambem são sensiveis ao virus brasileiro, que sob muitos aspectos differe do europeu e mesmo do norte-americano.

O presente trabalho representa o relatorio das verificações emprehendidas.

### Technica empregada

Utilizámos nestas pesquisas *Ixodidae* pertencentes á sub-familia *Argasinae*: o *Ornithodoros rostratus* Aragão e o *Argas persicus* (Oken) e á sub-familia *Ixodidae*: o *Amblyomma cajennense* (Fabr.).

A technica seguida para a inoculação dos carrapatos constou de lavagem em solução physiologica dos exemplares a utilizar, trituração destes em gral com solução isotonica, filtração através de gaze e consecutiva inoculação na cavidade peri-oneal de cobaias. As experiencias de picadas foram feitas com numerosas larvas de *Amblyomma cajennense* collocadas sobre cobaias cujos pelos do dorso tinham sido previamente raspados e deixadas para sugar por espaço de 2 dias, quando se colheram os exemplares, cheios ou não, aliás encontrados em numero reduzido. As experiencias de picada com *Ornithodoros rostratus* foram acompanhadas de perto durante todo o tempo, o que é facil, sabido como é que este *Ixodida* suga rapidamente, abandonando o hospedeiro em 1 ou 2 horas, mais ou menos (figs. 1 e 2). As cobaias que serviram á infecção dos carrapatos achavam-se sempre em plena phase de reacção febril.

A verificação da immunidade, praticada em todas as cobaias, era feita sempre com testemunhas normaes, que, sem excepções, funcionaram regularmente.

Praticava-se essa prova depois de submeter as cobaias em experiencias a rigoroso controle, durante pelo menos 20 dias, constando de curva thermica traçada durante todo o periodo de observação e verificação do apparecimento de reacção escrotal e passagem do virus para novo animal, no caso de reacção febril. Depois de decorrido o necessario lapso de tempo, eram os animaes em experiencias submettidos á prova de immuniidade, inoculando-se-lhes emulsão de cerebro de cobaias seguramente infectadas com o virus, em dose perto de 1000 vezes superior á necessaria para determinar a infecção de cobaias normaes, controlando-se a inoculação, como já ficou dito, com varias testemunhas. A observação era então proseguida nos mesmos moldes já citados até a morte do animal ou durante lapso de tempo sempre superior a 1 mês, quando estes sobreviviam. Morto o animal, era necropsiado, verificando-se as dimensões do baço e a existencia de derrames cavitarios, fazendo-se a pesquisa de ricketisias no raspado do peritoneo e conservando-se material para exame histo-pathologico, bem como para verificação parasitologicas e bacteriologicas, sempre que havia suspeita de infecção concomitante.

Ao iniciar estas experiencias, fizemos inoculação de 6 *Amblyomma cajennense* normaes, capturados sobre cavallos do Instituto, em uma cobaia, para verificar si a inoculação deste material provocava, nos animaes inoculados, alguma reacção que pudesse perturbar as observações. Não sendo verificada reacção alguma, febril ou outra, durante 25 dias, foi esta testemunha submettida á infecção com material de *Silenus rhesus* (syn. *Macacus rhesus*) infectado, reagindo typicamente ao cabo de 6 dias.

### Parte experimental

Para maior clareza, dividimos as experiencias que realizámos segundo o material utilizado e o fim que se tinha em vista.

- 1) Experiencias com *Amblyomma cajennense* (Fabr.).
  - a) Receptividade ao virus
  - b) Poder infectante das fezes.
  - c) Transmissão hereditaria do virus.
- 2) Experiencias com *Argas persicus* (Oken).
- 3) Experiencias com *Ornithodoros rostratus* Aragão.
  - a) Receptividade ao virus.
  - b) Transmissão por picada.
  - c) Duração do poder infectante.
  - d) Poder infectante do liquido coxal.

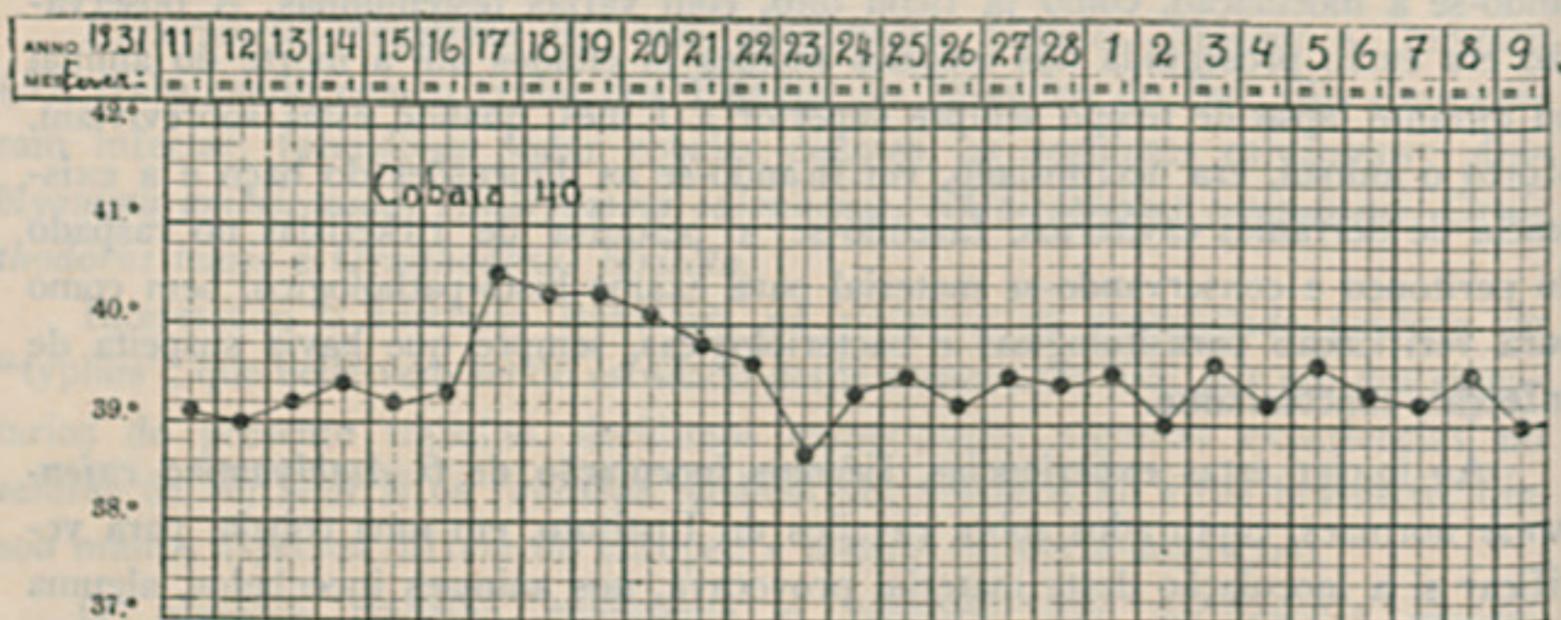
1) Experiencias com *Amblyomma cajennense* (Fabr.)

Os exemplares de *Amblyomma cajennense* utilizados nas experiencias foram obtidos de cavallos do Instituto, onde são frequentes.

a) Receptividade do *Amblyomma cajennense*.

Foram feitas 3 tentativas de infecção, inoculando-se 2, 3 e 1 exemplares de *A. cajennense*, respectivamente nas cobaias 39, 40 e 97, os quaes tinham sido alimentados havia 11, 13 e 60 dias na cobaia infectada n.º 19.

Destas apenas reagiu, mostrando-se infectada, a cobaia n.º 40, que apresen-



Graphico 1

tuou reacção typica do 6.º ao 10.º dia após a inoculação dos carrapatos, como se verifica pelo graphico n.º 1, tendo-se mostrado, além disso, immune a uma segunda inoculação, em dose seguramente infectante do virus, praticada 1 mês após a primeira. As cobaias 39 e 97 morreram, respectivamente, 5 e 1 dia após a inoculação dos carrapatos, o que prejudicou a observação.

Ficou assim demonstrado que o *Amblyomma cajennense*, alimentado em cobaia infectante em periodo febril, pode conservar em seu organismo, pelo espaço de 13 dias pelo menos, o germe do typho exanthematico de São Paulo. Que se trata, não de simples conservação do virus no organismo do carrapato, mas de verdadeira infecção do acariano, demonstra-o a experiencia c), bem como o facto de ser provavelmente insufficiente a dose de sangue ingerida pelo acariano para provocar infecção na cobaia.

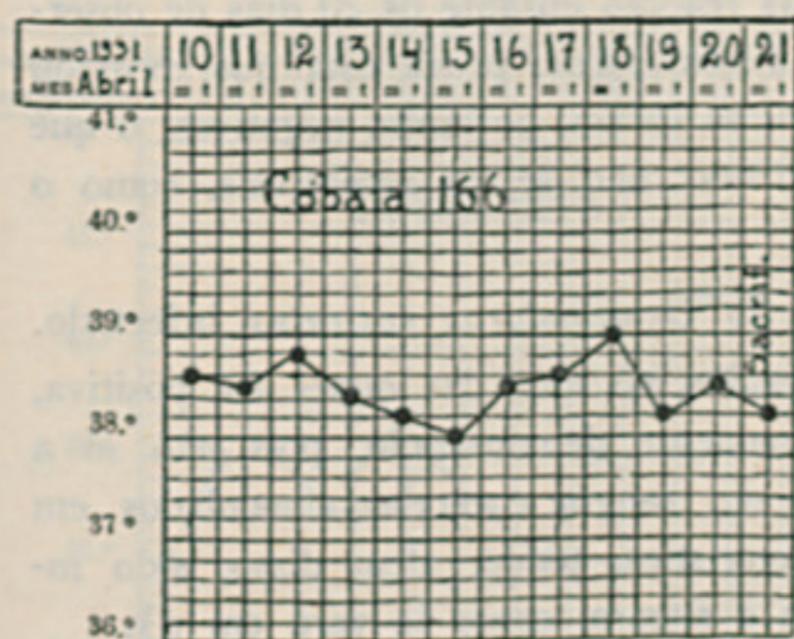
b) Poder infectante das fezes do *Amblyomma cajennense*.

Com o fim de verificar si o virus não só permaneceria no organismo, mas si era tambem eliminado com os excreta, foi feita uma experiencia nos moldes habituaes, aproveitando-se fezes emittidas nos 3 primeiros dias que se seguiram á infecção do Ixodida, tendo sido negativos os resultados. O pequeno prazo decorrido entre a ingestão do sangue e o periodo em que puderam ser colhidas as fezes, porém, não auctoriza a conclusão alguma sobre a passagem do virus pelas fezes.

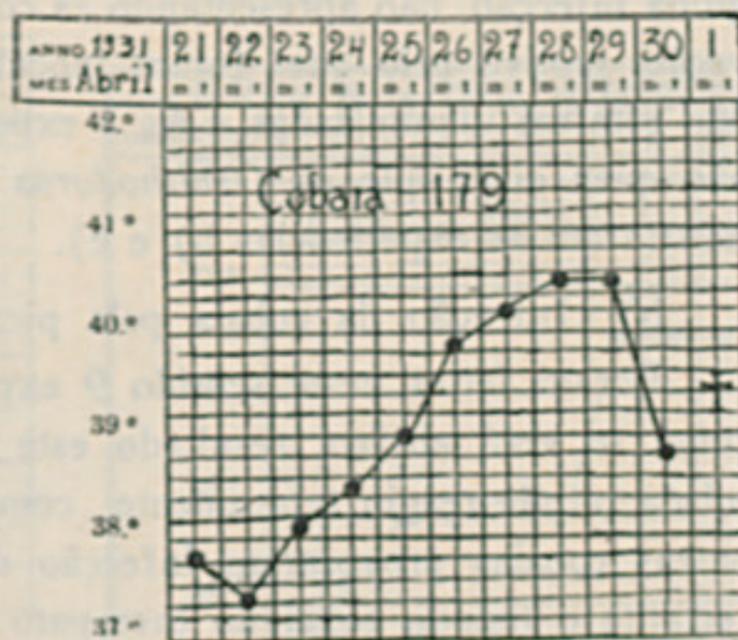
c) Transmissão hereditaria da infecção ás larvas do *Amblyomma cajennense*.

Para verificar si a prole dos carrapatos submettidos á refeição infectante adquire hereditariamente a infecção, como succede frequentes vezes em outras parasitoses, instituiram-se 5 experiencias, das quaes 3 com inoculação na cavidade peritoneal de larvas provenientes de exemplar de *Amblyomma* infectado e 2 expondo cobaia normaes ás picadas das larvas.

A unica experiencia positiva foi a feita com a cobaia n.º 166, inoculada com emulsão de 10 larvas provenientes de ovos postos por uma femea de *Amblyomma* infectada na cobaia 19, cerca de 2 meses antes, larvas estas que já haviam sido alimentadas em cobaia normal. A cobaia 166 não apresentou reacção até 11 dias depois de inoculada, o que nos levou a sacrificar-a, inoculando a emulsão de seu cerebro na cobaia 179, a qual, ao cabo de 5 dias, reagiu typica-



Graphico 2



Graphico 3

mente, apresentando curva febril durante 4 dias, cahindo em crise e morrendo no 10.º dia após a inoculação. Mostram os graphicos 2 e 3 o decurso desta experiencia, na qual a cobaia inoculada com as larvas apresentou infecção inapparente, como sóe ás vezes acontecer, e a cobaia de passagem 179 teve reacção característica.

Das experiencias com larvas de *Amblyomma cajennense* oriundas de femeas alimentadas em cobaias infectadas verificou-se, pois, ser possivel a transmissão hereditaria do virus, não tendo, todavia, sido possivel obter infecção de cobaias pela picada de grande numero de larvas. Deixaremos, todavia, por prudencia, resalvada a hypothese de uma contaminação das larvas por fezes infectadas, caso haja eliminação do virus por esses excreta. Por analogia com outras infecções é, porém, mais certa a infecção hereditaria por nós verificada.

## 2) Experiencias com *Argas persicus* (Oken).

Com este Argasineo foi feita apenas 1 experiencia, que constou da alimentação de 2 exemplares em cobaia em periodo febril de infecção, seguida de

trituração dos 2 exemplares, 8 dias após sua alimentação e inoculação em cobaia normal, que não teve reacção e não se mostrou imunizada ao ser feita a prova de immunidade, após 40 dias de observação.

A experiencia, foi, portanto, negativa.

3) Experiencias com *Ornithodoros rostratus* Aragão.

Os exemplares de *Ornithodoros rostratus* Aragão empregados nestas experiencias provinham do Estado de Matto Grosso, tendo sido verificado não estarem infectados com espiroquetas.

a) Demonstração da receptividade do *Ornithodoros rostratus* Aragão.

Nas 3 experiencias que foram instituidas, fazendo-se alimentar 3 *Ornithodoros* em cobaias em periodo infectante e inoculando-se 8, 13 e 18 dias após a alimentação, respectivamente, nas cobaias 244, 292, 285 e 287, não foi conseguida infecção, não apresentando as cobaias reacção durante os 20 dias de observação, motivo pelo qual foram inoculadas com virus, prova esta que mostrou não estarem imunizadas. As 3 experiencias foram, portanto, negativas, o que não quer dizer que os *Ornithodoros rostratus* não sejam receptiveis, como o mostraram as experiencias b) e c).

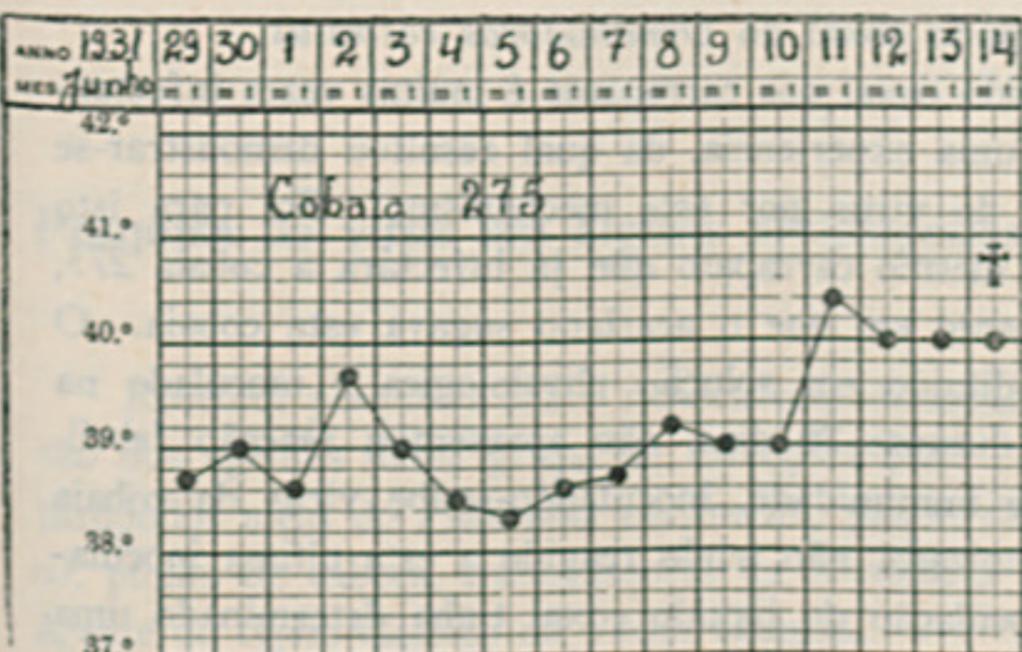
b) Infecção da cobaia pela picada do *Ornithodoros rostratus* infectado.

Foram feitas neste sentido 9 experiencias, só uma das quaes foi positiva, como se verá abaixo, resultado este plenamente demonstrado, pois não só a cobaia picada reagiu typicamente, como o seu sangue e cerebro inoculados em outras cobaias provocaram infecção caracteristica, tendo, alem disso, sido infectante o liquido coxal do carrapato que a sugara, como se verá em d).

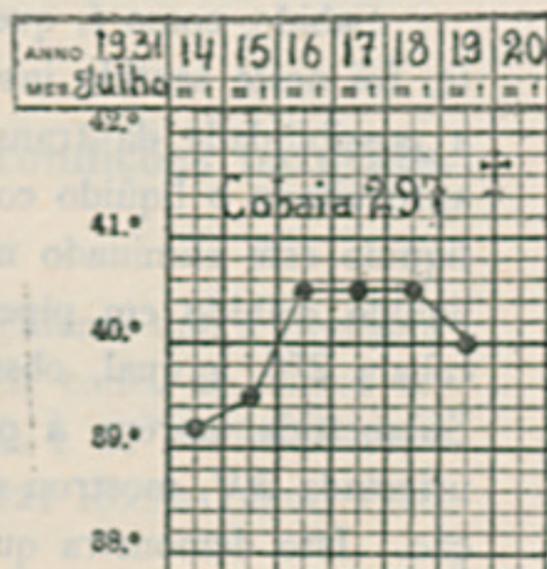
O decurso da experiencia foi o seguinte: um exemplar de *Ornithodoros rostratus* foi alimentado na cobaia 244, em pleno periodo febril; 13 dias depois foi posto sobre a cobaia normal 275, alimentando-se abundantemente, pois pesava antes da refeição apenas 0gr.,05 e depois della 0gr.,25. A cobaia 275 apresentou, 13 dias após a picada infectante reacção typica (graphico 4), morrendo 4 dias após em consequencia de uma sangria feita para passagem do virus. Foi necropsiada, sendo inoculadas as cobaias 297, 298 e 299, aquella com sangue e as duas ultimas com emulsão de cerebro da n.º 275, tendo todas ellas reagido typicamente, como se vê pelos graphics 5, 6 e 7.

Alem desta, foram feitas tentativas de infecção por picada com *Ornithodoros rostratus* que haviam sugado cobaia ou homem doente em numero de dias variavel: 7, 8, 9, 13, 18, 20, 22 e 23 dias utilizando-se para cada experiencia uma nova cobaia, sendo todas submettidas á prova de immunidade. Em todas estas experiencias foi negativo o resultado observado.

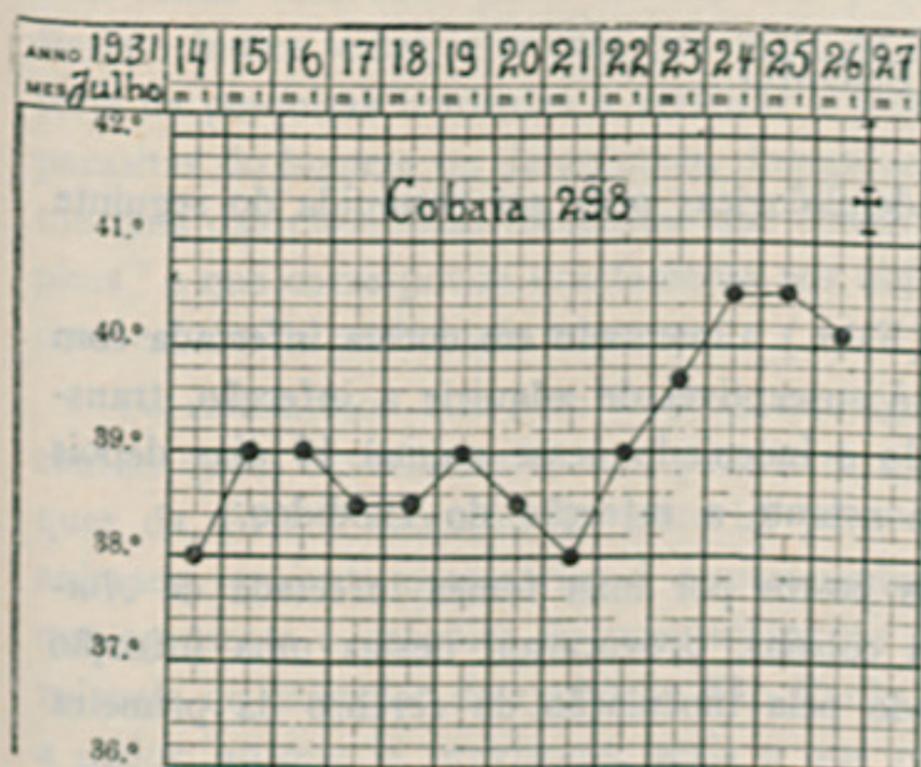
Como se deprehende destas experiencias, a infecção do *Ornithodoros rostratus* é possivel após sua alimentação em cobaia infectante, porém não se dá sempre, sendo menor o numero de casos positivos do que o dos negativos.



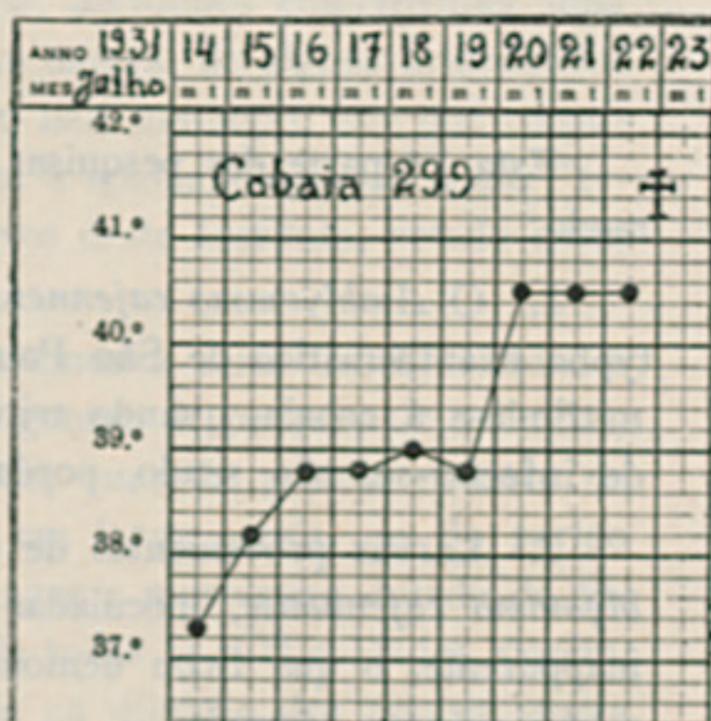
Graphico 4



Graphico 5



Graphico 6



Graphico 7

c) Duração do poder infectante do *Ornithodoros rostratus*.

Com o fim de verificar si o poder infectante é duradouro ou si, ao contrario, é passageiro em *Ornithodoros rostratus*, fez-se o mesmo exemplar, que já infectára a cobaia 275 por picada, 13 dias após a refeição infectante, picar, agora 28 dias depois de se ter infectado, a cobaia 301. Esta ultima cobaia, porém, observada durante 1 mês, nenhum symptoma apresentou de infecção; foi então submettida á prova de immunidade, inoculando-se-lhe virus representado pelo triturado do cerebro da cobaia infectada n.º 321, o que determinou apparecimento de reacção typica 3 dias depois.

Por esta experiencia se conclue que, ou bem o poder infectante do *Ornithodoros rostratus* pouco dura, pois um exemplar que, 13 dias depois de infectar-se, transmittia seguramente a infecção, já não mais a transmite 15 dias depois, ou bem nem todas as picadas de um exemplar infectado são capazes de transmitir o virus.

d) Poder infectante do liquido coxal do *Ornithodoros rostratus*.

Sabido, como é, que o liquido coxal dos carrapatos é muitas vezes infectante, foi neste sentido instituida uma experiencia, da qual resultou demonstrar-se a possibilidade da transmissão do virus por este mecanismo. Foi para isto aproveitado o liquido coxal do mesmo carrapato que já infectára a cobaia 275, liquido este eliminado no momento em que o acariano sugava esta cobaia. O liquido colhido em pipeta foi diluido em solução physiologica e inoculado na cobaia 276, a qual, observada durante 26 dias, não apresentou reacção febril. Submettida, porém, á prova de immuniidade, inoculando-se-lhe virus da cobaia infectada 307, mostrou-se immunizada, não tendo reagido a esta ultima inoculação. Isto demonstra que a inoculação do liquido coxal tinha determinado uma infecção benigna, inapparente, seguida de immuniidade.

### RESUMO

Esta 1.<sup>a</sup> parte das pesquisas epidemiologicas pode ser resumida do seguinte modo:

1. O *Amblyomma cajennense* (Fabr.) alimentado em cobaia infectada com typho exanthematico de São Paulo, é susceptivel de adquirir a infecção, transmittindo-a á cobaia, quando triturado e inoculado nesse animal 13 dias depois de infectar-se, não sendo, porém, constante a infecção do Ixodideo.

2. Larvas provenientes de ovos postos por uma femea infectada de *Amblyomma cajennense*, inoculadas em cobaias, provocaram nestas uma infecção inapparente, o que ficou demonstrado pela inoculação do cerebro da primeira cobaia em uma segunda.

3. A unica tentativa de infecção de *Argas persicus* (Oken) foi negativa.

4. E' possivel, embora não sempre, conseguir-se infectar experimentalmente *Ornithodoros rostratus* Aragão, alimentando-o em cobaia em phase infectante.

5. A picada do *Ornithodoros rostratus* é infectante para a cobaia 13 dias após sua infecção.

6. Um *Ornithodoros rostratus*, infectante 13 dias após sua alimentação em cobaia doente, póde não infectar quando sugar 28 dias depois de contaminado.

7. No liquido coxal de *Ornithodoros rostratus* infectado existe o virus com capacidade infectante (immunizante) para a cobaia.

8. O periodo de incubação na infecção experimental da cobaia pela picada do *Ornithodoros rostratus* infectado é mais longo do que o periodo de incubação geralmente observado após injecção do virus na cavidade peritoneal.

## II

## Pesquisa do virus em alguns arthropodos sob condições naturaes.

Recentes pesquisas sobre rickettsioses deixaram bem patente que a transmissão dos agentes desse grupo de infecções pode correr por conta de outros arthropodos além do *Pediculus vestimenti*, piolho das roupas e do *Pediculus capitis*, piolho de cabeça, transmissores da *Rickettsia prowazeki* Rocha Lima, 1916, agente do typho classico do Velho Mundo.

Relativamente ao typho exanthematico de S. Paulo, que ha alguns annos vem sendo observado nesta cidade, com pequena disseminação, mas com elevadissimo indice lethal, que orça por mais de 70 %, decidimos emprehender uma serie de pesquisas tendentes a verificar a infecção natural de alguns arthropodos parasitas do homem ou de animaes, domesticos ou não, assumpto este que constitue uma das numerosas incognitas que obscurecem a epidemiologia do nosso "typhus" e que corresponde exactamente aos objectivos deste Instituto, votado como é ao estudo da pathologia humana.

Ao iniciarmos taes verificações, não ignoravamos a serie de difficuldades com as quaes deveriamos contar, peculiares a este genero de pesquisas e oriundas, quer da difficil obtenção do material para estudo, quer do grande numero de animaes sensiveis necessarios á experimentação em larga escala, ou do perigo que apresenta a pesquisa do transmissor de um agente morbigeno dotado da virulencia do causador do typho de São Paulo. De todas as difficuldades, porém, a maior, ao que já previamos, seria a que reside na diluição dos transmissores naturalmente infectados em relação aos individuos não infectados da mesma especie, diluição esta que se deduz dever ser muito elevada, dada a relativa raridade dos casos observados e o seu espaçamento, a menos que se trate de arthropodos que só raramente entrem em contacto com o homem.

Algumas das difficuldades apontadas foram, aliás, contornadas, graças ao aparelhamento do Instituto Butantan para este genero de pesquisas e graças ao auxilio por nós recebido da Secção de Molestias Infectuosas do Serviço Sanitario do Estado, cujo Inspector-chefe, dr. Francisco Salles Gomes e Inspectores, drs. Sampaio Corrêa e Cesar Diogo, bem como o Inspector Geral da capital, dr. Eloy Lessa, são credores do nosso agradecimento, extensivo á turma de captura de ratos chefiada pelo Sr. Jove Gomes e posta á nossa disposição durante algum tempo, a qual nos forneceu material precioso para as pesquisas até agora realizadas.

### Resumo das pesquisas effectuadas

Tivemos occasião de pesquisar, nos ultimos meses, pediculideos, pulicideos e cimicideos colhidos, quer sobre os proprios doentes, ou sobre o leito em que estes se encontravam, quer em suas casas, bem como pediculideos, pulicideos, ixodideos e outros acarianos capturados sobre animaes, domesticos ou não, existentes nas habitações onde se tinham verificado casos de typho exanthematico ou em suas vizinhanças, no bairro mais infectado da cidade, limitrophe com a zona rural.

Os trabalhos mais recentes sobre a transmissão de rickettsioses outras que não o typho exanthematico classico do Velho Mundo, accusam varios arthropodos da transmissão dessas infecções: as pulgas dos ratos no caso do typho endemico norte-americano e o *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato do cão, no caso da febre botonosa de Tunis e da febre exanthematica de Marselha; alem desses, o acariano *Dermanyssidae*, *Liponyssus bacoti* (Hirst, 1913), tem sido incriminado de transmittir o "typhus" dos Estados Unidos e a molestia de Brill do Mediterraneo. Está demonstrado, alem disso, ha mais tempo, que a rickettsiose conhecida por febre das Montanhas Rochosas é transmittida pelos carrapatos *Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis* e que o "tsutsugamushi" japonês, outra infecção pertencente ao mesmo grupo, tem sua disseminação assegurada pelas larvas do acariano *Trombicula akamushi*.

Veamos, em rapido golpe de vista, quaes desses arthropodos occorrem na zona mais infectada da cidade, isto é, zona suburbana e rural.

Em nossas investigações, observámos que justamente no bairro mais infectado de São Paulo as pulgas de ratos são de extrema raridade, embora abundem em outros bairros, apenas tendo sido capturados, na zona de Pinheiros e limitrophes, 1 *Xenopsylla cheopis* e 22 *Craneopsylla minerva* em 128 ratos desta zona pesquisados, ao passo que a colheita de pulgas em ratos da zona mais central da cidade, onde tem sido muito mais raro o "typhus", foi sempre abundante.

Só raramente foi capturado *Rhipicephalus sanguineus* sobre cães nas casas dos doentes e os exemplares pesquisados, bem como outras especies de ixodideos examinados, não se achavam infectados.

Entre os acarianos encontrámos com grande frequencia parasitando ratos: *Echinolaelaps echidninus* (Berlese, 1887) e *Laelaps nuttalli* Hirst, 1915, e só muito raramente *Liponyssus bacoti* (Hirst, 1913).

Ao contrario disso, porém, foi *Liponyssus bacoti* encontrado com grande frequencia e abundancia sobre o preá (*Cavia aperea*), cavideo muito commum nos arredores de São Paulo, tendo sido verificada 6 vezes a sua presença em 9 preás capturados na zona infectada, chegando a ser observada a existencia de cerca de 500 exemplares sobre um mesmo preá. Além disso, foi *Liponyssus*

*bacoti* capturado uma vez parasitando uma creança em casa donde acabava de sair doente de typho exanthematico.

Alem das pesquisas com ecto-parasitas capturados na zona suburbana ou mesmo rural, estão em andamento outras, com pulicideos capturados sobre ratos de zona urbana, da rua Florida, onde occorrera um caso de "typhus", tendo sido identificadas as seguintes especies de pulgas: *Xenopsylla cheopis*, *Xenopsylla brasiliensis*, *Ctenopsyllus musculi*, *Ceratophyllus fasciatus* e *Ctenocephalides felis*.

Durante as pesquisas até agora realizadas foram examinados os seguintes arthropodos, os quaes, depois de triturados em gral com solução physiologica, eram injectados na cavidade peritoneal de cobaias:

1.ª SERIE (da zona suburbana e rural):

- 26 *Pulex irritans* colhidos em roupas de camas de onde acabavam de sair doentes com typho exanthematico; inoculados em 3 cobaias.
- 97 *Ctenocephalides felis* capturados sobre cães e gatos de casas de doentes; inoculados em 4 cobaias.
- 16 *Craneopsylla minerva* capturados sobre ratos; inoculados em 1 cobaia.
- 6 *Pediculus capitis* colhidos sobre 2 doentes de typho exanthematico na ultima phase da molestia; inoculados em 1 cobaia.
- 20 *Pediculus capitis* colhidos sobre creanças de casas de doentes; inoculados em 1 cobaia.
- 10 *Linognathus piliferus*, piolhos de cão, capturados sobre cães de casa de doente.
- 120 *Cimex lectularius* colhidos, quer no proprio leito dos doentes, quer em camas de outros habitantes da casa infectada, tendo sido feita a inoculação, não só do triturado, como tambem de fezes, submettendo-se, alem disso, cobaias á picada dos hemipteros, experiencias estas praticadas em 7 cobaias.
- 350 larvas de *Boophilus microplus* colhidos na vegetação da zona infectada; inoculadas em 2 cobaias.
- 4 *Rhipicephalus sanguineus* colhidos em cães de um dos doentes; inoculados em 1 cobaia.
- 13 *Amblyomma ovale* de igual procedencia; inoculados em 2 cobaias.
- 100 *Liponyssus bacoti* capturados sobre 5 preás da zona infectada; inoculados em 2 cobaias.
- 600 *Echinolaelaps echidninus* e *Laelaps nuttalli* capturados sobre ratos da zona infectada; inoculados ou obrigados a picar cobaias, utilizando-se 9 cobaias.

- 4 *Liponyssus bursa*, capturados sobre gallinhas de casas de doentes de typho exanthematico; inoculados em 1 cobaia.

2.<sup>a</sup> SERIE (zona urbana):

- 75 *Ctenopsyllus musculi*; inoculados em 4 cobaias.  
69 *Xenopsylla cheopis*; inoculados em 4 cobaias.  
2 *Xenopsylla brasiliensis*; inoculados em 1 cobaia.  
1 *Ceratophyllus fasciatus*; inoculado em 1 cobaia.  
1 *Ctenocephalides felis*; inoculado em 1 cobaia.

As cobaias utilizadas para essas experiencias foram todas submettidas a observação rigorosa, traçando-se a curva de temperatura, durante um prazo minimo de 20 a 30 dias, findos os quaes eram submettidas á prova de immunidade. Sempre que havia reacção febril a cobaia era sangrada no coração e o sangue inoculado em outra, para passagem do virus, afim de verificar si teria sido esta a causa da reacção.

Para a prova de immunidade inoculava-se, por via peritoneal, virus de passagem, isolado de doente proveniente da zona rural, virus já descripto por um dos auctores em trabalhos anteriores e representado por emulsão de cerebro de cobaia infectada, em dose seguramente infectante, havendo sempre testemunhas das inoculações.

**Resultados:**

Pelas experiencias realizadas, tomando, como criterio de verificação positiva, reacção febril de mais de um gráo centigrado acima da media individual da cobaia ou a immunidade apresentada contra a infecção por dose de virus cerca de 1000 vezes superior á dose minima infectante, verificámos que nenhuma das cobaias inoculadas, com pediculideos, pulcideos, cimicideos, ixodideos ou acarianos, se apresentou infectada, pois nem uma só das 37 cobaias utilizadas apresentou reacção febril typica e todas as já submettidas á prova de immunidade reagiram fortemente, demonstrando não terem ficado immunizadas após a inoculação com aquelles arthropodos.

**Discussão**

Maxcy, em 1929 (6), estudando o "typhus" do sul dos Estados Unidos, julga que o virus não é transmittido pelo *Pediculus humanus*, acreditando, baseado em considerações de ordem epidemiologica, que a transmissão deve correr por conta de arachnideos (carrapatos ou outros acarianos), aventando a hypothese de serem roedores os depositarios do virus.

Mooser e Dummer, em 1930 (5), estabeleceram a possibilidade da infecção experimental do piolho do homem com o virus do typho dos estados do Atlantico Sul (America do Norte).

Castaneda e Zinsser, em 1930 (7), infectaram experimentalmente percevejos (por via rectal, pelo methodo de Weigl), os quaes, injectados em cobaias, a estas conferiam infecções typicas. Os resultados de tentativas de infecção de cobaias pela picada ou pelas fezes dos percevejos foram, entretanto, negativas. Conseguiram ainda os mesmos pesquisadores infectar piolhos utilizando a mesma technica, verificando que os pediculideos inoculados em cobaias determinavam infecção.

Durand e Conseil (8), em 1931, provaram ser o *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato do cão, o responsavel pela transmissão da febre marselhesa ou botonosa de Tunis.

Em 1931, Dyer e Badger (9) deram, pela primeira vez, a prova de que existe, naturalmente infectado, um outro insecto que não o *Pediculus humanus*, capaz de transmittir o "typhus" do Novo Mundo. Conseguiram estes pesquisadores capturar, em Baltimore, pulgas do rato, que trituradas e inoculadas em cobaias conferiram a estas infecção typica, apresentando-se as cobaias, restabelecidas da infecção, immunes a nova infecção provocada pela raça norte-americana do virus. A verificação de Dyer e Badger constitue uma contribuição da mais alta relevancia para a elucidação dos problemas epidemiologicos relacionados com a forma norte-americana do typho exanthematico, representando uma prova decisiva de sua distincção do typho classico da Europa.

Complemento de grande valor da verificação de Dyer e Badger é a prova que acabam de dar Mooser, Castaneda e Zinsser (10), de que a propagação do "typhus" americano do norte entre os ratos, seus depositarios naturaes, é devida ao piolho *Polyplax spinulosa*, parasita do rato dos esgotos, ficando desse modo fechado o cyclo da modalidade norte-americana da infecção, o que não quer, todavia, dizer que não venha a ser demonstrada a possibilidade da existencia de outros vectores.

Está, além disso, bem estabelecido por pesquisas mais antigas que a rickettsiose conhecida por febre das Montanhas Rochosas é transmittida pelo *Dermacentor andersoni* e pelo *Dermacentor modestus*, encontrados naturalmente infectados, respectivamente, por Ricketts e por Maver. Sabe-se tambem, ha muito, serem *Trombicula akamushi* e *Trombicula deliensis*, respectivamente, os transmissores do "tsutsugamushi" japonês e do "pseudo-typhus" das Indias Hollandesas.

Em relação ao typho de S. Paulo, assignalámos no capitulo anterior, que, experimentalmente, é possivel a transmissão do virus por intermedio do *Amblyomma cajennense* e *Ornithodoros rostratus*.

Em condições naturaes, porém, não pudemos, até agora, chegar a uma conclusão definitiva em relação á existencia do virus em uma grande serie de arthropodos examinados.

Estes resultados, entretanto, permitem concluir que, para a transmissão natural do typho exanthematico de S. Paulo, é muito pequena a probabilidade de ser este papel desempenhado por *Pediculus capitis*, *Pulex irritans* ou *Cimex lectularius*, que são os ectoparasitas que apresentam relações mais immeditas com o homem, entre nós. Estes insectos foram capturados em flagrante parasitismo dos doentes, quer sobre elles proprios, quer nos seus leitos, ou sobre pessoas ou leitos de casas onde acabavam de ser assignalados novos casos, havendo, portanto, toda a probabilidade de que se achassem infectados, caso fossem susceptiveis á infecção, o que não se verificou.

Necessario, porém, se faz resalvar a hypothese de exigirem elles um prazo de incubação maior, para transmíttirem a infecção, do que o que lhes foi concedido. Os exemplares examinados foram em regra colhidos, em media, cerca de uma semana após o inicio da infecção dos doentes, sendo inoculados no mesmo dia ou no dia seguinte ao da captura. Sabendo-se que em condições naturaes esses parasitas se alimentam com frequencia, a probabilidade é de que o virus já tivesse tido tempo de soffrer multiplicação sufficiente para que o insecto se tornasse infectante, caso fosse receptivel.

E' sabido, como o assignalou Rocha Lima (11), que os piolhos alimentados em doentes de typho exanthematico europeu exigem prazo de 4 a 5 dias para se tornar infectantes, falhando, porém, ás vezes essa regra e só vindo a apresentar infecção demonstravel depois de 8 dias. Não é impossivel que, no caso do typho de S. Paulo, o prazo habitual de incubação seja mas longo do que o exigido para o "typhus" do Velho Mundo, nisso residindo a razão de não ter sido obtida a infecção, quer com os piolhos, quer com as pulgas e os percevejos examinados.

Não é, alem disso, conhecido o gráo de receptividade que porventura possam apresentar no caso do typho de S. Paulo, não sendo impossivel, embora seja menos provavel, que só um numero muito pequeno de exemplares se torne infectante, o que se verifica em menor escala, aliás, com o typho exanthematico classico, em que nem todos os piolhos se infectam ao sugar o doente em phase infectante. Nesse caso só o exame de um numero muito maior de exemplares capturados sobre doentes poderia conduzir a resultado definitivo.

São estas, porém, meras hypotheses, que aventamos apenas para deixar bem patente não considerarmos definitivos os resultados a que até agora chegámos.

Fomos levados, no decurso das pesquisas, a algumas conclusões de interesse, baseados no estudo da fauna de ectoparasitas dos roedores examinados.

Notavel contraste foi observado relativamente ao indice pulicideano dos ratos capturados nas zonas suburbanas ou mesmo rural e na zona propriamente urbana da cidade. Nos ratos daquellas zonas (suburbana e rural) foi inteiramente excepcional o encontro de publicideos (1 *Xenopsylla cheopis* e 22 *Cra-neopsylla minerva* em 128 ratos), os quaes, entretanto, parasitam abundantemente os ratos da zona urbana (\*).

Occorrendo o maior numero de casos de "typhus" justamente nas zonas suburbana e rural, onde se reveste de particular gravidade, zonas estas nas quaes quasi não são encontradas pulgas parasitando ratos, somos forçados a concluir que é pequena a probabilidade de serem as pulgas dos ratos os transmissores habituaes do "typhus" observado nessas zonas. Existindo, entretanto, as pulgas em abundancia nos ratos da zona urbana, onde o typho tambem ocorre, si bem que mais raramente e talvez sob forma mais benigna, torna-se aceitavel a hypothese de representarem o papel de transmissores da infecção na zona urbana.

Por outro lado, segundo tivemos oportunidade de verificar (12), existe nas zonas suburbana e rural de S. Paulo um pequeno cavideo, o preá, *Cavia aperea*, frequente e intensamente parasitado por *Liponyssus bacoti*, acariano parasita tambem do rato e do homem. Este acariano vem sendo incriminado com insistencia de transmittir ao homem o typho norte-americano, tendo ficado provado, em novembro do anno findo, por Dove e Shelmire (13), que, experimentalmente, elle pode ser infectado ao alimentar-se sobre um animal doente, transmittindo então a infecção pela picada.

Diante desses dados é perfeitamente licito perguntar si em São Paulo não será o typho da zona urbana, onde abundam as pulgas dos ratos, transmittido ao homem por estes syphonopteros, tal como succede na America do Norte, segundo o provaram Dyer e Badger (9) e si o typho das zonas suburbana e rural, onde as pulgas de ratos são extremamente raras, não terá como transmissor o *Liponyssus bacoti* (como o querem Dove e Shelmire) ou algum outro acariano, como, p. ex., as larvas de carrapatos, que verificámos serem sensiveis ao "typhus" experimental.

Succederia nesta hypothese com o typho exanthematico de S. Paulo o mesmo que já está verificado para o typho tropical dos Estados Malaios, onde ocorre uma forma urbana e uma rural da infecção.

Tal hypothese, porém, somente poderá ser defendida após um estudo sorologico das duas possiveis formas da infecção, bem como após verificações acuradas do comportamento experimental dos respectivos virus.

---

(\*) As designações de urbana, sub-urbana e rural por nós empregadas não devem ser interpretadas como correspondentes ás divisões administrativas da cidade e do Estado, significando apenas o grao de densidade de habitações e o aspecto da zona em questão, factores de importancia no estudo que empreendemos.

## RESUMO

1. Tendo inoculado, em cobaias, exemplares de *Pediculus capitis*, *Pulex irritans* e *Cimex lectularius*, colhidos sobre doentes ou pessoas da casa e nas camas dos mesmos, acreditam os auctores ser muito pouco provavel que estes hematophagos desempenhem o papel de transmissores habituaes do typho exanthematico de S. Paulo.

2. Foram negativas as experiencias tendentes a demonstrar a presença do virus, em condições naturaes, nos seguintes arthropodos, capturados em liberdade ou em parasitismo em ratos, cães, gatos e gallinaceos das zonas infectadas:

Pulicideos: *Xenopsylla cheopis*, *Xenopsylla brasiliensis*, *Ctenopsyllus musculi*, *Ceratophyllus fasciatus* e *Craneopsylla minerva*, capturados sobre rato e *Ctenocephalides felis* capturados sobre cão, gato e rato.

Pediculideos: *Linognathus piliferus*, piolho do cão.

Ixodideos: *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus sanguineus*, carrapatos do cão e *Boophilus microplus*, carrapato do boi, este em phase de larva e capturado quando em liberdade.

Acarianos *Dermanyssidae*: *Echinolaelaps echidninus*, *Laelaps nuttalli* e *Liponyssus bacoti* capturados sobre ratos e o ultimo tambem sobre preás; *Liponyssus bursa* capturado sobre gallinaceos.

3. O estudo da fauna de ectoparasitas das zonas da cidade onde ocorre a infecção, a suburbana ou rural e a urbana, alliado a razões de ordem epidemiologica e de comportamento experimental do virus, parece indicar que o transmissor habitual do virus deve ser a pulga dos ratos na zona urbana e um acariano, *Dermanyssidae* (*Liponyssus bacoti*) ou *Ixodidae*, na zona suburbana ou rural, facto que, sendo verdadeiro, coincidirá com uma possivel diversidade do virus nas duas zonas, tornando-se necessarias outras pesquisas para que se confirme a hypothese.

## III

**Os ratos como possiveis depositarios do virus.**

A existencia de outros depositarios de "virus", alem do proprio homem, na natureza é facto hoje acceito em relação a varias "rickettsioses". Para a febre maculosa das Montanhas Rochosas são incriminados varios roedores silvestres, principalmente coelhos selvagens; no caso do "tsutsugamushi", do Japão, o roe-

dior *Microtus montebelloi* e outros; quanto ao typho endemico da America do Norte (Estados Unidos e Mexico) os estudos recentes (1931) de Mooser, Castaneta e Zinsser (14), no Mexico, provaram ser os ratos depositarios do virus, graças á inoculação de emulsão de cerebro destes animaes em cobaias e confirmando, deste modo, as verificações de Dyer e Badger (15) quanto á fonte natural de infecção das pulgas, incriminadas por estes como transmissores do virus ao homem.

A transmissibilidade por intermedio das pulgas dos ratos foi confirmada por Mooser, Zinsser e Castaneda, nos Estados Unidos e, logo depois, por Kemp (16).

A infecção de rato a rato é entretida não só por meio das pulgas, mas principalmente, segundo Mooser, Castaneda e Zinsser (10), por meio do piolho do rato, o *Polyplax spinulosa*.

Estudando o typho exanthematico de S. Paulo sob varios dos seus aspectos, não podiamos deixar de emprehender a pesquisa de possiveis depositarios naturais do seu virus. Nossos estudos neste sentido foram iniciados antes de termos tomado conhecimento dos recentes trabalhos dos auctores americanos, e se justificavam em virtude do aspecto epidemiologico da propria infecção.

Nos capitulos anteriores foram relatados os resultados da transmissão experimental do virus por meio de Ixodideos e os das pesquisas feitas para a verificação de infecção natural em arthropodos diversos: Pulicideos, Pediculideos, Cimicideos, Ixodideos e outros acarianos.

Mostraremos, agora, os resultados obtidos para a verificação da possibilidade de serem os ratos depositarios naturais do virus do typho de S. Paulo.

### Technica empregada

Ratos capturados na zona infectada da cidade e enviados vivos ao Instituto pela Secção de Prophylaxia de Molestias Infectuosas do Serviço Sanitario do Estado eram immediatamente examinados. Com os cuidados technicos necessarios, eram colhidos os ectoparasitas porventura existentes, separados de accordo com a especie, para estudo estatistico da frequencia com que eram verificados, sacrificando-se e necropsiando-se em seguida os hospedeiros. Durante a necropsia era colhido material, inclusive de hematozoarios e Leptospiras, visando o conhecimento dos parasitas dos ratos da zona correspondente. Nos exemplares que apresentavam alguma lesão evidente macroscopica, eram colhidos fragmentos de organs diversos para estudo histo-pathologico. O cerebro de todos os ratos era retirado asepticamente e collocado em placas de Petri esterilizadas. Em seguida era feita emulsão, em agua physiologica, do cerebro, sendo esta immediatamente inoculada em cobaia por via peritoneal. Para economia de ani-

Pesquisas epidemiológicas sobre o typho exanthematico

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
1 e 2	362	8-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 4 dias; reacção febril durante 4 dias; morte na manhã de 7-X-31.	Epimys norvegicus	Negativo
3	363	8-IX-31	Incubação de 2 dias; reacção febril durante 2 dias (40°0; 40°0). Amanheceu morta a 13-IX-31.	—	—	—	Mus sp.. A cobaia 363 foi sangrada no 2.º dia de reacção, retirando-se 0cc. 5 de sangue, que foram inoculados na cob. 380. Após 8 dias apresentou esta reacção por 2 dias (40°0 e 39°8) resistindo á infecção. A prova de immundade da cob. 380 não pode ser completa, mas o animal morreu 5 dias após a inoculação do virus. O cerebro da cob. 363 inoculado na cob. 382 não provocou reacção. A prova de immundade feita a 7-X-31 na cob. 382 demonstrou não estar esta immunizada, tendo apresentado reacção febril de 12 a 18-X-31, morrendo de 19 para 20-X-31.	Negativo
4	369	9-IX-31	Não apresentou reacção.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 2 dias; reacção febril por 6 dias. Amanheceu morta a 17-X-31.	Epimys norvegicus	Negativo

5	370	9-IX-31	Não apresentou reacção.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 4 dias; reacção febril de 3 dias; morte de 14 para 15-X-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
6	372	10-IX-31	Incubação de 5 dias; reacção febril ligeira (39°6; 39°7; 39°3) por 3 dias. Amanheceu morta a 20-IX-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i> O cer. da cob. 372 foi inocul. na cob. 398, que teve reacção ligeira 7 dias após a inoculação (39°5; 39°3). Feita a prova de imunidade a 22-X-31, apresentou ligeira reacção, com máximo de 39°7, morrendo na manhã de 30-XI-31.	Negativo
7	376	11-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 2 dias; reacção febril por 5 dias; amanheceu morta a 15-X-31	<i>Epimys norvegicus.</i>	Negativo
8 e 9	377	11-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Imunizada. Não apresentou reacção febril até 22-XII-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Positivo
10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16	378	11-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 3 dias; reacção febril por 6 dias; amanheceu morta a 20-X-31.	sp.?	Negativo
17	381	12-IX-31	Não apresentou reacção febril.	7-X-31	Em. cer. cob. 420	Incubação de 5 dias; reacção febril por 4 dias; sobrevivencia.	<i>Mus sp.</i>	Negativo
18	383	15-IX-31	Não apresentou reacção febril. Amanheceu morta a 22-IX-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i> Causa mortis: toxoplasmose verificada por necropsia.	—

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE		OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa	
				Data	Virus inoculado			Resultado
19, 20 e 21	392	17-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril durante 3 dias. Amanheceu morta a 30-X-31.	Mus sp.	Negativo
22 e 23	395	19-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 7 dias; morta a 2-XI-31.	Mus sp.	Negativo
24	397	19-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 4 dias; reacção febril de 4 dias; morta a 30-X-31.	Mus sp.	Negativo
25	399	21-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 4 dias; morta a 31-X-31.	Mus sp.	Negativo
26	400	22-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 6 dias; amanheceu morta a 2-XI-31.	Epimys norvegicus	Negativo
27	411	26-IX-31	Morta a 29-IX-31 (peritonite).	—	—	—	Mus sp.	—
28	412	28-IX-31	Não apresentou reacção febril	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Morta de 26 para 27-X-31.	Mus sp. Causa mortis: peritonite.	—
29, 30 e 31	413	29-IX-31	Incubação de 6 dias; ligeira reacção febril durante 5 dias (40°0; 38°8; 40°0; 39°7).	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Morta de 22 para 23-X-31.	Epimys norvegicus Causa mortis: peritonite.	Negativo

32, 33, 34 e 35	414	29-IX-31	Morta a 5-X-31	—	—	—	Mus sp.	—
36	415	29-IX-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 18-X-31	—	—	—	Mus sp.	—
37 (*)	427	30-IX-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 3 dias; reacção febril de 5 dias; amanheceu morta a 1-XI-31.	Epimys norvegicus da zona não infectada.	Negativo
38, 39 e 40	421	2-X-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Incubação de 4 dias; reacção febril de 2 dias; morta a 29-X-31.	Epimys norvegicus	Negativo
41 e 42	422	2-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 14 para 15-X-31.	—	—	—	Mus sp. Veja observação cob. 425.	Negativo
43 e 44	423	2-X-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 420 e 455.	Morta de 22 para 23-X-31.	Epimys norvegicus	Negativo
45, 46 e 47	424	2-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 14 para 15-X-31.	—	—	—	Mus sp. Veja observação cob. 425.	Negativo
48, 49, 50, 51, 52 e 53	425	5-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 15-X-31.	—	—	—	Mus sp. A emulsão do cer. das cobaias 422, 424 e 425, inocul. a 15-X-31 na cob. 450, não provocou reacção febril, não se tendo esta cob. mostrado imunizada ao ser inoculada a 5-XI-31 com virus, tendo, após incubação de 5 dias apresentado reacção febril por 4 dias, morrendo a 15-XI-31.	Negativo

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
54 a 63	426	6-X-31	Após 7 dias apresentou reacção por 3 dias (40°0; 40°0; 39°6)	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Após 2 dias de incubação apresentou 2 de reacção (39°8, 40°0). Amanheceu morta a 29-X-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Duvidoso
64, 65 e 66	428	6-X-31	Não apresentou reacção febril.	22-X-31	Em. cer. cob. 454 e 455.	Após 4 dias de incubação teve 6 dias de reacção febril, morrendo de 2 para 3-XI-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
67, 68 e 69	434	7-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 21-X-31.	—	—	—	1 <i>Mus sp.</i> e 2 <i>Epimys norvegicus</i> . O cer. da 434 foi inoculado na 459 a 21-X-31. Não apresentando reac. febril foi a 459 inocul. com virus, reagindo febrilmente durante 6 dias após 3 dias de incubação. Morte a 8-XII-31.	Negativo
70 a 79	439	8-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 21 para 22-X-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i> jovens. A emulsão do cer. cob. 439 inoculada na cob. 463 a 22.X-31, provocou nesta após 4 dias de incubação reac. febril pouco typica (39°5; 40°0; 39°0; 39°3; 39°8). Amanheceu morta a 1-XI-31.	Duvidoso
80	440	8-X-31	Não apresentou reacção febril.	28-X-31	Em. cer. cob. 454	Morta a 3-XI-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo

81, 82, 83 e 84	444	10-X-31	Não apresentou reação febril. Morta de 19 para 20-X-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i> O cer. da 444 foi inoculado a 20-X-31 na cob. 458, que a 13- XI-31 foi submettida á prova de immundade, reagindo com febre após 3 dias de incuba- ção, durando a reação 5 dias. Morreu a 23-XI-31.	Negativo
85 e 86	445	12-X-31	Não apresentou reação febril. Morta de 17 para 18-X-31.	—	—	—	<i>Epimys rattus</i>	Negativo
87, 88 e 89	456	19-X-31	Não apresentou reação febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Após 3 dias de in- cubação apresentou reação por 3 dias, morrendo de 20 para 21-XI-31.	<i>Mus sp.</i>	Negativo
90, 91 92 e 93	461	21-X-31	Não apresentou reação febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Após 3 dias de in- cubação teve reação febril por 3 dias, morrendo a 24-XI-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
94, 95, 96 e 97	462	21-X-31	Não apresentou reação febril. Morta de 12 para 13-XI-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
98, 99 e 100	469	22-X-31	Não apresentou reação febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Não apresentou re- ação febril. Viva a 23-XII-31.	<i>Epimys norvegicus</i> A cobala mostrou-se immuni- zada.	Positivo
101, 102 e 103	472	26-X-31	Não apresentou reação febril.	13-XI-31	Em. cer. cob. 499	Após 3 dias de in- cubação reagiu com febre de 17 a 23-XI- 31, morrendo a 30- XI-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
104, 105 e 106	473	27-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 13-XI-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
107, 108 e 109	474	28-X-31	Não apresentou reacção febril.	24-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 5 dias de incubação teve reacção febril de 3 dias, amanhecendo morta a 7-XII-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
110 e 111	476	30-X-31	Não apresentou reacção febril.	24-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 3 dias de incubação teve reacção febril de 4 dias, morrendo de 2 para 3-XII-31.	<i>Mus sp.</i>	Negativo
112 e 113	480	31-X-31	Não apresentou reacção febril. Morta a 8-XI-31.	—	—	—	<i>Mus sp.</i> e <i>Epimys norvegicus</i> . Causa mortis: peritonite.	—
114 e 115	482	3-XI-31	Não apresentou reacção febril.	24-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 2 dias de incubação apresentou reacção febril por 5 dias, morrendo a 3-XII-31.	<i>Epimys norvegicus</i>	Negativo
116 e 117	483	4-XI-31	Não apresentou reacção febril.	24-XI-31	Em. cer. cob. 508	Após 3 dias de incubação teve 4 dias de reacção febril, morrendo a 3-XII-31.	<i>Mus sp.</i> e <i>Mus musculus</i>	Negativo
118, 119 e 120	487	5-XI-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 12 para 13-XII-31.	—	—	—	<i>Epimys norvegicus</i> Causa mortis: Toxoplasmose	—

121 e 122	498	6-XI-31	Não apresentou reacção febril. Morta de 16 para 17-XII-31.	—	—	—	Epimys norvegicus e Epimys rattus	Negativo
123 e 124	501	5-XI-31	Não apresentou reacção febril.	2-XII-31	Em. cer. cob. 521	Após 4 dias de incubação, elevação thermal por 7 dias, tendo sobrevivido.	Epimys norvegicus	Negativo
125, 126, 127 e 128	507	14-XI-31	Após 4 dias apresentou reacção febril por 3 dias (40°0; 39°5; 40°0), morrendo a 23-XI-31.	—	—	—	Epimys norvegicus O sangue da cob. 507 foi inoculado a 21-XII-31 na cob. 519, que não teve reac. febril, morrendo a 4-XII-31, apres. toxoplasmose. O cer. da cob. 507 foi inocul. a 23-XI-31 na cob. 520, que apres. reac. febril durante 3 dias (39°9; 39°5; 40°0), sendo sacrificada a 2-XII-31, sendo também encontrada toxoplasmose, inoculando-se o cer. na cob. 533, que morreu a 4-XII-31 com paralys. dos membros.	Duvidoso
129, 130 e 131 (*)	528	28-XI-31	Não apresentou reacção febril.	16-XII-31	Em. cer. cob. 536	Após 4 dias de incubação teve reacção por 4 dias e morte na noite de 25 para 26-XII-31.	sp.?	Negativo

N.º dos ratos	N.º da cobaia inoculada	Data	Resultado da inoculação	PROVA DE IMMUNIDADE			OBSERVAÇÕES	Resultado da pesquisa
				Data	Virus inoculado	Resultado		
132 e 133 (*)	529	30-XI-31	Após 8 dias de incubação teve ligeira reacção febril (39°3) por 5 dias.	4-I-32	Em. cer. cob. 561	Apresentou reacção típica, não se mostrando, pois, imunizada em relação ao virus do typho exanth. de S. Paulo (virus rural).	Epimys norvegicus A cob. 529 foi sangrada a 12-XII-31, sendo inocul. com o sangue a cob. 544, que apres. após 13 dias, reac. febril durante 5 dias. Foi feita passagem deste virus (virus murino A) para a cob. 559 que teve, após 5 dias, reac. febril durante 5 dias, sendo sacrificada e feitas novas passagens.	Positivo para o virus murino
134 e 135 (*)	530	1-XII-31	Não apresentou reacção febril.	29-XII-31	Em. cer. cob. 556	Morreu na noite de 4 para 5-1-32.	Epimys rattus e Epimys norvegicus	Negativo
136 e 137 (*)	535	7-XII-31	—	—	—	—	Epimys norvegicus Morta na noite de 11 para 12-XII-31. Peritonite.	—
138 e 139 (*)	539	11-XII-31	Reacção febril durante 8 dias após incubação de 12 dias.	—	—	—	Epimys norvegicus e Epimys rattus Em 28-XII-31 foi sangrada e inocul. a cob. 558, sendo conseguida, após esta, novas passagens do virus murino (B).	Positivo para o virus murino
154 a 161 (*)	552	21-XII-31	Não apresentou reacção febril.	—	—	—	Epimys norvegicus e Epimys rattus Morta accidentalmente em 18-1-32.	Negativo

(\*) Ratos provenientes da zona urbana da cidade.

maes reactivos, era geralmente inoculada a emulsão de cerebro de varios ratos em cada cobaia, dividindo-se em regra o material de accordo com a especie do rato e sua proveniencia. As cobaias eram submettidas a observação, sendo sua temperatura registada diariamente e sempre á mesma hora. Decorridos, em media, 20 a 30 dias, eram submettidas á prova de immuidade, com a inoculação de virus de passagem, seguramente activo e sempre com testemunhas, representando a dose inoculada mais de 1000 D. M. I. (doses minimas infectantes).

A existencia da immuidade nesta prova com a testemunha positiva era considerada indicio da infecção, embora benigna e muitas vezes sem reacção febril, determinada pela inoculação dos cerebros dos ratos. As que apresentavam reacção febril eram sangradas para passagem do virus porventura existente.

### Resultados das inoculações experimentaes e discussão

Fizemos até agora inoculação de cerebros de 128 ratos capturados na zona suburbana ou rural (em casas de onde haviam sahido casos confirmados, ou em suas proximidades) e 24 ratos provenientes da zona urbana da cidade. O quadro annexo resume as experiencias.

Da 1.<sup>a</sup> serie (zona suburbana ou rural) apenas podemos concluir pela existencia do virus em 2 grupos; o grupo constituido pelos *Epimys norvegicus* 8 e 9, capturados ao mesmo tempo em uma mesma casa da zona infectada, na rua do Futuro, em Villa Magdalena, os quaes, foram sacrificados sendo a emulsão dos cerebros de ambos inoculada na cobaia 377, a qual não apresentou reacção febril, mas se mostrou immunizada ao ser reinoculada, 26 dias depois, com dose elevada do virus, infectante para muitas testemunhas.

O segundo grupo é o constituido pelos *Epimys norvegicus* 98, 99 e 100, dos quaes os dois primeiros provinham da Estrada do Cotia e o ultimo da rua Oscar Freire. A emulsão do cerebro desses ratos, inoculada na cobaia 469, não determinou infecção apparente, mas a cobaia mostrou-se, do mesmo modo que a 377, perfeitamente immune a uma nova inoculação de dose massica do virus feita 21 dias depois.

E' sabido que a immuidade nas infecções do grupo do "typhus", desde que não seja obtida com as "rickettsias", que possuem propriedades antigenicas, só se estabelece como consequencia de uma infecção, mesmo benigna.

Isto provavelmente aconteceu com os resultados positivos assignalados, nos quaes o "virus" inoculado com o cerebro dos ratos provocou uma infecção benigna, com ligeira reacção febril ás vezes, sem reacção outras, porém sufficiente para determinar a immuidade da cobaia em relação a dose seguramente infectante do virus de passagem.

Mesmo nesta hypothese, verifica-se que a porcentagem de ratos possiveis portadores do virus e provenientes da zona suburbana e rural é pequena, apenas 1,5 %.

Um dos resultados, considerado duvidoso, com cerebro dos ratos 125 a 128, somente não é dado como positivo em virtude de termos verificado concomitante infecção da cobaia com toxoplasma, apesar de termos obtido passagem da infecção para um segundo animal, sendo que na terceira passagem a morte da inoculada teve logar prematuramente, apresentando o animal phenomenos de paralytia.

Nos casos de resultado considerado positivo, póde ser objectado que a cobaia, depois de inoculada com o virus para prova de immuniidade, tenha tido uma infecção inapparente, e que se deveria ter feito inoculação do seu sangue em outras cobaias para provar a ausencia do virus. Reconhecemos a validade da objecção, embora a raridade destas formas e a dose elevada do virus inoculada torne pouco provavel a hypothese invocada, pois outras cobaias e a testemunha inoculadas no mesmo dia, como se vê no quadro, apresentaram infecção característica.

Por estes resultados seria licito considerar o rato como possivel depositario do virus, sendo muito provavel que outros existam entre os roedores silvestres, talvez mesmo desempenhando entre nós papel mais importante na propagação da infecção na zona rural ou suburbana da capital. Este modo de ver encontra justificativa no facto de os ratos colhidos nessa zona da cidade, fóco da infecção, serem muito pobres em pulgas, apontadas como transmissoras do typho endemico, quasi tambem não sendo parasitadas pelo acariano *Liponyssus bacoti* (Hirst), responsabilizado tambem pela sua transmissão, porém, somente pelo *Echinolaelaps echidninus* e *Laelaps nuttalli*, ainda não incriminado em qualquer parte do mundo.

Por outro lado, verificámos que o *Liponyssus bacoti* é extraordinariamente frequente nas preás, *Cavia aperea*, que são facilmente encontradas nesta principal zona infectada.

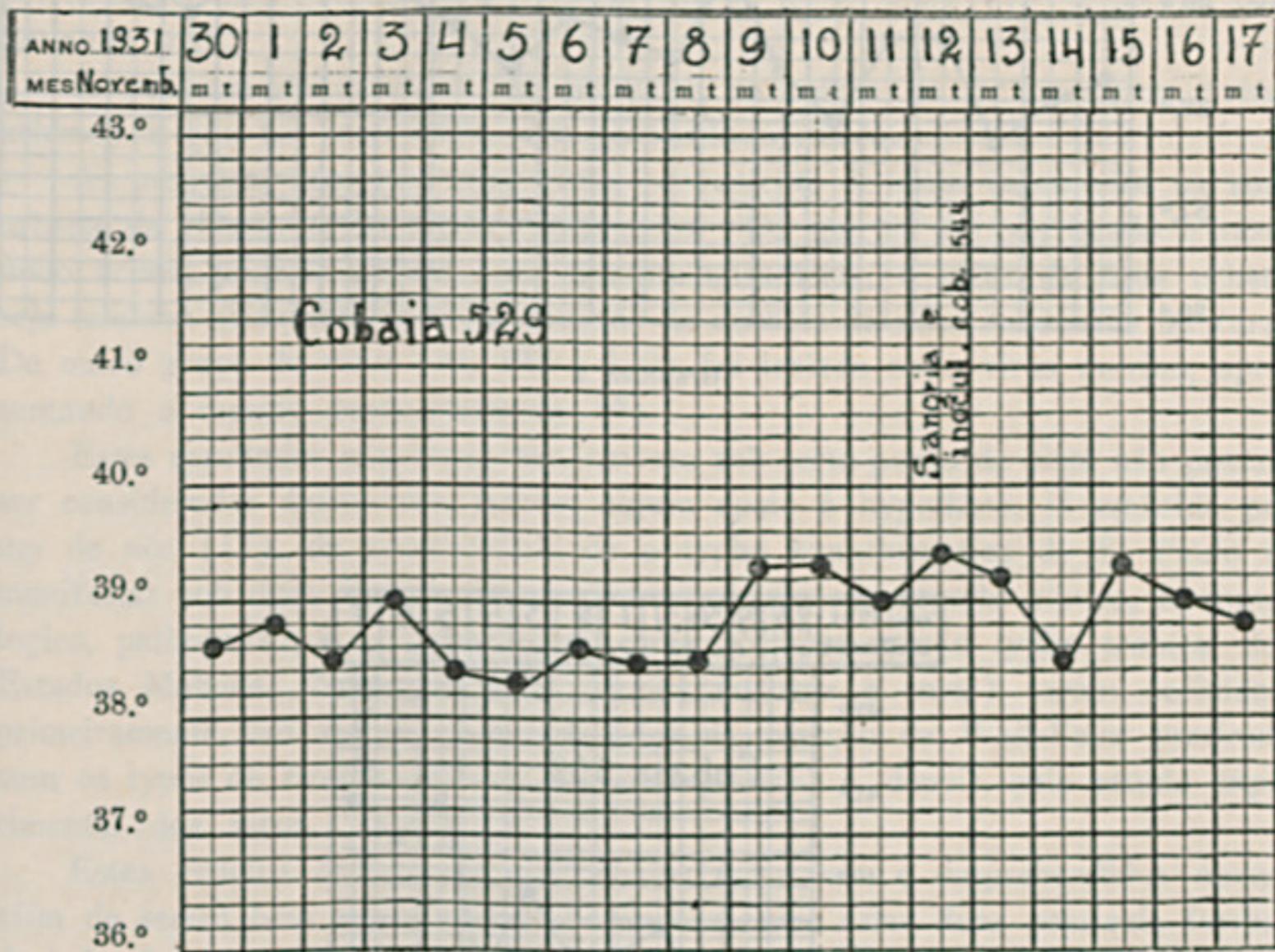
Sómente novos estudos, já iniciados, mostrarão si estes outros roedores podem tambem desempenhar o papel de depositarios do virus e a importancia que poderá ter o *Liponyssus bacoti* assim como outros acarianos, como transmissores do typho de São Paulo.

Os resultados da 2.<sup>a</sup> serie de experiencias apresentam tambem interesse não pequeno, tendo sido feitas com ratos provenientes da zona urbana da cidade (Rua Florida), capturados em uma casa, donde sahira um caso da infecção e num moinho de trigo e deposito de cereaes da vizinhança. O caso clinico foi confirmado e se manifestou de forma benigna.

Os ratos desta proveniencia eram extremamente parasitados por pulgas.

A pesquisa do virus no cerebro foi feita somente em 24 destes roedores (\*). Neste numero, reduzido relativamente ao da primeira serie, já obtivemos, pelo menos, um resultado de certa significação.

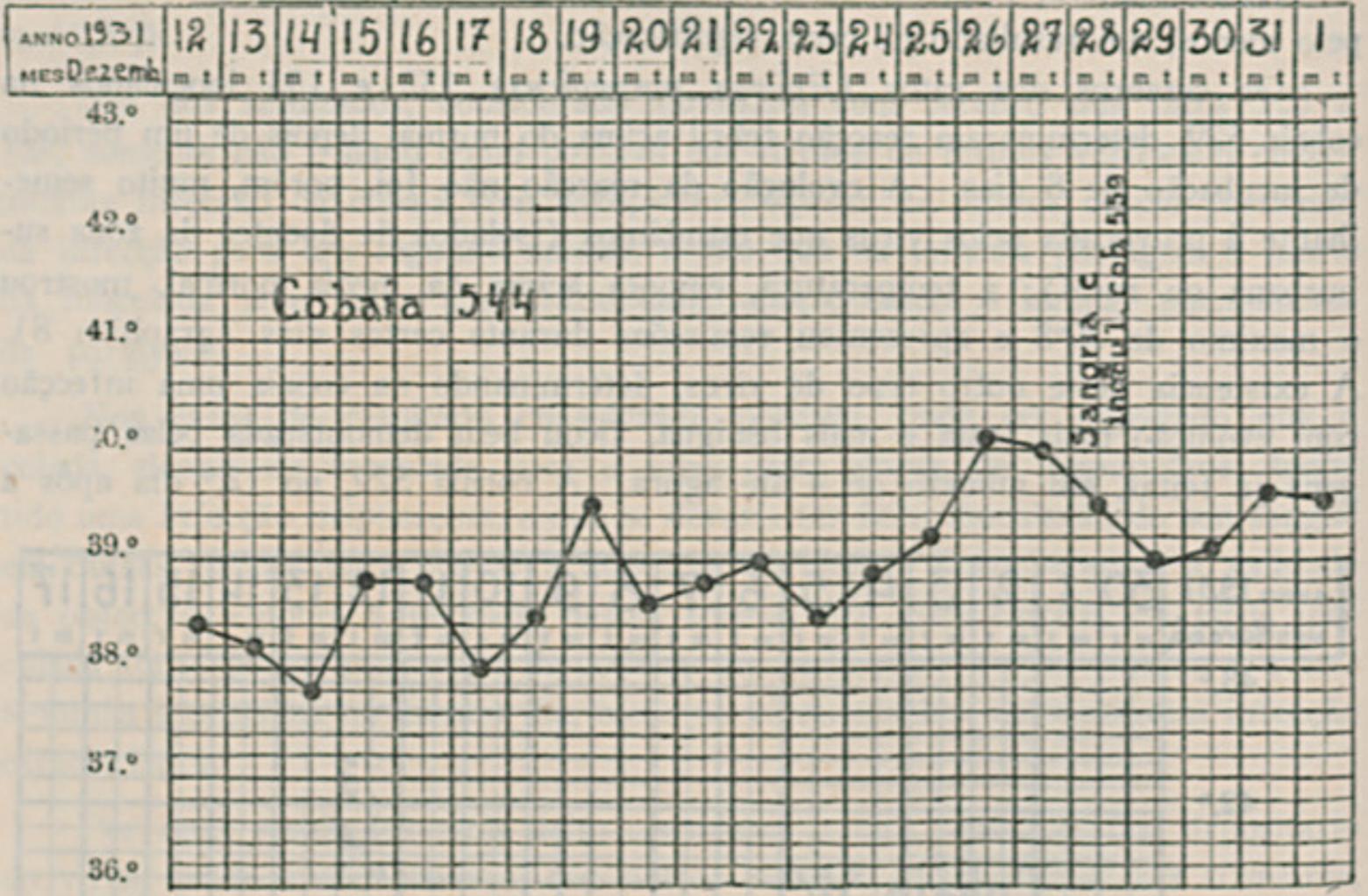
Os cerebros dos ratos (*Epimys norvegicus*) 132 e 133 inoculados na cobaia 529, determinaram reacção febril acima do normal depois de um periodo de incubação de 8 dias. A evolução da reacção não foi, porém, muito semelhante á provocada pelos virus que estudámos (isolados de doentes da zona suburbana ou rural); a temperatura, embora acima da media normal, mostrou o maximo de 39°8 e apresentou remissões durante certos dias (graphico 8). A existencia deste outro typo de virus, determinando na cobaia uma infecção com evolução mais lenta e mais benigna, ficou bem demontsrada pelas passagens já feitas, em numero de 4 até agora. A cobaia 529, no 12.º dia após a



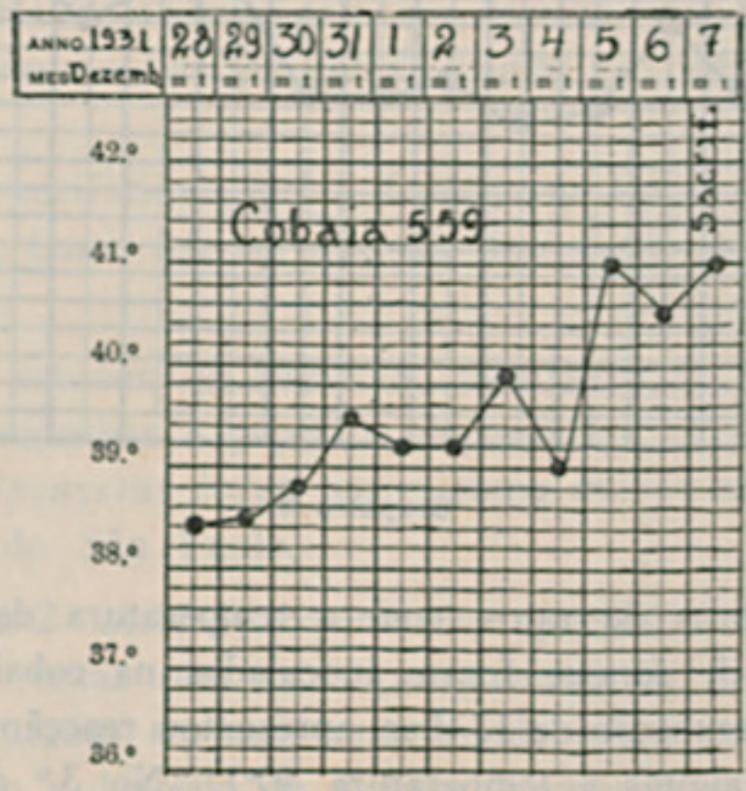
Graphico 8

inoculação dos cerebros de ratos, com a temperatura de 39°4, foi sangrada no coração e 4 cc. de sangue foram inoculados na cobaia 544. Esta ultima (graphico 9), após incubação de 13 dias, apresentou reacção febril durante varios dias, attingindo em alguns a temperatura 40°1. No 3.º dia de reacção febril

(\*) Por um lapso foi dado anteriormente este numero, o que agora corrigimos, rectificando-o para 20. Esse menor numero dos exemplares pesquisados mais salienta a proporção de resultados positivos com estes roedores da zona urbana.



Graphico 9



Graphico 10

foi sangrada, sendo inoculada com seu sangue (4 cc.) a cobaia 559. Esta apresentou, no 6.º dia da inoculação, 39º9; no 7.º, 39º; no 8.º, 41º; no 9.º, 39º5 e no 10.º, 41.º, graphico 10. Neste dia foi sacrificada, notando-se na necropsia a existencia de esplenomegalia característica, sendo inoculadas, para 4.ª passagem do virus, a cobaia 573, com 4 cc. de sangue e a cobaia 574, com emulsão de cerebro. Estas duas estão, ao ser escripta esta nota, no 4.º dia de inoculação.

A primitiva cobaia, 529, foi reinoculada com o virus de passagem seguramente activo e proveniente do doente da zona suburbana ou rural, depois de 35 dias da inoculação com os cerebros dos ratos. Não apresentou reacção febril característica (apenas um dia teve 40º), porém morreu na noite do 6.º para o 7.º dia. A pesquisa de rickettsia no peritoneo foi positiva.

Tambem a cobaia da 2.ª passagem foi reinoculada com o mesmo virus decorridos 23 dias. Apresentou reacção no 3.º e 4.º dias (40º e 39º7), continuando viva.

A pesquisa de rickettsia no peritoneo na cobaia da 3.ª passagem (virus urbano) e que foi sacrificada, deu resultado negativo.

As pesquisas com este novo virus, proveniente de ratos capturados na zona urbana da cidade, estão sendo continuadas. Do que já foi verificado e resumido acima, póde-se pensar que, immunologicamente, o virus da zona urbana seja tambem differente do virus oriundo de doentes da zona suburbana ou rural. De outro grupo de ratos (ns. 138 e 139) foi isolado novo virus murino, apresentando o mesmo comportamento (\*).

Estes resultados experimentaes, embora sob certo ponto de vista não possam ser considerados definitivos, trazem algum apoio á hypothese, já emittida por um de nós (17), da possibilidade de o typho exanthematico de S. Paulo se manifestar sob duas formas, talvez distinctas pelo seu aspecto clinico, immunologico, pathogenico e epidemiologico, como acontece com o typho tropical dos Estados Malaios. Neste, as duas formas (urbana e rural) foram definidas, primeiramente, em virtude dos resultados da reacção de Weil-Felix praticada com os typos de *Proteus* X19 e XK (Kingsbury) e, depois, pelo estudo experimental dos virus.

Estes estudos devem ser continuados entre nós e empreendidos novos, afim de serem bem estabelecidas as relações entre estas duas possiveis formas da infecção; si representam apenas uma variação de virulencia do mesmo virus ou si são devidas a virus differentes, sendo diversas as infecções, embora pertencentes ao mesmo grupo.

## RESUMO

1. Baseados em provas de immunidade e no resultado de pesquisas anteriormente feitas e já assignaladas, somos levados a acreditar na possibilidade

(\*) O estudo deste virus consta de outro trabalho onde foram feitas as considerações e conclusões que comporta.

de serem os ratos, talvez, depositarios do virus do typho exanthematico de São Paulo.

2. Em relação á infecção manifestada na zona suburbana ou rural da capital, embora admittido o papel dos ratos, outros possiveis depositarios do virus devem ser pesquisados entre roedores silvestres, conforme indicação dos resultados do estudo da fauna de ectoparasitas nelles encontrada.

3. Quanto á infecção manifestada na zona urbana, o papel do rato como depositario do virus, parece-nos ter sido o melhor demonstrado, embora ainda não definitivamente.

4. A hypothese de uma diversidade de infecções, de accordo com o meio suburbano ou rural e urbano, justifica-se pelo comportamento dos respectivos virus, sendo o que foi isolado de ratos da zona urbana, já na 4.<sup>a</sup> geração, muito menos pathogenico para a cobaia do que o já estudado e isolado de doentes provenientes da zona suburbana ou rural.

5. Somente os resultados de estudos clinicos e immunologicos (reacções sorologicas com os differentes typos de *Proteus X*), assim como a continuação das pesquisas experimentaes e epidemiologicas, confirmarão de modo definitivo a hypothese suggerida na conclusão anterior.

#### ABSTRACT

In the course of three new series of experiments undertaken with a view to finding out not only if certain species of Ixodid might carry the São Paulo typhus under experimental conditions (series I) and if some Arthropoda were naturally infected with its virus (series II), but also if rats might play the rôle of host to the virus (series III), new facts have come to light which may be summarized as follows:

#### SERIES I

1. *Amblyomma cajennense* (Fabr.) fed on a guinea-pig infected with the São Paulo typhus is capable of transmitting this infection to another guinea-pig, provided that it be crushed thirteen days after its feeding and be inoculated into this animal; the infection of this Ixodid, however, is not constant.

2. Larvae, hatched from eggs laid by an infected female of *Amblyomma cajennense*, upon inoculation into guinea-pigs, cause these to develop an inapparent infection as shown by the inoculation of the brain of these pigs into normal ones.

3. The only attempt to infect *Argas persicus* (Oken) was negative.

4. *Ornithodoros rostratus* Aragão may occasionally become infected by experimentally feeding on a guinea-pig at the infecting stage.

5. The sting of *Ornithodoros rostratus* thirteen days following its infection is infecting for the guinea-pig.

6. The sting of the same specimen of *Ornithodoros rostratus*, however, may not be infecting twenty-eight days following its contaminating feeding.

7. In the coxal liquid of an infected *Ornithodoros rostratus* is found the virus with infecting (immunizing) power for the guinea-pig.

8. The period of incubation in the guinea-pig's experimental infection by sting of an infected *Ornithodoros rostratus* is longer than that generally following intra-peritoneal inoculation of the virus into a guinea-pig.

## SERIES II

1. It is very unlikely for *Pediculus capitis*, *Pulex irritans* and *Cimex lectularius* to play the rôle of natural carriers of the virus of the São Paulo typhus, to judge from experiments made with the inoculation, into guinea-pigs, of specimens taken from patients, their beds or members of their family.

2. This conclusion holds good also for the following Arthropoda as captured in freedom or on rats, dogs, cats and chicken at infected places:

Pulicidae: *Xenopsylla cheopis*, *Xenopsylla brasiliensis*, *Ctenopsyllus musculi*, *Ceratophyllus fasciatus* and *Craneopsylla minerva*, as captured from rats and *Ctenocephalides felis* from dogs, cats and rats.

Pediculidae: *Linognathus piliferus*, dog's louse.

Ixodidae: *Amblyomma ovale* and *Rhipicephalus sanguineus*, dog's ticks, and *Boophilus microplus*, ox' tick, the latter at larval stage and captured in freedom.

Parasitidae and Dermanyssidae: *Echinolaelaps echidninus*, *Laelaps nuttalli* and *Liponyssus bacoti*, as captured on rats, the last species also on "preás" (*Cavia aperea*); *Liponyssus bursa*, as captured on chicken.

3. In the light of the fauna of ectoparasites found in the city districts, either rural or urban, where the infection has been reported, it appears that the ordinary carrier of the virus must be the rat's fleas in the urban districts, whilst this rôle must be played by some mite, either Dermanyssid (*Liponyssus bacoti*) or Ixodid, in the rural section. This hypothesis seems to be justified both by the epidemiology of the São Paulo typhus and the experimental behaviour of its virus; anyway, it coincides with the apparent specificity of the virus found in either section, thus rendering necessary the undertaking of new experiments in this regard.

## SERIES III

1. Rats seem to be the hosts of the virus of the São Paulo typhus to judge both from immunological cross-reactions and from the result of experiments previously reported on.

2. The ectoparasitic fauna found on some wild rodents seems to indicate that these may play the rôle of host to the virus in the rural section of this city.

3. However, house rats chiefly seem to play this rôle in the urban section according to experiments made although not very conclusive yet.

4. The behaviour of the virus isolated either in the rural or in the urban districts is different, the latter having become, in its fourth generation, much less pathogenic for the guinea-pig than the former.

5. The confirmation of the diversity of the type of typhus infection found in the urban districts from that reported from the rural section depends on further clinical and epidemiological study supplemented with a more complete experimentation.

#### BIBLIOGRAPHIA

1. Durand, P. & Conseil, E. — Arch. Inst. Pasteur Tunis XX(1):54.1931.
2. Banc, G. & Caminopetros, J. — C. R. Acad. Sciences CXCII(25):1682.1931.
3. Joyeux, Ch. & Pieri, J. — C. R. Acad. Sciences CXCII(11):705.1931.
4. Zinsser, H. & Castaneda, M. R. — J. Exper. Medicine LIV(1):11.1931.
5. Mooser, H. & Dummer, C. — J. Inf. Diseases XLVI(2):170.1930
6. Maxcy, K. F. — Public. Health Rep. XLIII:3079; XLIV:589.1929; XLIV:1735.1929.
7. Zinsser, H. & Castaneda, M. R. — J. Exper. Medicine LII(5):661.1930.
8. Durand, P. & Conseil, E. — Arch. Inst. Pasteur Tunis XX(1):54.1931.
9. Dyer, R. E. & Badger, L. F. — Science LXXIII(1886):10.1931.
10. Mooser, H.; Castaneda, M. R. & Zinsser, H. — J. Exper. Medicine LIV(4):567.1931.
11. Rocha Lima, H. da — Handbuch der path. Rick. Kolle e Wassermann, Bd. VIII: 1347.1930.
12. Fonseca, F. da — Apresentação á Semana do Laboratorio da Soc. Med. & Cir. de São Paulo. Janeiro 1932.
13. Dove, W. E. & Shelmire, B. — J. Amer. Med. Assn. XCVII(21):1506.1931.
14. Mooser, H.; Castaneda, M. R. & Zinsser, H. — J. Amer. Med. Assn. XCVII(4): 231.1931.
15. Dyer, R. E.; Rumreich, A., & Badger, L. F. — Science LXXIII(1886):10.1931; Publ. Health Rep. XLVI:334.1931.
16. Kemp, H. A. — J. Amer. Med. Assn. XCVII(11):775.1931.
17. Monteiro, J. Lemos — Brasil Medico XLV(47):1906.1931; Mem. Inst. Butantan VI: 1.º art.1931.

Este trabalho, agora revisto, foi apresentado á Semana de Laboratorio da Soc. Med. & Cir. de S. Paulo (Janeiro de 1932), em 3 Notas, resumidas em publicações in Brasil Medico XLVI (3): 49.1932; XLVI (8): 169.1932 e XLVI (9): 193.1932.

(Trabalho das Secções de Virus e de Parasitologia do Instituto Butantan, dezembro de 1931).



Fig. 1



Fig. 2

Figs. 1, 2 — Alimentação de *Ornithodoros rostratus* em cobaia.