

a febre maculosa em S. Paulo, foi possível agora prosseguir as experiências iniciadas no Instituto Butantan por Lemos Monteiro, usando-se como antígenos triturados de carrapatos infetados, muito ricos em rickettsias, para o preparo de sôros hiperimunes.

Neste trabalho descreveremos as nossas observações preliminares sobre o preparo em coelhos de um sôro contra a febre maculosa e estudaremos seus efeitos preventivo e curativo.

Em futura publicação, trataremos da possibilidade de obter êsses sôros em carneiros, cabras e cavalos, bem como de certas questões relativas ao seu mecanismo de ação propriamente dito.

### TÉCNICA

Utilizamos coelhos primeiramente inoculados com virus-sangue de cobaia e que, além de servirem para a alimentação de *Amblyomma cajennense* adultos infetados que se destinam ao preparo da vacina contra a febre maculosa, foram, posteriormente, por várias vêzes, picados e inoculados com emulsão de intestino de novos Ixodidas, também infetados. Assim, em coelhos previamente inoculados com virus-sangue de cobaia, colocavamos, por meio de dispositivo especial, duzentos carrapatos adultos infetados previamente nas fases de larva e ninfa, de modo a permitir uma alimentação parcial desses exemplares. Depois de cuidadosa remoção dos carrapatos que eram separados para o preparo da vacina, os coelhos entravam em repouso. Após dois meses, os poucos animais sobreviventes sofriam novas e repetidas sucções de outros pequenos lotes de Ixodidas infetados. Retirados êsses carrapatos parcialmente alimentados e, decorridos 8 dias, eram êles triturados e inoculados por via subcutânea nesses mesmos coelhos, para o que se procedia da seguinte forma: após rápida desinfecção da carapaça externa por meio de éter, os Ixodidas eram cuidadosamente abertos, cortando-se com tesouras finas os bordos laterais da carapaça; afastada a parte dorsal da parte ventral, retirava-se com pequena espátula o conteúdo interno formado na sua maior parte pelos intestinos, via de regra muito ricos em rickettsias. O material assim obtido era finamente triturado e misturado com solução salina, para em seguida ser inoculado nesses mesmos coelhos.

A inoculação desse material foi repetida no mínimo quatro vêzes antes do início das sangrias, que se sucederam após novas reinoculações de quantidades crescentes de triturados de Ixodidas, até atingir o máximo de quinze por coelho. Conseguimos ultimamente aumentar o número de coelhos que resistem a essas inoculações, assim como à longa permanência nos compartimentos do biotério, fazendo cuidadosa alimentação enriquecida com óleo de fígado de cação, con-

tendo no mínimo 2.000 unidades de vitamina A por ml, além de vitamina D.

A colheita do sangue era feita por punção cardíaca, retirando-se cada vez 20 ml de sangue, aproximadamente. Os sôros, após permanência na geladeira por uma noite, eram centrifugados e misturados, procedendo-se depois à filtração em discos Seitz EK. Acumulamos como resultados de várias sangrias, dois lotes de sôro anti-rickettsia. O primeiro lote, que denominamos *A*, de cerca de 200 ml, é a mistura dos sôros obtidos das primeiras sangrias; o outro lote, *B*, num total de cerca de 350 ml, é proveniente da mistura de sôros obtidos nas últimas sangrias.

Com uma pequena quantidade dessa mistura procuramos, como fez Topping, concentrar o sôro anti-rickettsia pelo método de Felton, mas essas experiências preliminares não nos mostraram resultados satisfatórios. Empregamos, assim, em nossas pesquisas, somente sôro *in natura*, não concentrado.

As cobaias usadas em nossas experiências foram sempre cuidadosamente escolhidas, procurando-se usar lotes de animais, de peso aproximadamente igual e proveniente do mesmo biotério de criação. Sempre que possível, usamos exemplares machos com o fim de facilitar a observação das reações escrotais. Esses animais em experiência eram mantidos, cada um, em compartimento isolado de nosso biotério, alimentados do mesmo modo e suas temperaturas tomadas na mesma ocasião.

O material infetante utilizado nestas investigações era constituído de sangue citratado de cobaias infetadas, coihido por punção cardíaca no segundo ou terceiro dia da reação térmica. Em quasi todas as experiências, a quantidade de sangue a se utilizar era superior a que se poderia obter de um único animal. Previsto o tipo de experiência e a quantidade de virus-sangue necessária, inoculavamos previamente várias cobaias com virus de passagem de um mesmo animal, sendo estas posteriormente sangradas no dia exato e a mistura de seus sangues usada para inocular as cobaias de prova. Provas de esterilidade do sangue afastavam a possibilidade de contaminações eventuais.

As nossas experiências podem ser assim resumidas:

A) *Neutralização "in vitro"*.

1. Mistura de sôro e virus e inoculação após 30 minutos de contacto, permanecendo a mistura durante esse tempo à temperatura ambiente.
2. Mistura de sôro e virus e inoculação após 30 minutos de contacto, permanecendo a mistura durante esse tempo à temperatura de 37° C.
3. Mistura de sôro e virus e inoculação após permanência no *frigo* por uma noite.

B) *Neutralização "in vivo"*.

1. Mistura de sôro e vírus e inoculação imediata em cobaias.
2. Vírus por via peritoneal e sôro por via subcutânea.
3. Vírus por via subcutânea e sôro por via peritoneal.

C) *Ação preventiva.*

1. Cobaias inoculadas com o sôro são infetadas em diferentes períodos com o vírus.

D) *Ação preventiva no período de incubação.*

1. Cobaias infetadas recebem o sôro em diferentes dias antes da reação térmica.

E) *Ação curativa.*

1. Cobaias infetadas recebem o sôro uma ou mais vêzes em diferentes dias da reação térmica.

## RESULTADOS

A) *Neutralização "in vitro"*.

Numa experiência preliminar procuramos avaliar a capacidade de neutralização do vírus pelo nosso sôro. Assim, quantidades variáveis do sôro foram misturadas a 0.5 ml de um vírus-sangue de cobaia, titulado no mesmo momento. Esse vírus demonstrou segura atividade até na diluição de 1 para 100, podendo-se, por esse modo, presumir que naquela dose de 0.5 ml usado na experiência, tínhamos no mínimo 50 doses infetantes. Os resultados obtidos demonstraram que o nosso sôro era capaz de proteger 50% das cobaias de prova, na dose de 0.1 ml. Essa experiência serviu-nos para orientar as doses de sôro a serem usadas nas experiências ulteriores.

1. *Mistura de sôro e vírus e inoculação após 30 minutos de contacto à temperatura ambiente.*

Quatro cobaias foram inoculadas, duas por via subcutânea e duas por via peritoneal, com 1 ml da mistura em partes iguais de sôro anti-rickettsia e vírus-sangue obtido de cobaia infetada e em plena reação febril. A mistura, antes de ser inoculada, permaneceu por 30 minutos à temperatura ambiente. Duas outras cobaias testemunhas foram inoculadas na mesma ocasião com 1 ml da

mistura em partes iguais de soro de coelho normal e virus-sangue, nas mesmas condições.

O Gráfico No. 1 mostra os resultados obtidos, observando-se completa proteção das cobaias inoculadas com a mistura soro anti-rickettsia-virus. As testemunhas reagem febrilmente, mas sobrevivem.

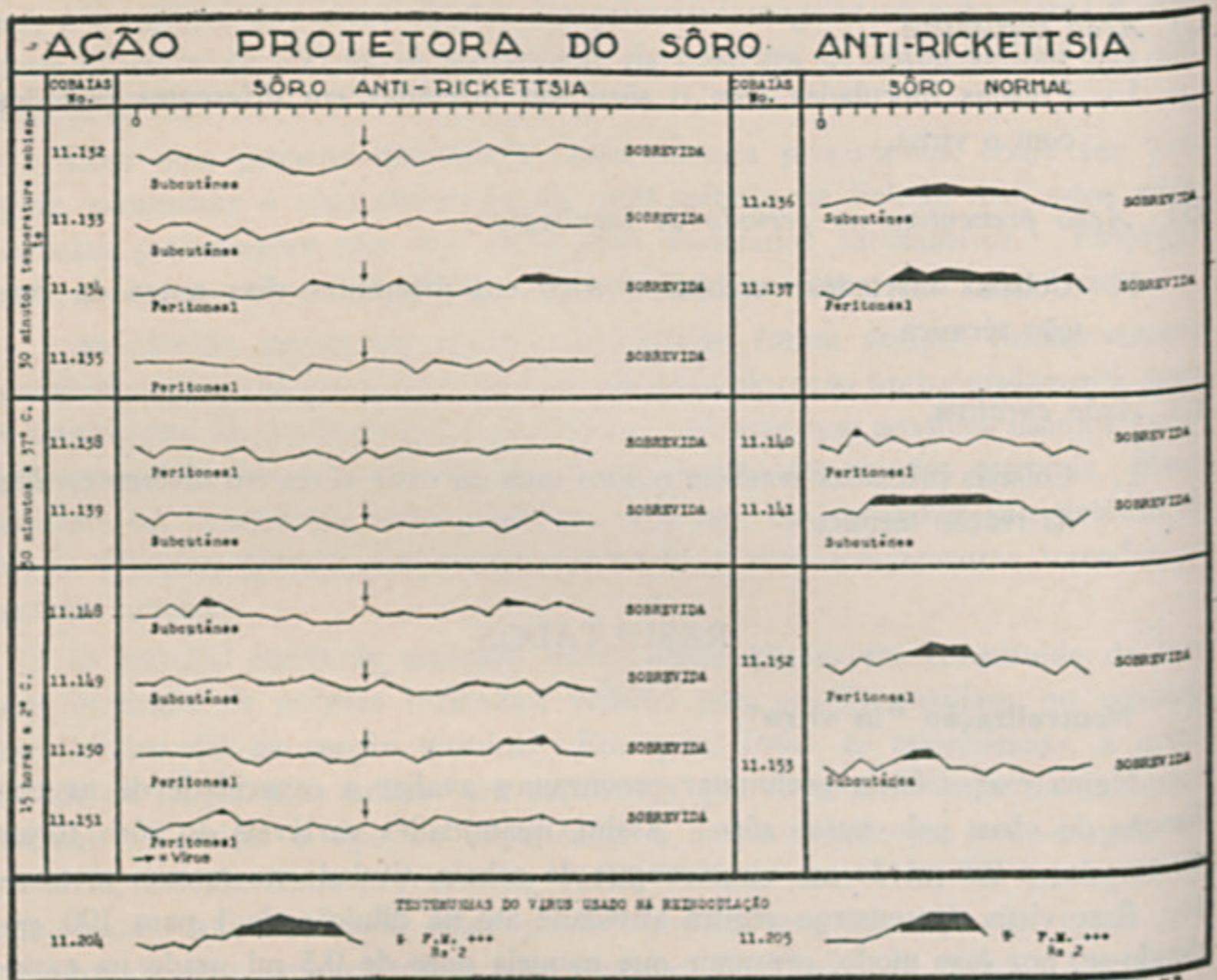


Gráfico No. 1

As cobaias de prova mostraram-se imunes quando posteriormente inoculadas com virus seguramente ativo, como evidenciam os gráficos das testemunhas do virus usado na reinoculação.

## 2. Mistura de soro-virus e inoculação após 30 minutos de contacto à temperatura de 37° C.

Duas cobaias foram inoculadas com 1 ml da mistura soro anti-rickettsia-virus, nas condições acima e, duas outras, testemunhas, foram inoculadas com a mistura soro normal-virus, em idênticas condições.

No mesmo Gráfico No. 1 as cobaias que receberam o sôro anti-rickettsia se mostram perfeitamente protegidas, enquanto que uma das testemunhas apresenta reação fraca e sobrevida. Ambas cobaias de prova foram posteriormente reinoculadas, mostrando-se perfeitamente imunes ao vírus de passagem.

3. *Mistura de sôro e vírus e inoculação após permanência no frigo por uma noite.*

Quatro cobaias foram inoculadas com mistura sôro anti-rickettsia-vírus que permaneceu na geladeira a 2.º C. durante 15 horas. O Gráfico No. 1 mostra a completa proteção das cobaias que receberam o sôro anti-rickettsia e, quando posteriormente reinoculadas com o vírus de passagem, uma imunidade satisfatória. As testemunhas apresentaram, também, infecções ligeiras e sobreviveram.

As experiências do Gráfico No. 1 ficaram aparentemente inconclusivas. O vírus usado nas misturas que permaneceram quer por 30 minutos na temperatura ambiente, quer por uma noite na geladeira, aparentemente não estavam em condições satisfatórias de virulência, pois as testemunhas que receberam a mistura sôro normal-vírus, não reagiram convenientemente.

Entretanto, o fato das cobaias de prova mostrarem uma sólida imunidade após a reinoculação de vírus de alta virulência, o que contrasta com o que se observa em geral na prática, chamou a nossa atenção. Como não tivéssemos feito testemunhas do vírus-sangue utilizado, sem mistura *in vitro* com o sôro de coelho normal, precisavamos inicialmente saber si, na realidade, havíamos trabalhado com vírus pouco ativo ou si o sôro normal, naquelas condições das misturas, era capaz de por si só atenuar a virulência do vírus. Procuramos verificar, então, si o mesmo fato se repetiria em nova experiência, tanto mais interessante quanto se observa no Gráfico No. 3 que as cobaias testemunhas — inoculadas com sôro normal-vírus imediatamente após a mistura — não mostraram um comportamento semelhante.

No Gráfico No. 2 vêm-se os resultados da repetição dessas experiências que visaram esclarecer essas dúvidas. Assim, as duas cobaias testemunhas, 15.488 e 15.489, inoculadas somente com o vírus, uma por via subcutânea e outra por via peritoneal, mostraram infecção típica.

Duas outras cobaias que testemunharam a ação das temperaturas a 37º C. por meia hora e 2.º C por 15 horas (cobaias 15.490 e 15.491) mostraram também infecção e incubação típica, excluindo dêsse modo uma possível ação dessas temperaturas sobre o vírus em experiência. Ao contrário, as cobaias testemunhas da mistura sôro normal-vírus e permanência a 37º C por 30 minutos ou permanência a 2º C por 15 horas, confirmaram o fenômeno observado na experiência anterior, isto é, uma certa ação do sôro normal de coelho sobre o vírus-sangue de cobaia infetada, quando mantidas as misturas em contacto du-

rante algum tempo, antes da inoculação nos animais de prova. As testemunhas da mistura soro normal-virus imediatamente inoculadas — Gráfico No. 3 — e, também, as testemunhas Nos. 15.484 e 15.487, nas quais o soro normal foi injetado por via diferente da do virus — Gráfico No. 2 —, mas na mesma ocasião, dizem-nos que esta ação de neutralização parcial do soro normal sobre

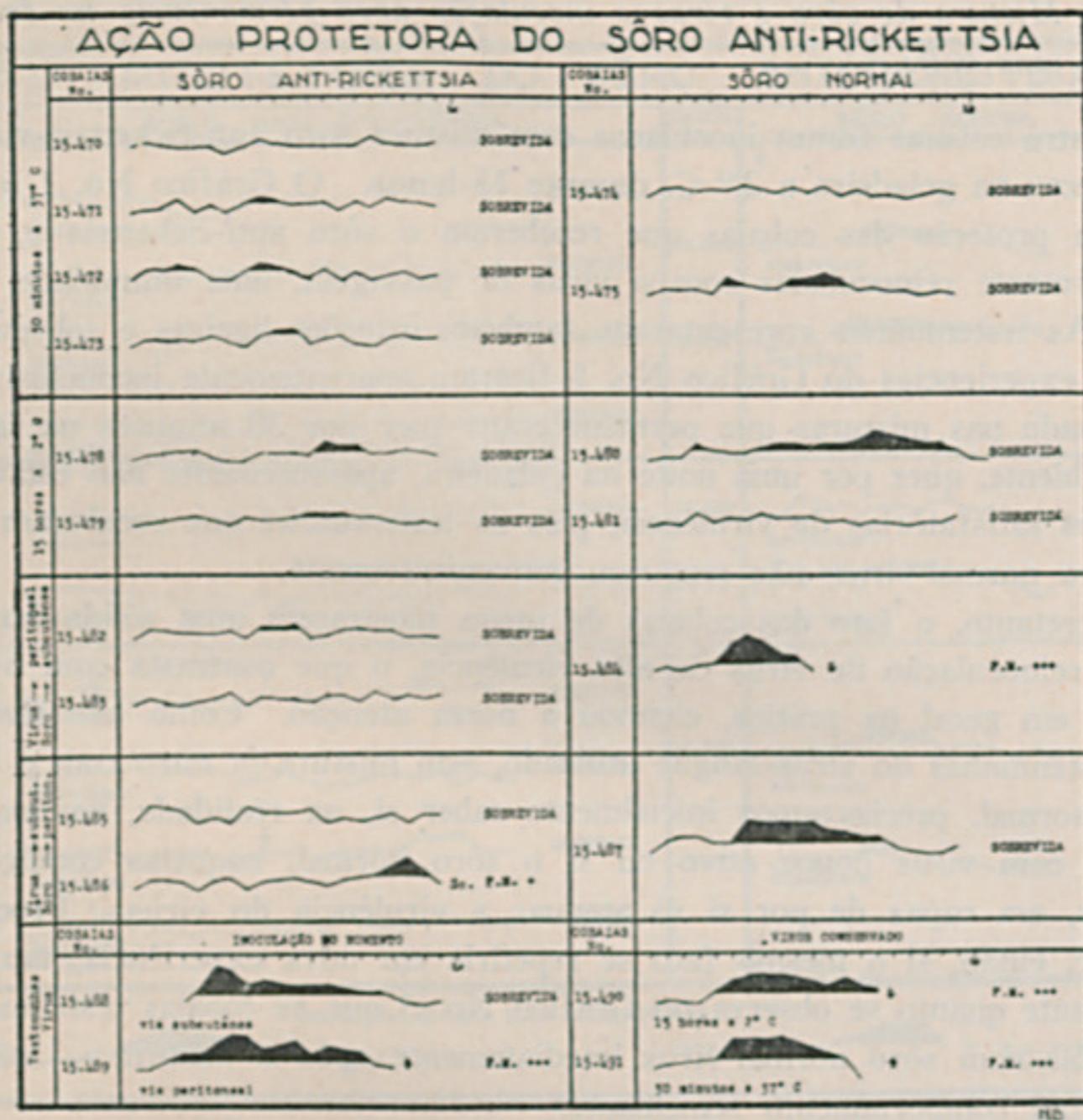


Gráfico No. 2

o virus não se manifesta *in vivo*, evidenciando-se, porém, somente, após prévio contacto *in vitro*, por determinado tempo.

Si aquelas experiências de ação protetora do soro anti-rickettsia ficam por esse fato, em parte, prejudicadas, contudo, não se pode negar uma definitiva ação de neutralização, pois não só as cobaias de prova do Gráfico No. 3, como ainda as cobaias de prova (15.842, 83, 85 e 86 do Gráfico No.2) da ação protetora *in vivo* do soro anti-rickettsia, em que este foi inoculado por via diferente do virus infetante, mas no mesmo momento, esclarecem de modo definitivo essa neutralização e excluem qualquer interferência que o soro normal pos-

sa exercer, o que, aliás, só foi observado nas experiências de mistura sôro normal-virus, com permanência mais ou menos prolongada *in vitro*.

Em trabalho ulterior descreveremos experiências atualmente em andamento que visam esclarecer êsse fato.

A julgar pelos resultados dessas experiências, o sôro anti-rickettsia apresenta um evidente poder neutralizante *in vitro*.

## B) Neutralização "in vivo".

### 1. Mistura de sôro e virus e inoculação imediata.

Quatro cobaias foram inoculadas com 1 ml da mistura em partes iguais de sôro do lote A e virus-sangue, imediatamente após a mistura, sendo que duas cobaias por via peritoneal e as duas outras por via subcutânea. Como testemunhas, duas cobaias, receberam 1 ml de uma mistura em partes iguais de virus e sôro de coelho normal, uma por via peritoneal e outra por via subcutânea.

No Gráfico No. 3 podemos ver os resultados. As cobaias que receberam a mistura sôro anti-rickettsia-virus não reagiram febrilmente e, posteriormente, quando reinoculadas com virus-sangue de passagem, mostraram-se imunes. As duas cobaias testemunhas, inoculadas com a mistura sôro normal-virus, não só reagiram febrilmente, como morreram de febre maculosa, apresentando esplenomegalia e reação escrotal típica.

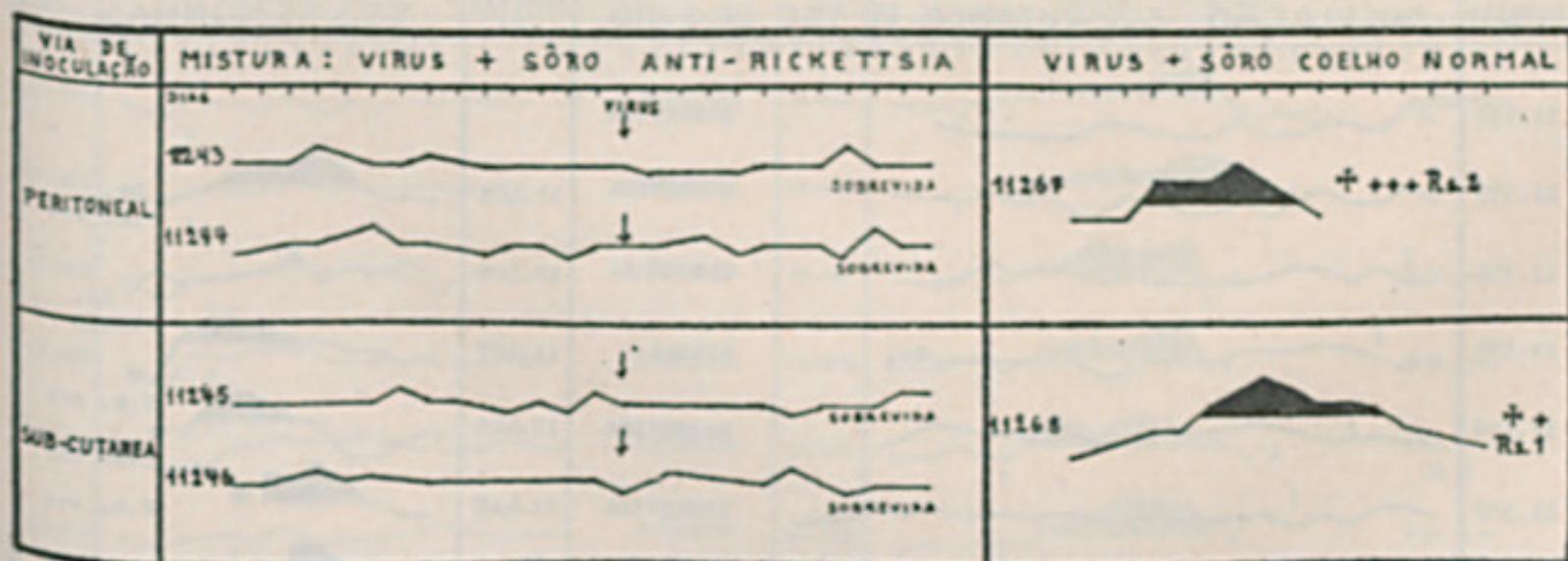


Gráfico No. 3

### 2. Virus por via peritoneal e sôro por via subcutânea.

Duas cobaias receberam 1 ml de sôro anti-rickettsia por via subcutânea e, no mesmo momento, 1 ml de virus-sangue por via peritoneal. A testemunha foi inoculada nas mesmas condições com 1 ml de sôro normal. O Gráfico No. 2 mostra os resultados favoráveis dessas experiências: as cobaias de prova foram protegidas enquanto que a que recebeu sôro normal apresentou reações típicas e morreu da infecção.

3. *Virus por via subcutânea e sôro por via peritoneal.*

Duas cobaias foram injetadas com 1 ml de virus-sangue por via subcutânea e, na mesma ocasião, receberam 1 ml de sôro-anti-rickettsia por via peritoneal. O Gráfico No. 2 mostra-nos que somente uma das cobaias revelou uma pequena alteração de temperatura após o longo período de incubação de 16 dias. Sacrificada, mostrou lesões de febre maculosa de pequena intensidade. A outra cobaia de prova não demonstrou nenhuma alteração, enquanto que a testemunha, inoculada nas mesmas condições com sôro normal, apresentou reação febril típica, mas sobreviveu à infecção.

Como se vê pelos resultados dessas experiências, a neutralização do virus se processa, também, *in vivo*, ainda mesmo quando o sôro e o virus são injetados por vias diferentes.

C) **Ação preventiva.**

1. *Cobaias inoculadas com o sôro são infectadas em diferentes periodos com o virus.*

Numa primeira experiência doze cobaias foram injetadas com 1 ml de sôro anti-rickettsia do lote A e, posteriormente, decorridas 15 horas, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 14, 16 e 19 dias, receberam 0.5 ml de virus-sangue por via peritoneal.

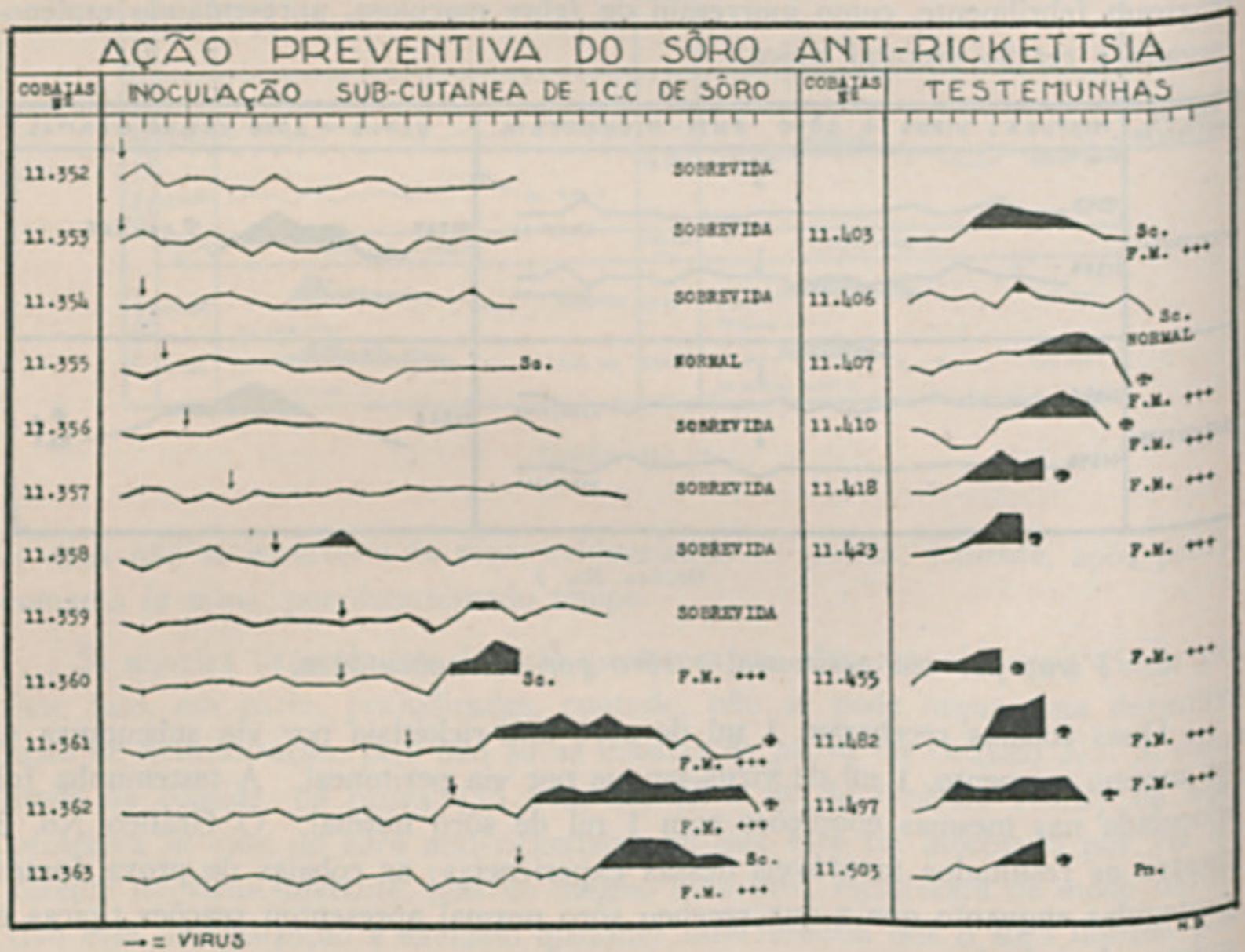


Gráfico No. 4

O Gráfico No. 4, onde estão expostos os resultados, mostra que somente a partir de 11 dias após a inoculação do sôro é que as cobaias começam a reagir francamente ao vírus, mostrando-se desprotegidas. Pelo comportamento das testemunhas, cuja maioria apresentou uma infecção típica com morte, pode-se deduzir, desde logo que, realmente, o sôro anti-rickettsia apresenta um nítido poder preventivo.

Uma nova experiência semelhante a esta foi realizada com sôro do lote B, sendo que as testemunhas desta experiência foram previamente inoculadas com sôro normal de coelho, afim de ser afastada uma possível causa de erro, o que não tinha sido realizado nas testemunhas da experiência anterior. Assim, 22 cobaias foram divididas em dois lotes, as cobaias de um deles receberam 2 ml de sôro anti-rickettsia e as do segundo lote (testemunhas) foram injetadas com 2 ml de sôro normal. Essas cobaias receberam posteriormente virus-sangue no 4.º, 5.º, 6.º, 7.º, 8.º, 10.º, 11.º, e 12.º dia, após a inoculação dos sôros.

O Gráfico No. 5 revela, em primeiro lugar, a nenhuma influência protetora do sôro normal de coelho sobre o desenvolvimento da infecção maculosa. Ao contrário, as cobaias que foram previamente tratadas com o sôro anti-rickettsia, mostram segura proteção nos primeiros dias, essa proteção tornando-se irre-

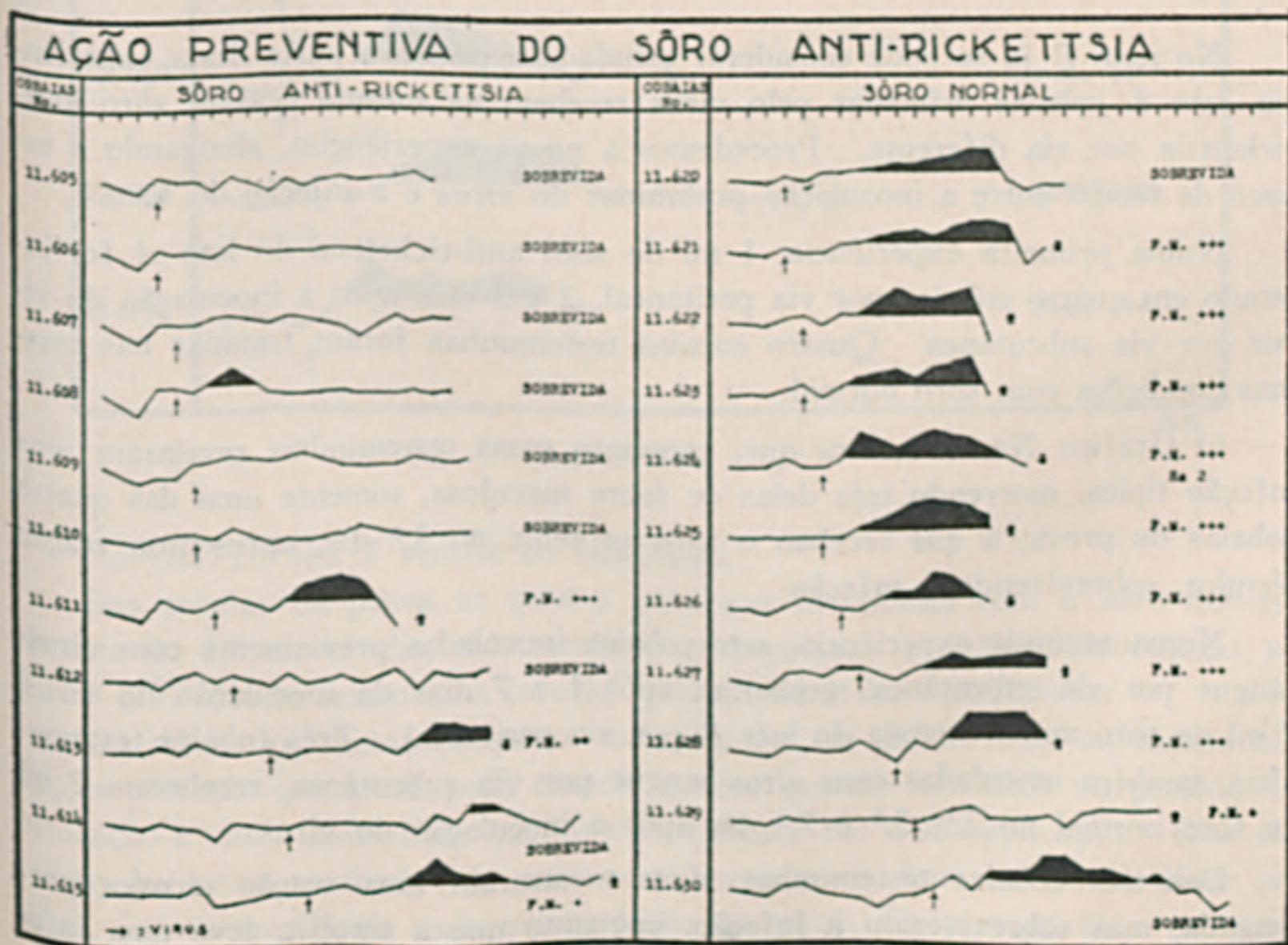


Gráfico No. 5

gular a partir do 7.<sup>o</sup> dia, apresentando as cobaias ou infecção nítida, como no caso da cobaia 11.611, ou proteção parcial com alongamento no período de incubação, como nas cobaias 11.613 e 11.615.

Essas experiências preliminares permitem, desde logo, observar um nítido poder preventivo do soro anti-rickettsia. É claro que elas não podem precisar o limite de proteção passiva do soro, pois, de um lado, a virulência variável dos virus inoculados nos diferentes dias não permite uma uniformidade experimental e, de outro lado, a pequena quantidade de soro de que dispunhamos não permitiu inocular maior número de cobaias ou usar maiores doses de soros, de modo tal que, para um mesmo dia e com um mesmo virus, grupos de pelo menos 10 cobaias de prova e outras tantas testemunhas, permitissem uma melhor apreciação dos resultados.

Até que ponto, depois de uma inoculação de virus, o soro anti-rickettsia protege contra a infecção, o item seguinte procura esclarecer.

#### D) Ação preventiva no período de incubação.

##### 1. *Cobaias infetadas recebem o soro em diferentes dias, antes da reação térmica.*

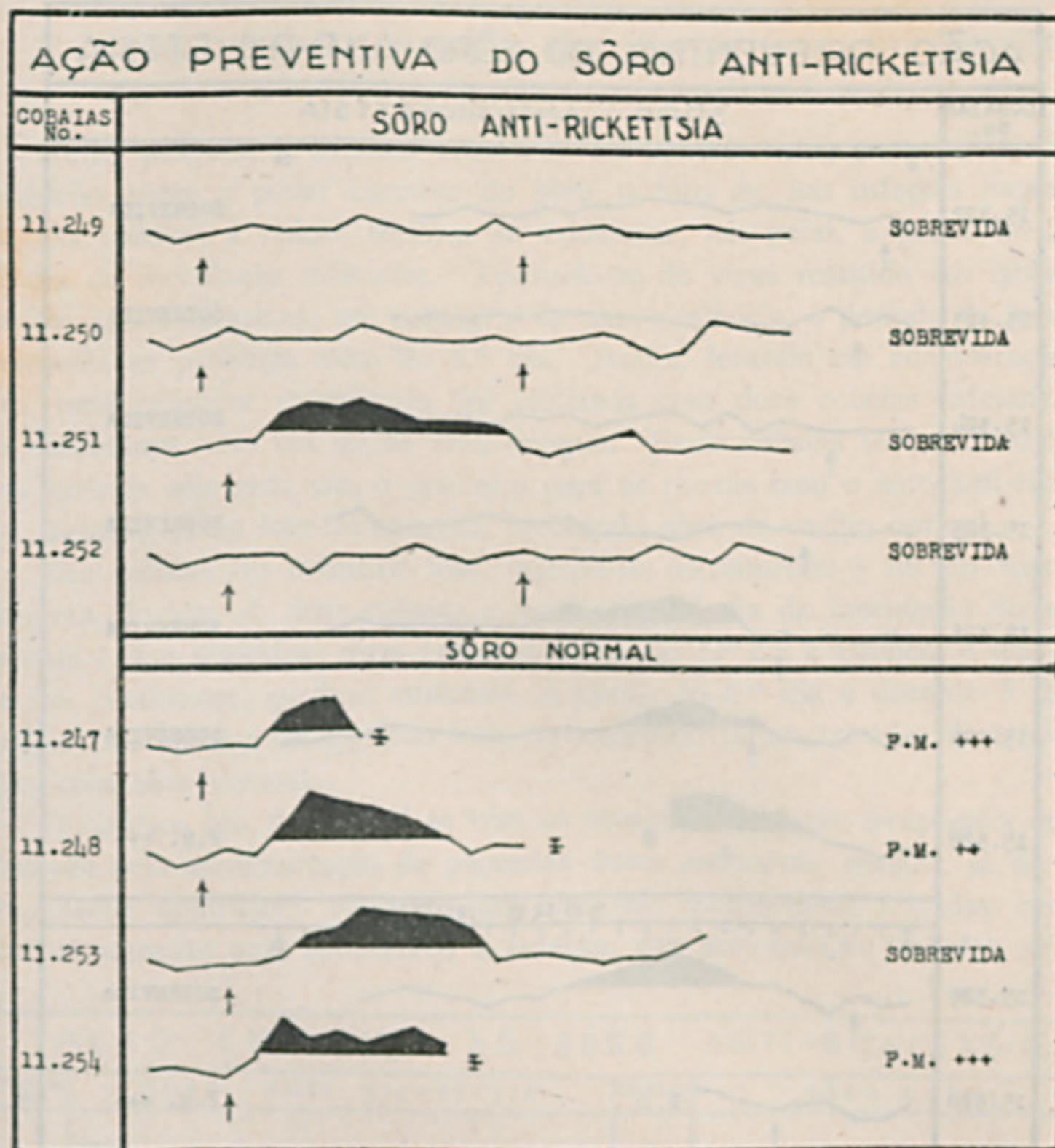
No item *B* já se pode considerar estudada a primeira parte desta experiência, isto é, cobaias infetadas pelo virus recebem na mesma ocasião soro anti-rickettsia por via diferente. Procedemos a novas experiências, alongando o espaço de tempo entre a inoculação preliminar do virus e a injeção do soro.

Numa primeira experiência, 1 ml de soro anti-rickettsia do lote *A* foi injetado em quatro cobaias por via peritoneal, 2 e 3 dias após a inoculação do virus por via subcutânea. Quatro cobaias testemunhas foram tratadas nas mesmas condições com soro normal.

O Gráfico No. 6 mostra que, enquanto essas testemunhas revelaram uma infecção típica, morrendo três delas de febre maculosa, somente uma das quatro cobaias de prova, a que recebeu o soro protetor no 3.<sup>o</sup> dia, apresentou reação térmica, sobrevivendo à infecção.

Numa segunda experiência, sete cobaias inoculadas previamente com virus-sangue por via subcutânea receberam após 1 a 7 dias da inoculação do virus, 2 ml de soro anti-rickettsia do lote *B* por via peritoneal. Três cobaias testemunhas, também inoculadas com virus-sangue por via subcutânea, receberam 2 ml de soro normal no 2.<sup>o</sup>, 5.<sup>o</sup> e 7.<sup>o</sup> dia após a inoculação do virus.

Das três cobaias testemunhas, duas mostraram uma reação térmica prolongada, mas sobreviveram à infecção, enquanto que a terceira teve uma infecção mortal, mostrando à necrópsia lesões típicas.



N.B

Gráfico No. 6

No Gráfico No. 7 vêm-se os resultados.

Das cobaias de prova as quatro primeiras inoculadas com o sôro anti-rickettsia do 1.º ao 4.º dia, mostraram-se protegidas. As cobaias inoculadas no 5., 6.º e 7.º dia sofreram uma infecção comparável à das testemunhas.

Os resultados destas pesquisas mostram-nos, de modo mais ou menos nítido, a proteção que ainda pode exercer o sôro quando inoculado no período de incubação e tanto mais eficaz quanto mais precoce fôr a sua aplicação. Elas são reforçadas pelos resultados de uma outra experiência feita no limite desse período, isto é, no 4.º dia após a inoculação do virus, dia em que já a primeira manifestação térmica da infecção pode ser observada em grande número de ani-

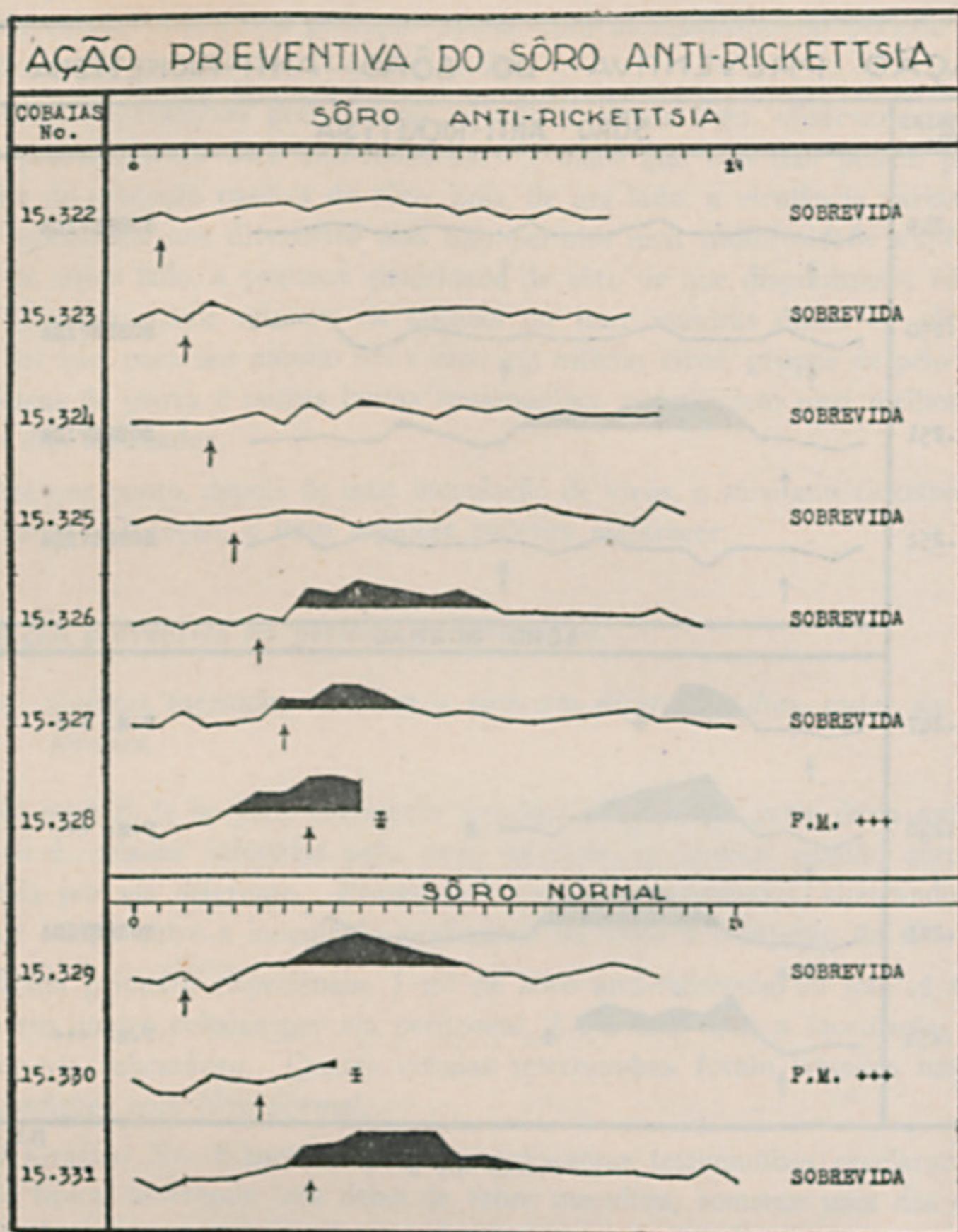


Gráfico No. 7

mais. Essa experiência, que é descrita com minúcia no item seguinte e cujos resultados estão expostos no Gráfico No. 9, mostra, de modo nítido, a proteção eficiente do sôro anti-rickettsia ainda quando inoculado tardiamente no período de incubação ou mesmo quando a primeira manifestação térmica da infecção é observada.

Esses resultados, parece-nos, não deixam lugar a dúvidas sobre o nítido valor profilático do sôro.

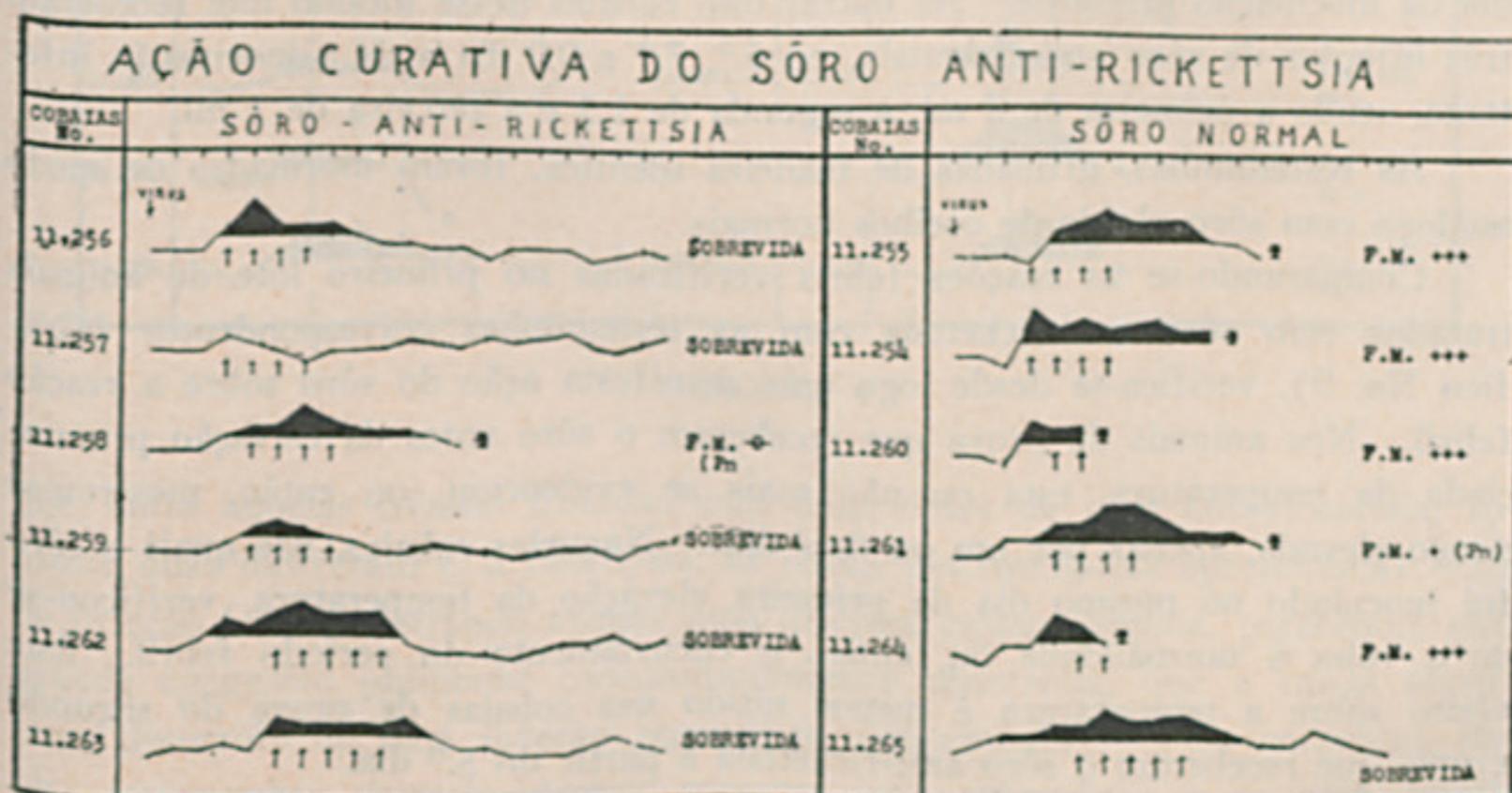
E) Ação curativa.

1. *Cobaias infetadas recebem o sôro uma ou mais vêzes em diferentes dias da reação térmica.*

Numa pesquisa preliminar tomou-se em consideração, para início das experiências sôbre o poder curativo do sôro, o fato de, nas infecções experimentais das cobaias, a reação térmica se evidenciar, em geral, a partir do 3.<sup>o</sup> ou 4.<sup>o</sup> dia da inoculação infetante. Tratando-se de virus mantido em laboratório por passagens sucessivas em cobaias e de alta virulência, o período de incubação raramente se prolonga além do 6.<sup>o</sup> dia. Assim, levando em consideração êsse fato, uma primeira experiência foi realizada com doze cobaias infetadas, por via subcutânea, com 0.5 ml de virus-sangue. Essas cobaias foram divididas em dois lotes de seis cada um, o primeiro para as provas com o sôro anti-rickettsia e o segundo, como lote-testemunha, recebendo sôro de coelho normal.

Nas cobaias do primeiro lote, injetou-se diariamente 1 ml do sôro anti-rickettsia do lote A, duas cobaias a partir do 4.<sup>o</sup> dia da inoculação do virus e durante 4 dias seguidos; duas outras a partir do 5.<sup>o</sup> dia e também 4 dias seguidos; e, finalmente, as duas restantes, a partir do 6.<sup>o</sup> dia e durante 5 dias seguidos. As cobaias do segundo lote, testemunhas, foram tratadas de modo análogo, com sôro normal.

O Gráfico No. 8, no qual se vêem os resultados da ação terapêutica do sôro, realizada pela administração de pequenas doses sucessivas, mostra, já de início, um grande contraste: enquanto que das seis testemunhas tratadas com sôro normal somente uma sobreviveu à infecção, das seis cobaias tratadas pelo sôro



→ = dia de sôro

Gráfico No. 8

anti-rickettsia somente uma morreu, não mostrando esta última, à necrópsia, apesar de sua curva térmica ter sido típica de febre maculosa experimental, lesões macroscópicas apreciáveis, morrendo de pneumonia secundária. As testemunhas, ao contrário, mostraram lesões típicas e pronunciadas, com uma única exceção, a da cobaia No. 11.261.

No que diz respeito ao efeito do soro sobre a reação térmica, a curva da cobaia No. 11.257, a única que não reagiu febrilmente, pode ser interpretada ou como uma infecção inaparente, ou como efeito inibidor do soro, uma vez que ela foi inoculada antes da alteração nítida da temperatura, inoculação, portanto, no período de incubação. A curva térmica da cobaia 11.259 parece mostrar, por sua benignidade, um certo efeito do soro, mas isto certamente contrastada com as curvas térmicas das demais cobaias, nas quais esse fato não foi verificado.

Numa segunda experiência, foi diminuído o número de injeções, porém, aumentadas as doses de soro anti-rickettsia. Trinta e duas cobaias, todas machos e de peso oscilando entre 350 e 450 g, foram inoculadas na mesma ocasião com vírus-sangue proveniente de várias cobaias infetadas e em pleno período febril. Cada cobaia recebeu 0.5 ml da mistura sanguínea citratada (vírus-sangue) por via subcutânea e foi individualmente colocada em compartimento separado de nosso biotério, sendo as temperaturas tomadas na mesma hora, com termômetros mantidos em soluções antissépticas antes do uso em cada animal.

Essas 32 cobaias foram divididas em dois grandes lotes: o primeiro tratado com soro anti-rickettsia e o segundo com soro de coelhos normais. Das cobaias tratadas com soro anti-rickettsia, oito receberam duas injeções de soro, com intervalo de 48 horas, a primeira de 2 ml no 4.º dia e a segunda de 1.5 ml no 6.º dia da inoculação infetante. As outras oito cobaias desse mesmo lote receberam três injeções de soro anti-rickettsia, no 5.º, 7.º e 9.º dia após a inoculação infetante, sendo a primeira de 2 ml, a segunda de 1.5 e a terceira de 1 ml.

As testemunhas, grupadas de maneira idêntica, foram inoculadas de modo análogo com soro obtido de coelhos normais.

Comparando-se as reações febris verificadas no primeiro lote de animais tratados com soro anti-rickettsia com as testemunhas correspondentes (Gráfico No. 9), verifica-se desde logo uma manifesta ação do soro sobre a reação febril. Nos animais de prova que receberam o soro antes da elevação pronunciada da temperatura, esta ou não mais se evidenciou, ou então, mostrou-se pouco elevada, apenas por um ou dois dias. Naquelas cobaias, nas quais o soro foi inoculado no mesmo dia da primeira elevação da temperatura, verificou-se ou a volta à normalidade ou, então, o encurtamento do período febril. Este efeito sobre a temperatura é menos nítido nas cobaias de prova do segundo grupo, que receberam o soro anti-rickettsia a partir do 5.º dia.

Quanto à ação do soro anti-rickettsia, impedindo a alta mortalidade peculiar à febre maculosa experimental em cobaias, o contraste é evidente, pois

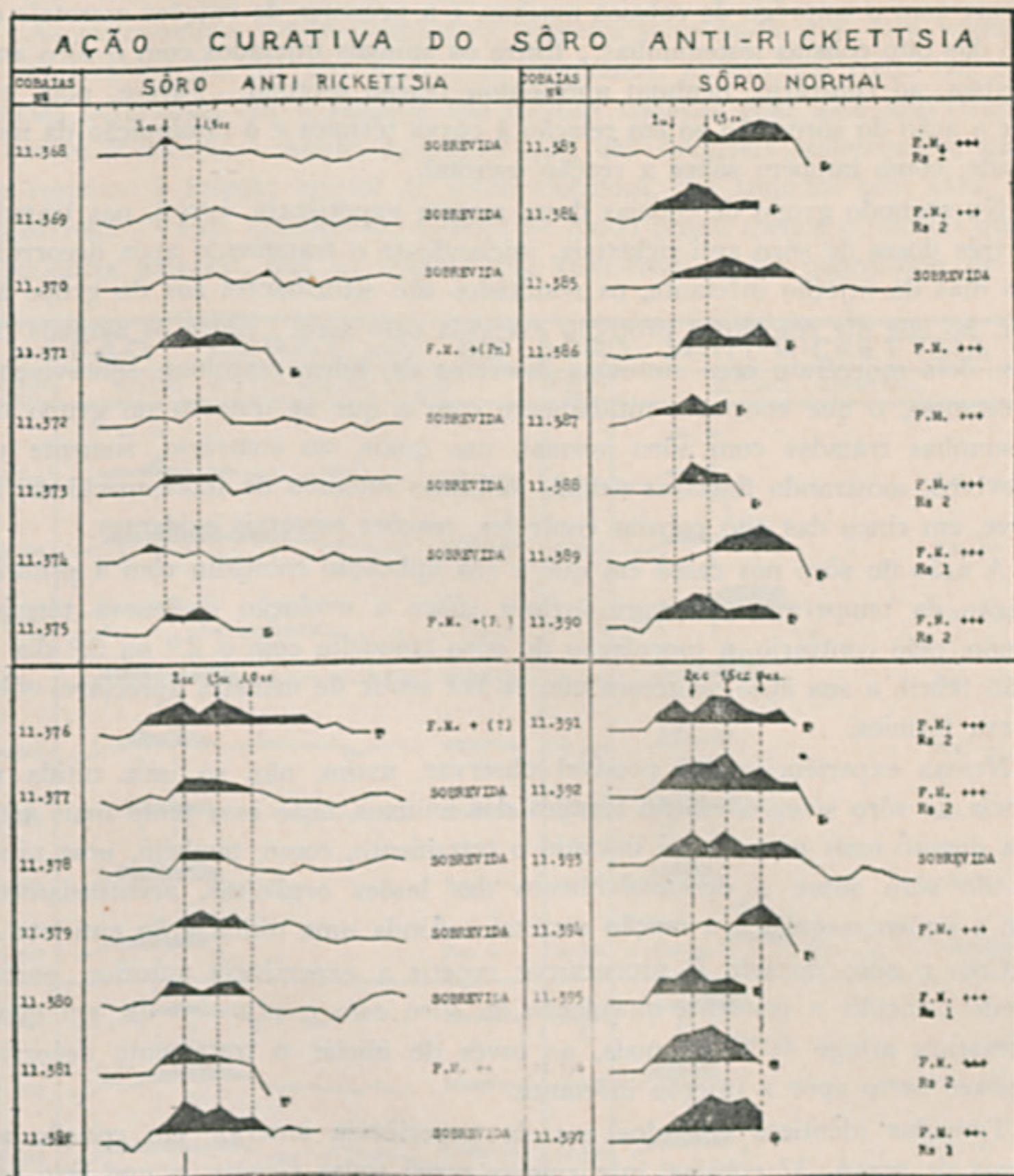


Gráfico No. 9

que, entre aquelas cobaias tratadas com duas doses de sôro anti-rickettsia, somente duas morreram e, à necrópsia, as lesões macroscópicas apresentadas eram de infecção fraca, mostrando apenas uma discreta esplenomegalia, parecendo, pela grande congestão pulmonar concomitantemente observada, que a *causa mortis* teria decorrido de uma infecção secundária (pneumonia). Pelo contrário, das oito testemunhas correspondentes, somente uma sobreviveu e as sete demais apresentaram ao exame macroscópico lesões graves de febre maculosa.

Outro fato que se reveste de interêsse, tratando-se de experiências feitas somente com o emprêgo de cobaias machos, é a presença de reações escrotais em cinco das oito cobaias testemunhas. Entre os animais injetados com o sôro anti-rickettsia, ao contrário, nenhum apresentou reação escrotal. Parece, pois, evidente a ação do sôro, não só em relação à curva térmica e à diminuição da mortalidade, como também sôbre a reação escrotal.

No segundo grupo de cobaias desta mesma experiência, isto é, nas tratadas com três doses de sôro anti-rickettsia, iniciando-se o tratamento após decorridos cinco dias da injeção infetante, os resultados são semelhantes aos do grupo anterior, no que diz respeito à proteção exercida pelo sôro. Entre os animais tratados, dois morreram com sintomas discretos de febre maculosa, sobrevivendo os restantes, o que contrasta nitidamente com o que se observa no grupo das testemunhas tratadas com sôro normal, nas quais, ao contrário, somente um sobreviveu, mostrando todas as demais sintomas intensos de febre maculosa, inclusive, em cinco das oito cobaias contrôles, reações escrotais evidentes.

A ação do sôro nos casos em que a sua aplicação coincidiu com a primeira elevação da temperatura, sempre influiu sôbre a evolução da curva térmica. Quando, pelo contrário, a inoculação do sôro coincidiu com o 2.<sup>o</sup> ou 3.<sup>o</sup> dia da reação febril, a sua ação protetora não se fez sentir de maneira apreciável sôbre a curva térmica.

Nessas experiências foi possível observar, assim, não só uma nítida influência do sôro sôbre a reação térmica dos animais, ação essa tanto mais acentuada quanto mais precoce foi iniciado o tratamento, como, também, uma nítida ação do sôro sôbre o desenvolvimento das lesões orgânicas, acentuadamente sôbre a esplenomegalia e a reação escrotal. Ainda uma nítida ação anti-letal.

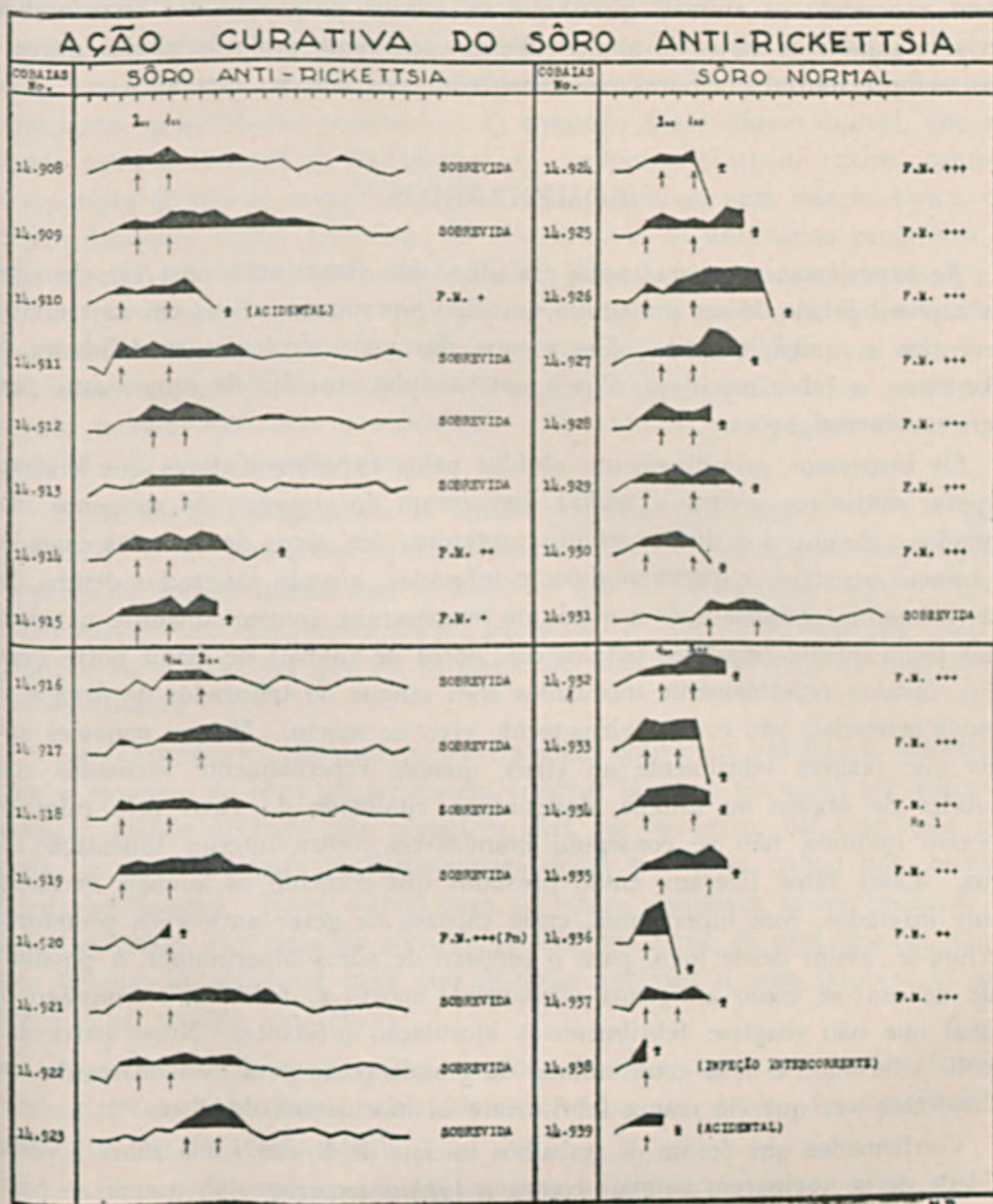
Com o sôro do lote B procuramos repetir a experiência anterior, porém, fazendo coincidir a primeira inoculação do sôro com o primeiro dia em que a temperatura atinge 40°C ou mais, ao invés de iniciar o tratamento decorrido um prazo certo após a injeção infetante.

Tomados idênticos cuidados aos da experiência anterior em relação aos animais de prova, 32 cobaias, infelizmente quasi todas fêmeas, o que veio prejudicar a observação referente às reações escrotais, foram inoculadas com vírus-sangue obtido de várias cobaias infetadas com uma mesma amostra de vírus. Cada uma das 32 cobaias recebeu 0.5 ml da mistura de sangue citratado, por via subcutânea.

A metade das cobaias de prova recebeu 2 ml de sôro anti-rickettsia no primeiro dia em que a temperatura atingiu 40°C ou mais e, decorridas 48 horas (seis cobaias) ou 72 horas (duas cobaias), mais 1 ml. A outra metade do lote de prova recebeu, nas mesmas condições, uma primeira injeção de 4 ml de sôro anti-rickettsia e, decorridas 48 horas (cinco cobaias) ou 72 horas (duas cobaias), uma segunda injeção de 2 ml.

As testemunhas foram tratadas de maneira semelhante com sôro normal.

O Gráfico No. 10, que resume os resultados, mostra, tal como nas experiências anteriores, que a maioria das cobaias tratadas com sôro anti-rickettsia sobrevive à infecção. Assim, enquanto que, das dezesseis testemunhas, quinze não resistem à infecção mortal de febre maculosa, das tratadas com sôro, doze sobrevivem. Vê-se, igualmente, embora de modo muito menos nítido do que na experiência anterior, que as cobaias que receberam maior quantidade de sôro



(Segundo fotografia do S. P. H. A. N.).

Gráfico No. 10

restabeleceram-se, no que diz respeito à reação térmica, mais prontamente do que as que receberam menor dose. Esta experiência veio, assim, confirmar a anterior.

Não se pode negar, pelos resultados dessas experiências, que o soro anti-rickettsia tem um evidente poder curativo sobre a infecção maculosa experimental da cobaia. Como é natural, esse efeito protetor é tanto mais evidenciável, quanto mais precocemente forem tratados os animais infetados. Nas nossas experiências feitas a partir do 5.º dia de febre, nenhum resultado nítido se obtem, morrendo os animais quasi que na mesma proporção dos testemunhas. Em se tratando de virus de alta virulência, com uma evolução clínica grave e quasi sempre mortal, melhores resultados não poderiam ser esperados.

### COMENTÁRIOS

As experiências expostas neste trabalho, que visam mais uma vez demonstrar a possibilidade de ser preparado um soro hiperimune, eficaz em seus efeitos preventivo e, quiçá, curativo, contra uma das mais virulentas modalidades de rickettsiose, a febre maculosa, abrem um caminho sem dúvida interessante para ulteriores investigações.

Os insucessos primitivamente obtidos pelos experimentadores que visaram preparar anti-sôros contra o *typhus* decorreram do emprêgo de antígenos inadequados. Assim, aos nítidos efeitos protetores dos sôros de convalescentes ou de animais sensíveis experimentalmente infetados, quando sangrados dentro das duas primeiras semanas após a queda de temperatura, contrapunham-se os resultados praticamente negativos obtidos com sôros de animais de maior porte (carneiro, cavalo) repetidamente inoculados com sangue ou triturados de órgãos de cobaias infetadas, isto é, com virus-tecido vivo ou morto. Mesmo naqueles animais que reagem febrilmente ao virus, quando repetidamente vacinados com emulsões de órgãos ou sangue, destruída a vitalidade do virus pelo calor ou processo químico, não se conseguiu imunizá-los contra ulterior inoculação do virus. Esses fatos fizeram, então presumir que somente os animais verdadeiramente infetados, com hipertermia, eram capazes de gerar anticorpos protetores. Excluía-se, assim desde logo, para o preparo de sôros hiperimunes, a possibilidade de usar-se como antígenos virus-tecido morto e, também, o emprêgo de animal que não reagisse febrilmente à inoculação infetante. Nesse particular, Nicolle seleccionou o asno como animal de grande porte para essa ordem de trabalhos, uma vez que êle reagia febrilmente às inoculações do virus.

Confirmados que foram os trabalhos iniciais de Rocha Lima sobre a possibilidade de se vacinarem animais contra o *typhus* experimental, usando-se como vacinas emulsões ricas em rickettsias, mesmo mortas (fenoladas), tal como fi-

cou perfeitamente demonstrado pelos estudos em tórno das vacinas de Weigl e Spencer-Parker, as pesquisas ulteriores orientaram-se nesse sentido. Zinsser e sua escola trataram desde logo de obter grandes quantidades de rickettsias a serem usadas como antígenos, e o emprêgo de diferentes meios técnicos veio demonstrar que não só no artrópodo vetor é possível conseguí-las. Nos próprios animais de laboratório, ou em culturas-tecido, conseguem-se hoje emulsões muito ricas em rickettsias, que podem ser utilizadas como antígenos, não só para o preparo de vacinas, como para o de sôros hiperimunes.

Nas tentativas já feitas nesse sentido têm-se usado ora o coelho, ora o cavalo, como animais capazes de se hiperimunizarem e fornecerem sôros com apreciáveis propriedades protetoras. O emprêgo dêsse último animal, que responde apreciavelmente às inoculações do antígeno-rickettsia, exclue, também, a suposição de que só naqueles animais que apresentam uma infecção típica, com desenvolvimento febril, pudessem ser encontrados os anticorpos protetores em teor apreciável. No momento, estamos imunizando cavalos por inoculações repetidas de antígeno-rickettsia e já podemos afirmar, pelas provas preliminares que temos realizado, que êsses animais respondem ao antígeno com um desenvolvimento apreciável de anticorpos protetores. Em trabalho a ser publicado a seguir, mostraremos essa possibilidade, bem como as provas que usamos para avaliação do teor de anticorpos.

Neste trabalho expusemos as nossas pesquisas preliminares sôbre a possibilidade de se preparar sôros hiperimunes em coelhos. Hoje, êsses animais já são empregados rotineiramente nos laboratórios que se dedicam ao fabrico do sôro anti-pneumocócico, não sendo assim, portanto, um animal a desprezar pelo seu pequeno porte, uma vez que êle se revele de valia na produção de sôros hiperimunes eficazes.

Nas experiências, expostas neste trabalho, obtivemos resultados animadores com o emprêgo do sôro preparado em coelhos, já como elemento preventivo da doença, quando aplicado nos primeiros dias que decorrem da inoculação infectante, já como elemento profilático, para evitar por certo tempo uma provável e ulterior infecção. Neste último caso, as atuais pesquisas fazem presumir que essa prevenção, por meio do sôro, se realiza por cêrca de uma semana, tempo, sem dúvida, já suficiente para que se possa recorrer a uma imunização ativa pela vacina, sempre mais eficaz.

As nossas experiências sôbre o poder curativo, tais como as de Topping, também foram animadoras, sobretudo aquelas em que o sôro foi inoculado nos primeiros dias da reação febril.

Enfim, essas experiências animam-nos a prosseguir nessa ordem de pesquisas.

## CONCLUSÕES

Um soro anti-rickettsia, preparado em coelhos, mostrou evidente poder neutralizante sobre o vírus da febre maculosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. Também puderam ser demonstrados efeitos preventivo e curativo sobre a infecção experimental da cobaia.

## ABSTRACT

The experiences performed in 1931 by Lemos Monteiro, at the Instituto Butantan, in regard to the obtention of hyperimmune anti-*Rickettsia* sera active against the "São Paulo typhus" (Spotted fever in São Paulo) were continued by the authors, who were able to prepare a serum in rabbits of evident preventive and curative properties, such, as that recently obtained by Topping, in the United States.

The technic employed is described in detail. Rabbits infected with virus-blood and used for the feeding of *Amblyomma cajennense* specimens destined for the preparation of the vaccine, were employed for the obtention of the serum after a two months rest. After being submitted to repeated bites and inoculated with triturations of new lots of infected adult *Ixodidae*, they were bled several times. The tests were made in experimentally infected guinea pigs.

The serum thus obtained showed: 1) Neutralizing power on the virus' action, both *in vitro* and *in vivo*; 2) effectiveness in immunizing passively for about a week; 3) effectiveness in preventing the infection when inoculated during the incubation period; 4) curative action when inoculated in the first days of the thermic reaction, evidenciating, mainly, the lessened intensity of the organic lesions and distinct fall of mortality.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nicolle, C. & Conseil, E. — C. R. Acad. Sc. 151: 598.1910.
2. Nicolle, C. et al. — Bull. Acad. Med. 75:95.1916; Ann. Inst. Pasteur 30:446.1916 et Presse Méd. 33:1.224.1925.
3. Felix, A. — A system of bacteriology 7: 422.1930.
4. Nicolle, C. & Conseil, E. — Arch. Inst. Pasteur Tunis 14: 355.1925.
5. Rocha Lima, R. — Münch. med. Wschr. 65:1.454.1918.
6. Weigl, R. — Przeg. Epidem. 1:15.1920 in A System of bacteriology 2 1930.
7. Weil, E. & Breinl, F. — Ztschr. f. Immunitätsforsch. 39:330.1924.
8. Doerr, R. & Schnabel, A. — Wien. Klin. Woch. 32:523 et 891.1919.
9. Weigl, R. — Arch. Inst. Pasteur Tunis 22: 315.1933 et Bull. Internat. Acad. Polonaise Sc. et Lettres 125.1930.

10. *Spencer, R. R. & Parker, R. R.* — U. S. Publ. Health Rep. 40:2.159.1925.
11. *Nigg, C. & Landsteiner, K.* — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 28:3.1930; J. Exp. Med. 61:17.1935 et 63:341.1936.
12. *Zinsser, H. et al.* — J. Exp. Med. 51:847.1930 et 57:380.1933; Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 29:840.1932 et 35:85.1936.
13. *Zinsser, H. et al.* — Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 37:604.1937 et C. R. Soc. Biol. 127:229.1938.
14. *Cox, H. R.* — U. S. Publ. Health Rep. 53:2.241.1938.
15. *Castañeda, M. R.* — Amer. J. Path. 15:467.1939.
16. *Durand, P. & Sparrow, H.* — Arch. Inst. Pasteur Tunis 29:1.1940.
17. *Durand, P. & Balozet, L.* — Arch. Inst. Pasteur Tunis 29:363.1940 et 30:1.1941.
18. *Heinemann, W. & Morre* — J. Inf. Dis. 10:294.1912.
19. *Monteiro, J. Lemos* — Mem. Inst. Butantan 6:13.1931.
20. *Topping, N. H.* — U. S. Publ. Health Rep. 55:41.1940.

(Trabalho da Seção de Virus e Virusterapia do Instituto Butantan. Apresentado à Soc. de Biol. de S. Pau'o, sessão de 8-4-941. Entregue para publicação em novembro de 1942 e dado à publicidade em fevereiro de 1943).



# AÇÃO DA PRATA ELETROLISADA SÔBRE CERTAS TOXINAS, VENENOS, PROTOZOÁRIOS, RICKETTSIAS, VIRUS FILTRÁVEIS E BACTERIÓFAGOS

(Nota prévia)

POR

J. TRAVASSOS & E. BIOCCA

Uma corrente elétrica contínua, passando entre eletrodos de prata imersos em água, provoca uma dissociação iônica desse metal. A quantidade de prata dissociada é regulada pela lei de Faraday e corresponde teoricamente a 4.023 g por hora, si a intensidade elétrica for de 1 Ampere.

As pesquisas de Krause e outros demonstraram que êsses ions de prata são dotados de potentíssima ação bactericida.

As aplicações desses estudos no campo da hygiene são hoje inúmeras. Sabe-se que, por êsse meio, se conseguem destruir rapidamente nas águas as formas vegetativas das bactérias e aquelas, assim tratadas, mantêm por muito tempo a atividade esterilizante. Segundo citam Alessandrini e Labranca, seria suficiente uma quantidade de prata eletrolisada inferior a 100 $\gamma$  para esterilizar 1 litro de água potável; 150 — 200 $\gamma$  para água de piscinas e 400 $\gamma$  para fabricação de gelo. Até mesmo as algas de vegetações verdes perderiam rapidamente a vitalidade nas piscinas, cujas águas são tratadas pelo método electrocatadínico. Os esporos das bactérias, ao contrário, não seriam inativados.

Ultimamente têm sido propostas aplicações deste método no campo da imunologia. Assim, Rainsford, em 1937, mostrou que era possível preparar ótimas vacinas com bactérias mortas pela ação da prata eletrolisada, sem nenhuma modificação de suas propriedades antigênicas. Mesmo os antígenos mais lábeis não seriam por ela influenciados. Foi assim que se conseguiram preparar facilmente vacinas e antisôros com o antígeno *Vi* da *E. typhi*, tão sensível a todos os agentes físicos e químicos (Rainsford, Labranca, etc.).

A ação da prata eletrolisada sobre toxinas, venenos, protozoários, rickettsias, virus filtráveis e bacteriófagos é ainda pouco conhecida. Procuramos verificar essa ação e nesta nota damos os resultados de nossas primeiras experiências.

### TÉCNICA

Um pequeno aparelho constando de uma pilha elétrica de 1.5 Volt, com 2 eletrodos de prata, medindo cada um 8 cm de comprimento e cerca de 2 mm de diâmetro, foi por nós empregado para ativar geralmente cerca de 5 ml de água de torneira, por um tempo variavel de 30 a 90 minutos. Nestas primeiras provas não fizemos dosagens da quantidade de prata dissociada. Os diferentes materiais a estudar eram misturados, nas doses convenientes, a essa água assim ativada e após cerca de 30, 60 ou 90 minutos de contacto, é que iniciavamos as provas. Os contrôles para verificar si a água estava realmente ativa, eram geralmente feitos com emulsões de estafilicocos.

Adotamos essa técnica por termos verificado que, eletrolisando a prata diretamente na diluição em água do material em estudo, pode-se observar concomitantemente um fenômeno de cataforese, com fixação do material ativo em um dos polos, dando impressão errônea dos resultados. Assim, nas nossas primeiras provas feitas por electrocatadinização direta de diluições de toxinas diftérica e tetânica, por 1 hora, foi notada, tanto numas como noutras, notável diminuição do poder tóxico, podendo essa alteração atingir 20 D.M.L., o máximo experimentado. Com venenos de serpentes (*Bothrops jararaca* e *Crotalus terrificus terrificus*), em diluições de 2 até 30 D.M.L., o mesmo acontece. O fato foi melhor verificado com soluções de nitrato de estricnina e de uma azo-estricnina, observando-se em um dos eletrodos a cristalização do alcalóide puro, após a quebra dos ligames nitrato e diazoico, perdendo o líquido, depois do tratamento, grande parte de seu poder tóxico.

### RESULTADOS

*Toxinas* — Diluições de toxinas tetânica e diftérica misturavam-se à água previamente catadinizada, por cerca de 1 hora. Após 60 minutos de contacto, inoculavamos os animais de prova, que morreram em tempo certo, a partir de 2 D.M.L., tal como os testemunhas inoculados com as diluições correspondentes das toxinas feitas em água não catadinizada.

Não foram feitas experiências com maior tempo de contacto, não se podendo saber, assim, si uma ação mais prolongada da prata teria modificado os resultados.