### TIFO MURINO EM SÃO PAULO

- I. Identificação da Rickettsia mooseri isolada de um caso humano
- POR J. TRAVASSOS; PLINIO M. RODRIGUES & L. NOGUEIRA CARRIJO (Secção de Virus e Riquetsias do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

O tifo murino ou endêmico, assinalado primeiramente em 1926 por Maxcy (1) no sul dos Estados Unidos e estudado mais tarde por Mooser (2) no México, é reconhecido hoje como uma das doenças tifo-exantemáticas mais disseminadas pelo mundo.

Em 1932, Monteiro e Fonseca (3), após isolarem uma riquetsia de ratos capturados na zona urbana de S. Paulo, focalizaram pela primeira vez a possibilidade de ocorrer entre nós "uma outra modalidade de febre exantemática, de origem murina e de cuja transmissão se poderiam incriminar os pulicideos".

Anteriormente áquela data, já era conhecida a ocorrência, em nosso meio, da riquetsiose inicialmente designada "Tifo exantemático de S. Paulo". Estudada em 1929, por Piza e colaboradores (4), no Hospital Emilio Ribas e identificada posteriormente á febre maculosa das Montanhas Rochosas (5 a 9) que ocorre nos Estados Unidos, a doença, transmissivel ao homem por ixodidas, evolúi em geral de maneira grave e apresenta alta mortalidade.

Já em 1929, porém, entre os casos que recebiam no Hospital Emilio Ribas o diagnóstico de "tifo exantemático", constavam alguns de evolução clínica benigna, ás vezes sem exantema e que invariavelmente terminavam pela cura. A reação de Weil-Felix atingiu na maioria deses casos títulos elevados para o *Proteus* X19.

No mesmo hospital, foram observados nos anos seguintes, entre pacientes lá internados para tratamento de infecção suspeita de febre tifo-paratífica, casos de uma doença benigna, ás vezes acompanhada de exantema, nos quais, porém, a reação de Widal e a hemocultura foram negativas. A reação de Weil-Felix, praticada sistemàticamente com o sôro desses doentes, foi com frequência positiva, não raro a títulos altos. Observou-se mesmo a elevação gradual dos títulos dos sôros de vários pacientes, em reações levadas a efeito com amostras de sangue colhidas em períodos diversos da enfermidade.

A acentuada benignidade era talvez a caraterística clínica essencial desses casos inicialmente suspeitos de infecção tifo-paratífica. Seria a Dermacentro-xenus rickettsi o agente etiológico de algumas dessas infecções, em que pese a sua benignidade? Deveria ser considerada alguma outra riquetsiose, de evolução em geral benigna e de mortalidade quase nula, tal como o tifo murino?

As investigações realizadas pelo Serviço de Epidemiologia do Departamento de Saúde mostravam que vários desses pacientes provinham de zonas urbanas e exerciam sua atividade profissional em armazens de cereais onde os ratos eram abundantes, não referindo eles contacto algum com ixodidas na quinzena anterior ao início da doença.

O diagnóstico de tifo murino para, pelo menos, uma parte dessas infecções benignas, já sugerido pela observação clínica e pelos resultados positivos da reação de Weil-Felix, parecia, assim, receber tambem o apoio de dados epidemiológicos.

Quadros clínicos semelhantes foram observados entre auxiliares técnicos do Serviço de controle da Peste Bubônica, em contacto diário com ratos e pulgas.

Salles Gomes (10), do Instituto Adolfo Lutz, relatou em 1941 os resultados obtidos pela inoculação do sangue de 3 desses prováveis casos de tifo murino em cobaia. Dois deles foram verificados entre funcionários do serviço acima referido, então localizado no Instituto Butantan. Os sintomas da infecção experimental obtida por aquele investigador foram discretos, tendo a perda rápida do virus, nas tentativas de passagem em série, impossibilitado a sua identificação mediante estudo acurado.

Aliás, um de nós não havia anteriormente (1937) sido mais feliz ao tentar isolar a riquetsia em cobaias inoculadas com o sangue do primeiro caso verificado entre aqueles mesmos funcionários. Afóra 2 dias de febre após um período de incubação de 9 dias e uma reação escrotal discreta, nada mais poude ser observado, tendo o virus se extinguido já nas primeiras passagens de cobaia a cobaia.

Passando o Instituto Adolfo Lutz a praticar sistematicamente a reação de Weil-Felix com os sôros, provenientes de todo o interior do Estado, de casos inicialmente suspeitos de febre tifo-paratífica, poude ser constatada "em vários municípios a existência de indivíduos cujos sôros atingiam títulos altos de aglutinação em face dos vários *Proteus* X, especialmente do OX19 (1/800 até 1/6.400)" (10).

Mediante estudo epidemiológico extensivo, Pascale e Cruz (11), Pascale e Prado (12) e Pascale (13) verificaram a positividade do Weil-Felix em pessoas residentes em diversas regiões do Estado onde não havia até então sido reconhecida a febre maculosa. Ratos e pulgas foram encontrados em abundância nos locais onde provavelmente se haviam contaminado os pacientes.

A possibilidade da existência do tifo murino não só na Capital como em outras regiões do Estado de S. Paulo recebia, pois, além do apoio de dados clínicos e epidemiológicos, o de resultados experimentais sugestivos mas não conclusivos. Como bem ressaltaram Monteiro e Fonseca (3) e Salles Gomes (10), faltava identificar a riquetsia pelo seu comportamento experimental, ainda não estudado em detalhe, e "sobretudo por provas de imunidade cruzada".

Relataremos a seguir o que nos parece ser em S. Paulo o primeiro caso de isolamento da Rickettsia mooseri em que foi possivel obter a prova cabal da sua identidade.

No curso de nossas pesquisas isolámos o virus de um caso humano da doença adquirida em um foco desta Capital, assim como de ratos e pulgas lá capturados. Outras amostras de virus foram posteriormente por nós isoladas de doentes provenientes tanto da capital como do interior do Estado.

No presente trabalho, no entanto, trataremos apenas da primeira amostra de Rickettsia mooseri por nós isolada de um dos casos humanos ocorridos na Capital.

## DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

O paciente, Vollet, funcionário da Secretaria da Agricultura de S. Paulo, trabalhava em um laboratório químico para analise de sementes, situado à rua Guaicurús, nesta Capital e anexo a grandes armazens onde é depositada toda sorte de cereais. Ratos em número elevado infestavam o local, apesar de os armazens serem de ótima construção e terem paredes de tijolos e piso de concreto.

O inquérito epidemiológico realizado não revelou contacto algum do doente com ixodidas nos 15 dias anteriores ao aparecimento dos primeiros sintomas. Reside ele em casa de apartamentos no centro da cidade de onde se afastou, nas duas semanas que precederam o início da doença, apenas para ir diariamente ao local de trabalho e para um passeio ás praias de Santos.

A doença evoluiu em duas semanas, iniciando-se com acentuada cefaléa que perdurou por vários dias, com calafrios e febre. Não foi notado exantema durante toda a doença e o estado geral do paciente foi sempre muito bom, a despeito de a febre ter por vezes atingido 39,5-40C..

Os exames de laboratório para diagnóstico de febre do grupo entérico e de brucelose foram negativos. A reação de Weil-Felix foi entretanto positiva, tendo alcançado o título de 1/20.000 para o *Proteus* X19 em exame por nós praticado.

## ISOLAMENTO DA RIQUETSIA

Vimos o paciente em seu último dia de febre, sendo por essa ocasiao colhidos 20cc. de seu sangue para exames de laboratório.

O coágulo, obtido após permanência do sangue em temperatura ambientepelo espaço de duas horas, foi deslocado das paredes do vasilhame por meiode alça de platina e, a seguir, centrifugado a 2.500 rotações por minuto durante 1/2 hora. Depois de separado o sôro por meio de pipeta estéril, foi o coágulotransvasado para um frasco contendo pérolas de vidro e submetido a forte agitação, após o que foram acrescentados ao mesmo 10cc. de salina.

O material foi então passado em gaze estéril, obtendo-se assim cerca de-12cc. de suspensão de hematias. O volume total foi injetado em partes iguaisem duas cobaias (animais N°. 1 e 2) e em dois ratos brancos (animais N°. 3e 4), por via peritoneal.

Os ratos não reagiram febrilmente até o 19º dia após a inoculação do sangue; foram então sangrados no coração, para que se pudesse proceder a reações sorológicas, e, em seguida, sacrificados. Retirados os seus cérebros, foram os mesmos triturados conjuntamente e emulsionados em 20cc. de salina. A emulsão foi inoculada no peritônio de duas cobaias (N°. 5 e 6), no volume de 3cc. para cada animal.

A reação de fixação do complemento, realizada com o sôro de um daqueles ratos, foi positiva ao título de 1/64 em presença de um antígeno preparado no "National Institute of Health", de Washington, com a amostra Wilmington de Rickettsia mooseri. Com o sôro do outro rato a reação foi negativa em uma diluição de 1/12; não foi possível praticá-la a título inferior, dada a pequena quantidade de sôro obtida.

Esse resultado positivo indicava que pelo menos um dos animais havia sidoinfectado. Havia, pois, no sangue do paciente, mesmo no último dia de febre, riquetsias circulantes. Aliás, o fato não é de estranhar por isso que Findlay, ainda recentemente (1941), afirmou que, por técnica similar á que usamos, épossivel isolar o virus durante todo o período febril e até na convalescença (14).

As duas cobaias (N°. 1 e 2), injetadas com o sangue do paciente, apresentaram no 4.° e 5.° dia após a inoculação ligeira elevação febril que se repetiu 13 dias mais tarde. A reação de fixação do complemento, praticada em presença do antígeno murino, foi, no entanto, negativa com as amostras de sangue colhidas de ambos os animais 25 dias após a inoculação. As cobaias foram, em seguida, submetidas a uma prova de imunidade. Injetadas com a riquetsia da febre maculosa, uma delas reagiu tipicamente e a outra, embora não tivesse tido febre, apresentou esplenomegalia acentuada á autópsia praticada 8 dias após a reinoculação. Não se verificou, assim, nesses dois animais, imunidade alguma á febre maculosa.

1°. passagem — As cobaias 5 e 6, inoculadas com emulsão dos cérebros dos ratos 3 e 4, apresentaram simultaneamente ligeira e fugaz elevação de temperatura no 13°. dia e, novamente, no 18°. dia. Com o sôro de ambas as-

cobaias, sangradas no 20°. e, novamente, no 25°. dia, foi praticada a reação de fixação do complemento em presença do antígeno murino. O resultado foi positivo aos títulos de 1/160 a 1/640, respectivamente, com a primeira e segunda amostra do sôro da cobaia 5. A fixação foi parcial a 1/40 com a primeira e total a 1/160 com a segunda amostra de sôro da cobaia 6.

Esses resultados da reação de fixação do complemento mostravam mais uma vez que os animais por nós inoculados vinham sofrendo de uma infecção benigna que não se exteriorizava senão por insignificantes e pouco estáveis elevações de temperatura.

As cobaias de primeira passagem nada revelaram de anormal á necrópsia praticada no 25°, dia após a inoculação. Foi retirado e emulsionado o cérebro de cada uma delas, sendo cada emulsão inoculada intraperitonealmente em 2 cobaias e 2 ratos.

2ª. passagem — Nos animais de segunda passagem, a infecção ainda não se revelou com sinais característicos. O elemento mais importante, indicador de uma riquetsiose do grupo "typhus", continuou a ser a presença, em altos títulos, de anticorpos fixadores do complemento no sôro das cobaias e dos ratos inoculados. Na maioria dos animais foi constatada reação febril, em geral mais persistente que nos animais de primeira passagem; as diferentes curvas térmicas obtidas não apresentavam, porém, peculiaridade alguma que permitisse enquadrá-las num tipo determinado, idêntico ou semelhante ao observado com frequência nas infecções com certas raças de Rickettsia mooseri. Em duas cobaias a autópsia revelou ligeiro aumento do baço.

Para passagem do virus, utilizou-se, como anteriormente, cérebro de cobaia. Cada cérebro, depois de emulsionado, foi inoculado intraperitonealmente em 4 cobaias e 2 ratos.

3.ª passagem — A presença do virus murino exteriorizou-se de maneira nítida na terceira passagem. Todas as 4 cobaias de um dos grupos de animais inoculados apresentaram marcada reação escrotal. O aumento do volume da bolsa escrotal foi observado pela primeira vez 8 ou 9 dias após a inoculação. Nos 2 ou 3 dias subsequentes surgiu o rubor e acentuou-se o edema da pele. A resistência constatada durante as tentativas feitas para forçar o trânsito dos testículos pelo canal vaginal completava o sinal descrito por Neil (15) no decurso de suas investigações sobre o tifo endêmico do México.

Em esfregaços preparados com material da vaginal de duas cobaias que apresentaram reação escrotal e corados pelo método de Macchiavelo, observámos numerosas "células de Mooser", repletas de riquetsias que foram encontradas tambem extracelularmente em abundância. A curva térmica nessas cobaias apresentou a particularidade de observação usual nas infecções com a

Rickettsia mooseri: a temperatura elevou-se no mesmo dia do aparecimento da reação escrotal, caindo ao normal no dia seguinte para tornar a subir 24 horas após.

Em nenhum dos outros 3 grupos de animais de terceira passagem, no entanto, foram observados sinais aparentes característicos da infecção murina. A reação de fixação do complemento, contudo, foi positiva em alguns animais de 2 desses 3 grupos. Ela foi negativa em todos os animais do grupo inoculado com material da cobaia 8 de segunda passagem, cujo sôro, no entanto, havia fixado o complemento em presença do antígeno murino.

Vê-se, assim, que na terceira passagem, conquanto se tivesse observado em um grupo de cobaias o sinal de Neil-Mooser, sabidamente de alto valor para a identificação do virus, a infecção deixava ainda de se manifestar na maioria dos animais com sinais típicos. A positividade da reação de fixação do complemento foi ainda nessa passagem o sinal de infecção mais frequentemente observado. O baixo teor de virus no material inoculado ou a sua insuficiente adaptação á cobaia e ao rato não permitia ainda obter resultados consistentes.

De duas cobaias que apresentaram reação escrotal, foi retirado material para passagem. Foi feita uma suspensão com as vaginais e o baço de cada uma delas, sendo cada suspensão inoculada intraperitonealmente em 4 cobaias e 2 ratos. Essa prática foi seguida regularmente nas passagens subsequentes, empregando-se para isso material de 2 ou mais cobaias.

4.ª passagem — Todas as 8 cobaias pertencentes a 2 dos 3 grupos de animais de quarta passagem reagiram tipicamente á inoculação, com elevação térmica e inflamação escrotal acentuada. Duas cobaias de cada um desses grupos foram sacrificadas no segundo dia de febre, notando-se, á necrópsia, esplenomegalia com exsudação peri-esplênica, congestão das supra-renais e vaginalite exsudativa. Esfregaços feitos com vaginais dessas duas cobaias mostraram grande quantidade de riquetsias e cé ulas de Mooser.

Uma terceira cobaia do mesmo grupo foi sacrificada no 8.º dia após a inoculação quando apresentava ainda marcada reação escrotal. O número de riquetsias vistas no esfregaço feito com vaginal desse animal foi, no entanto, bem menor que no caso das suas companheiras de grupo sacrificadas mais precocemente. Esse fato levou-nos a realizar as passagens de preferência no primeiro ou segundo dia após o aparecimento da reação escrotal. A observação ulterior veio confirmar ser esse o período de escolha para se obter suspensão de vaginal rica em riquetsias.

Nas cobaias do último grupo de animais de quarta passagem os sinais de infecção foram bem menos nítidos. Uma delas teve uma reação febril fugaz e a outra manteve-se apirética durante 21 dias de observação.

O sôro obtido posteriormente desta última cobaia não fixou o complemento em presença do antígeno murino. Os animais desse grupo haviam sido inoculados com suspensão de baço e vaginal, na qual a pesquisa de riquetsias fora negativa.

- 5.º passagem Todos os animais (12 cobaias e 6 ratos) apresentaram febre e reação escrotal típica, tendo sido encontradas abundantes riquetsias e células de Mooser em esfregaço de vaginal das cobaias sacrificadas. A reação de fixação do complemento foi positiva em todos os casos em que foi praticada.
- 6.º passagem Na sexta passagem a infecção passou a ter um período de incubação mais curto, iniciando-se a reação febril já a partir do terceiro ou quarto dia. Tanto esse como os outros sinais da infecção, observados já de maneira nítida e consistente em todos os animais da passagem anterior, mantiveram-se com regularidade nas passagens ulteriores.

Tendo assim mostrado como, por passagens sucessivas de cobaia a cobaia, conseguimos estabilizar (ver quadro N.º 1) as características da infecção experimental provocada pelo virus em estudo, passaremos nas linhas seguintes a analisar as bases para a sua identificação.

# IDENTIFICAÇÃO

No decurso de nossas investigações estudámos comparativamente o comportamento experimental da amostra de riquetsia a identificar e que denominamos "Vollet", com o da amostra Wilmington de Rickettsia mooseri e com o de várias amostras de Dermacentroxenus rickettsi, isoladas em São Paulo.

Tal estudo, aliado ao da morfologia e distribuição característica da riquetsia nas células endoteliais da vaginal da cobaia, e os resultados das provas sorológicas e de imunidade cruzada nos permitiram chegar á identificação específica do virus isolado por nós..

- Comportamento experimental, Para efeito de identificação, restringimos a nossa análise aos animais das passagens posteriores á quinta, por isso que, como vimos, o comportamento da riquetsia não se mostrou uniforme nos primeiros animais inoculados.
- a) Na cobaia Foram feitas ao todo 17 passagens de cobaia a cobaia, para as quais utilizámos suspensão de baço e vaginal de animal sacrificado geralmente no segundo dia de reação escrotal.

No gráfico N.º 1 damos as curvas de frequência dos períodos de incubação verificados em 86 cobaias inoculadas com a amostra Vollet, 69 cobaias infectadas com a amostra Wilmington e 67 cobaias injetadas com a amostra Favorita

de Dermacentroxenus rickettsi. A curva correspondente a esta última mostrou. aliás, um paralelismo quase perfeito ás levantadas com os dados relativos a 3 outras amostras da riquetsia da febre maculosa.

Pode ver-se que, tanto no caso da amostra Vollet como no da Wilmington, a infecção teve na maioria (63,8 e 65,2% respectivamente) das cobaias um período de incubação que variou entre 3 e 5 dias, enquanto que no caso da amostra Favorita os limites dessa variação, em 71,1% das cobaias utilizadas, foram 2 a 4 dias.

Os dados referentes á duração do período febril, a qual variou entre 2 e 6 dias para a maioria das cobaias inoculadas com a amostra Vollet, não nos forneceram elementos para a identificação específica, visto que variações análogas foram observadas em grande número de animais injetados com as demais amostras estudadas. Em geral a reação térmica é, no entanto, mais elevada nos animais inoculados com as diferentes amostras de Dermacentroxenus rickettsi do que nos animais infectados com as amostras Vollet e Wilmington

Em boa parte das cobaias injetadas com a amostra Vollet observámos a oscilação da curva térmica assinalada por Zinsser (16) e já descrita linhas acima: a temperatura, após a elevação do primeiro dia, volta bruscamente ao normal no dia imediato, para subir novamente nas 24 horas seguintes. Não tem sido observada variação semelhante nas curvas térmicas das cobaias infectadas com amostras de *Dermacentroxenus rickettsi*.

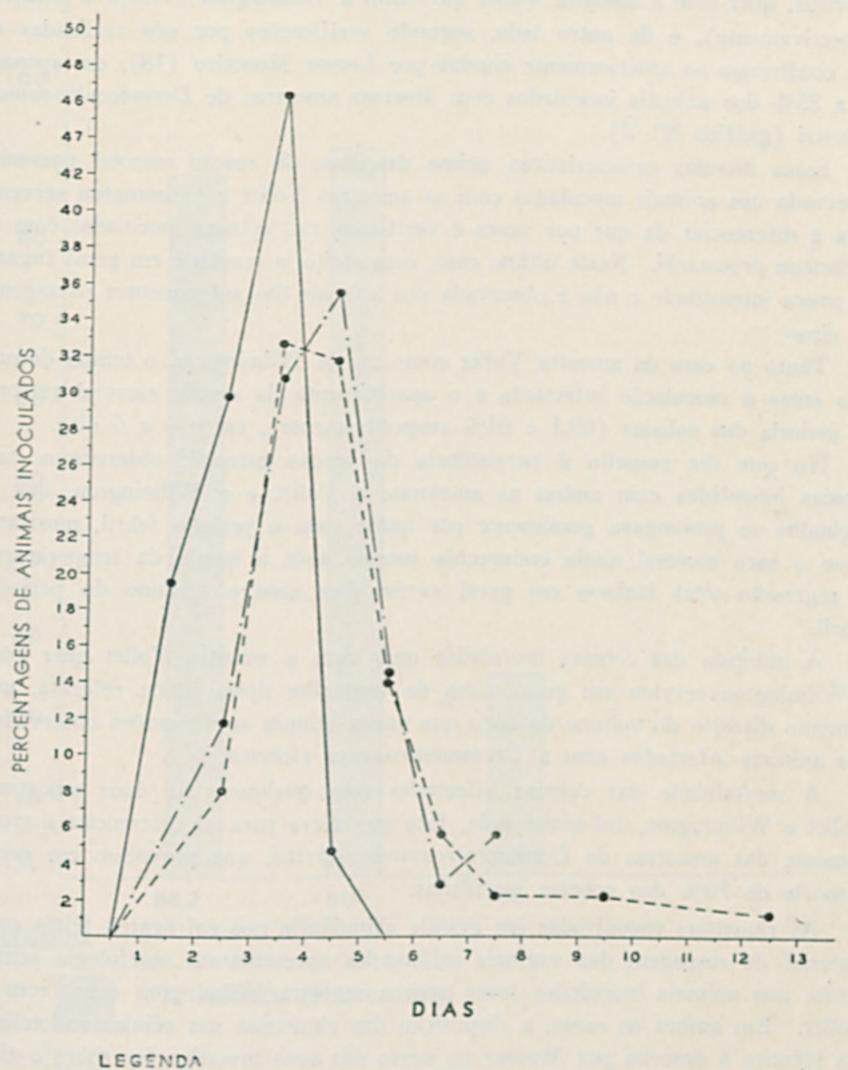
A reação escrotal da cobaia, assinalada primeiro por Neil (15), descrita em seguida mais pormenorizadamente por Mooser (17), é hoje considerada como elemento de valor para a identificação do tifo murino.

Os detalhes da reação por nós observada são os considerados típicos da vaginalite provocada pela *Rickettsia mooseri*, jamais acompanhada das grandes hemorragias e da necrose da pele do saco escrotal verificadas com grande frequência em cobaias inoculadas com a *Dermacentroxenus rickettsi*. Grande dificuldade era experimentada ao se tentar forçar o trânsito dos testículos pelo canal vaginal inflamado.

A intensidade da reação variou muito de animal para animal da 3.ª, 4.ª e 5.ª passagem. A partir da 6.ª passagem, porém, reações acentuadas foram ragularmente obtidas, com consideravel aumento de volume da bolsa escrotal, tornando-se improfícuas as tentativas de mobilização dos testículos. Intensificando-se ainda mais a reação, notavam-se por vezes algumas petéquias na pele da bolsa escrotal.

As fotos Nos. 1 a 4 mostram reações típicas de cobaias inoculadas com a Dermacentroxenus rickettsi e com as amostras Vollet e Wilmington.

A frequência do sinal de Neil na cobaia forneceu-nos outro elemento de valor para a identificação do virus em estudo. A reação escrotal foi observada, de um lado, na grande maioria das cobaias inoculadas, a partir da 5.ª passagem



LEGENDA					
-	DERMACENTE	ROXENUS	RICKETTSI	(AMOSTRA	FAVORITA)
	RICKETTSIA	MOOSERI	(AMOSTRA	WILMING	TON)
	AMOSTRA	VOLLET			

GRÁFICO N.º 1

DISTRIBUIÇÃO DOS PERIODOS DE INCUBAÇÃO NA COBAIA

do virus, quer com a amostra Vollet quer com a Wilmington (91,0% e 88,2%, respectivamente), e de outro lado, segundo verificações por nós realizadas e que confirmam as anteriormente citadas por Lemos Monteiro (18), em apenas 20 a 25% dos animais inoculados com diversas amostras de Dermacentroxenus rickettsi (gráfico N°. 2).

Essas mesmas características, acima descritas, da reação escrotal por nós observada nos animais inoculados com as amostras Vollet e Wilmington servem para a diferenciar da que por vezes é verificada nas cobaias inoculadas com a Rickettsia prowazeki. Neste último caso, com efeito, a reação é em geral fugaz, de pouca intensidade e não é observada nos animais das subsequentes passagens do virus.

Tanto no caso da amostra Vollet como no da Wilmington, o tempo decorrido entre a inoculação infectante e o aparecimento da reação escrotal variou, na maioria das cobaias (69,1 e 64% respectivamente), entre 4 e 6 dias.

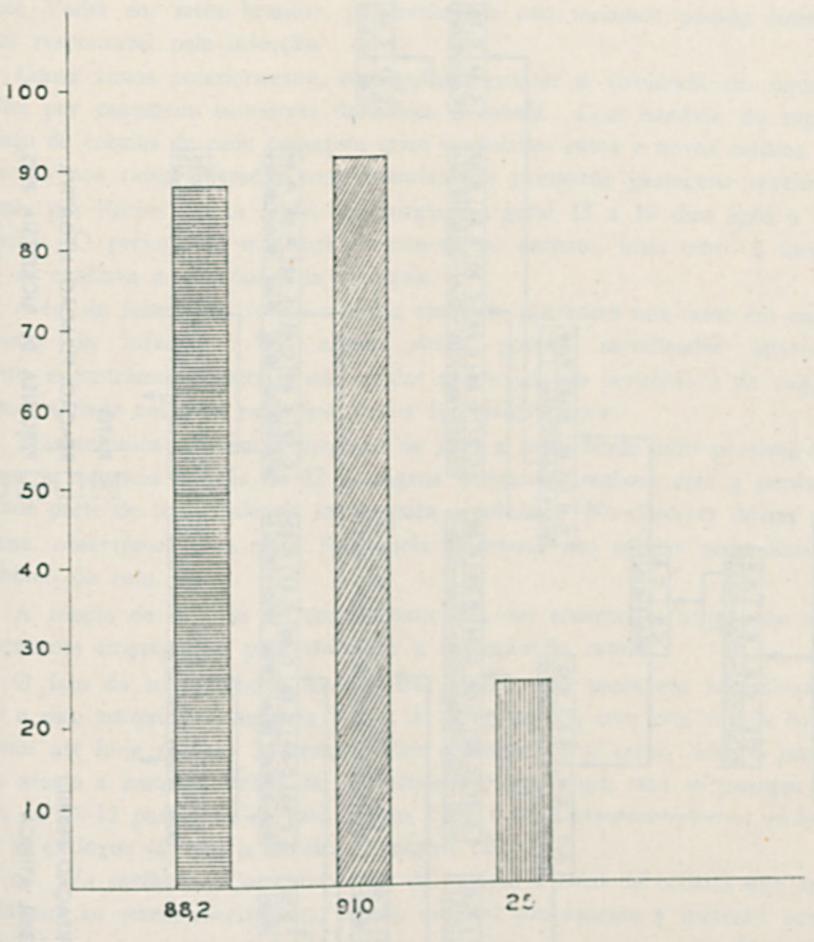
No que diz respeito á persistência da reação escrotal, observámos nas cobaias inoculadas com ambas as amostras, a Vollet e a Wilmington, que a vaginalite se prolongava geralmente por quase todo o período febril, mostrando-se o saco escrotal ainda endurecido mesmo após a queda da temperatura. A regressão total fazia-se em geral vários dias após o término do período febril.

A autópsia das cobaias inoculadas quer com a amostra Vollet quer com a Wilmington revelou em geral, além da vaginalite típica acima referida, um aumento discreto do volume do baço que nunca atingiu as dimensões observadas nos animais infectados com a Dermacentroxenus rickettsi.

A mortalidade das cobaias infectadas com qualquer das duas amostras, Vollet e Wilmington, foi quase nula, fato que serve para as diferenciar marcadamente das amostras de *Dermacentroxenus rickettsi*, que provocam em geral a morte de 70% das cobaias inoculadas.

As riquetsias encontradas em grande abundância nos esfregaços feitos com material de raspagem das vaginais inflamadas apresentaram morfologia semelhante nos animais inoculados tanto com a amostra Wilmington como com a Vollet. Em ambos os casos, a disposição das riquetsias nas células endoteliais era idêntica á descrita por Mooser no curso das suas investigações sobre o tifo murino. Observámos com certa frequência células repletas de riquetsias. Nas fotos Nos. 5 e 6 e na prancha anexa veem-se aspectos típicos por nós encontrados os quais facilitam a identificação da riquetsia em estudo, diferenciando-a não só da Dermacentroxenus ricketts; como de outras riquetsias possivelmente existentes mas ainda não reconhecidas em nosso meio.

b) No rato branco — O rato mostrou-se mais sensível á infecção com a amostra Vollet do que a cobaia. Não fora termos inoculado o sangue do pa-



LEGENDA

R. MOOSERI (WILMINGTON)

VOLLET

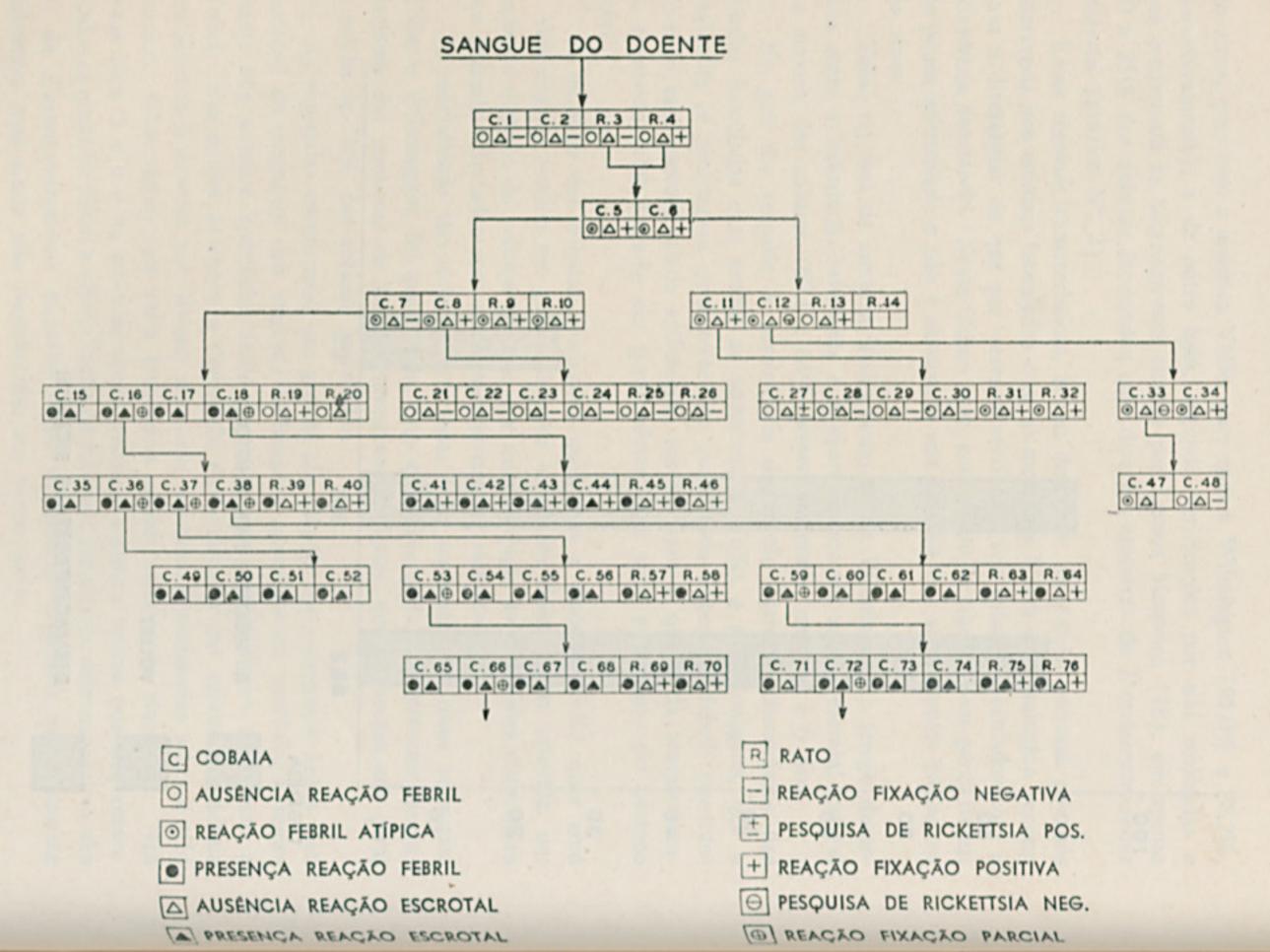
DERMACENTROXENUS RICKETTSI

GRÁFICO N.º 2

FREQUENCIA DA REAÇÃO ESCROTAL NA COBAIA

QUADRO N.º I
PASSAGENS DO VIRUS VOLLET PELA COBAIA E PELO RATO

12



ciente Vollet em ratos brancos, provavelmente não teriamos podido isolar o virus responsavel pela infecção.

Como vimos anteriormente, conseguimos exaltar a virulência da riquetsia Vollet por passagens sucessivas de cobaia a cobaia. Com emulsão de vaginal e baço de cobaias de cada passagem eram inoculados ratos e novas cobaias. A infecção nos ratos injetados com material das primeiras passagens revelou-se apenas por ligeira reação febril que surgia em geral 13 a 19 dias após a inoculação. O período de incubação tornou-se, no entanto, mais curto á medida que se exaltava a virulência da riquetsia.

Além da febre, não foram notados sintomas aparentes nos ratos em consequência da infecção. Em alguns deles, porém, sacrificados oportunamente, encontrámos riquetsias nas células endoteliais do peritônio e da vaginal. A mortalidade entre os ratos inoculados foi insignificante.

Transmitimos tambem a infecção de rato a rato, tendo sido possivel conservar a riquetsia através de 32 passagens sucessivas, embora com a perda de grande parte de sua virulência inicial para a cobaia. No decorrer dessas passagens, observámos com certa frequência riquetsias nas células endoteliais do peritônio de rato.

A reação de fixação do complemento foi, no entanto, a prova que mais comumente empregámos para constatar a infecção do rato.

O fato da sobrevivência da riquetsia através das passagens sucessivas de rato a rato aproxima a amostra Vollet da Wilmington; com esta última conseguimos até hoje realizar 34 transmissões análogas. Por outro lado, o mesmo fato afasta a amostra Vollet da Rickettsia prowazeki que não se mantem por mais de 12-13 passagens de rato a rato (19) e da Dermacentroxenus rickettsi que se extingue já após a terceira passagem (20).

c) No coelho — Com suspensão de vaginal e baço de cobaias que apresentavam, ao serem sacrificadas, reação escrotal consequente á infecção com o virus Vollet, foram inoculados 6 coelhos, 4 dos quais reagiram febrilmente no 5.° - 6.° dia; a temperatura ultrapassou 40°C., não tendo, no entanto, persistido por mais de 48 horas.

Em 5 desses coelhos observou-se reação escrotal com rubor, edema e aumento de volume dos testículos, a qual, porém, não perdurou em animal algum por mais de 2 dias.

A reação Weil-Felix e a de fixação do complemento com antígeno murino foram positivas com os sôros posteriormente obtidos de todos esses 6 coelhos.

É digna de nota a reação escrotal que determinou a amostra Vollet, sabido como é que a Rickettsia mooseri provoca usualmente no coelho apenas uma infecção inaparente. A reação por nós observada não atingiu em coelho algum, no entanto, a intensidade da obtida no mesmo animal por Monteiro pela ino-

culação de amostras de Dermacentroxenus rickettsi isoladas em S. Paulo e caracterizada por hemorragias e necrose da pele do escrotum (21).

d) No embrião de galinha — Foram inoculados embriões de galinha (deoito dias) pelo método de Cox com suspensão de vaginal de cobaias infectadas com o virus Vollet e sacrificadas durante o período de reação escrotal. Os embriões morreram a intervalos diversos a partir do sétimo dia após a inoculação; em esfregaços da vitelina de vários deles foi constatada a presença de riquetsias.

Foi feita a passagem do virus para novos embriões de galinha e para cobaias e ratos, tendo sido observadas riquetsias na vitelina, na vaginal e no peritônio, respectivamente, de vários desses animais; células de Mooser foram constatadas na vaginal de uma das cobaias sacrificadas em pleno período febril. A reação de fixação do complemento praticada em presença do antígeno murino foi positiva com o sôro de diversos ratos e cobaias.

Novas inoculações foram feitas, tendo sido o virus mantido através de uma série de 12 passagens de embrião a embrião, o qual sucumbia á infecção em geral entre o quarto e o sétimo dia. Riquetsias foram constatadas com frequência na vitelina dos embriões infectados.

Cobaias e ratos reagiram tipicamente á inoculação com emulsão de vitelina de embrião de 10.ª passagem, tendo sido observadas riquetsias em esfregaços de vaginais dos animais sacrificados.

Com vitelinas de embriões de 11.ª passagem foi preparado um antígeno que fixou o complemento em presença de sôro conhecidos de tifo murino.

### REAÇÕES SOROLÓGICAS

a) Sôro do doente — Foram colhidas 4 amostras do sangue do paciente Vollet: a primeira em pleno período febril, a segunda no dia anterior á volta da temperatura ao normal e as restantes cerca de 70 e 125 dias, respectivamente, mais tarde.

A reação de Weil-Felix praticada no Instituto Adolfo Lutz com a primeira amostra de sôro atingiu o título de 1/12.800 para o *Proteus* X19; esta bactéria foi aglutinada pela segunda amostra até a diluição de 1/20.000 em reação por nós praticada.

Com o sôro da segunda sangria levámos a efeito tambem a reação de fixação do complemento em presença de antígenos preparados no "National Institute of Health" quer com a amostra Wilmington de Rickettsia mooseri quer com uma das amostras, Madrid e Breinl, de Rickettsia prowazeki, assim como em face de um antígeno preparado em nosso laboratório com a amostra Favorita de Dermacentroxenus rickettsi, isolada em S. Paulo. O resultado foi parcialmente positivo a 1/10 com o antígeno de febre maculosa e com o murino

e positivo a 1/320 e 1/160 com os antígenos epidêmicos, amostras Breinl e Madrid, respectivamente.

Em reações com a terceira amostra de sôro foram obtidos os resultados seguintes: negativo com o antígeno de febre maculosa, positivo a 1/160 com o antígeno murino e positivo a 1/40 com o antígeno epidêmico Breinl.

Procuraremos nas linhas seguintes dar a explicação do desacôrdo entre os resultados das reações de fixação do complemento praticadas com as amostras de sôro colhidas com cerca de 70 dias de intervalo.

Como provaram, entre outros, os trabalhos de Topping (22) e Plotz, Wertmann e Bennett (23), o antígeno murino e o epidêmico possuem 2 componentes, ambos ativos na reação de fixação do complemento: um, específico, próprio a cada uma das riquetsias (Rickettsia mooseri e Rickettsia prowazeki) e o outro comum a ambas. Igualmente, nos sôros-imunes de tifo murino e tifo epidêmico tem sido comprovada a existência de 2 anticorpos correspondentes aos dois componentes em que se dissociam os antígenos: um, específico, que reagiria apenas com o antígeno específico homólogo e o outro, comum a ambos os sôros, que reagiria com o componente antigênico comum a ambas as riquetsias.

Compreende-se, pois, que a reação pudesse ter sido positiva com a amostra de antígeno epidêmico por nós utilizada, ainda mesmo que o sôro fosse, como ficou a seguir comprovado, de um caso de tifo murino.

De aparecimento mais precoce que o anticorpo específico, o anticorpo comum estaria já presente na segunda amostra de sangue (colhida no último dia de febre) e teria reagido com o componente comum existente em quantidade apreciavel na amostra de antígeno epidêmico por nós utilizada. De outro lado, a menor riqueza em componente comum da amostra particular de antígeno murino com que trabalhamos pode facilmente explicar porque esse antígeno não reagiu apreciavelmente com essa mesma segunda amostra de sôro.

Em trabalho recente sobre o emprêgo dos antígenos soluveis no diagnóstico das riquetsioses do grupo "typhus" pela reação de fixação do complemento, Berge (24) assinala que "os (antígenos) preparados com as amostras epidêmicas mostraram um maior grao de reatividade cruzada do que o antígeno murino".

E' sabido, além disso, que a atividade do componente comum pode variar muito em diferentes partidas de antígeno, quer epidêmico, quer murino. Tem sido mesmo constatado que essa atividade torna-se tanto mais intensa quanto mais longo é o tempo decorrido desde o preparo da partida de antígeno. O componente inespecífico, sendo facilmente soluvel, difunde-se com o tempo mais e mais no meio líquido em que estão suspensas as riquetsias. E' essa difusão no meio que torna possivel as reações cruzadas de fixação do complemento en-

tre o tifo epidêmico e o murino, visto que o componente inespecífico só se torna ativo quando em solução.

Pode comprovar-se facilmente esse fato pelos resultados das reações de fixação do complemento realizadas com amostras de antígeno murino e epidêmico purificadas por centrifugação. Pela resuspensão das riquetsias centrifugadas e lavadas é possivel obter antígenos isentos, em maior ou menor grao, de componente comum ativo. Plotz conseguiu por essa técnica tornar mais específicos os seus antígenos, eliminando boa parte das reações cruzadas observadas entre o tifo epidêmico e o murino.

O mesmo autor salientou que amostras de antígeno purificadas por centrifugação podem tornar-se com o tempo novamente ricas em componente ativo inespecífico visto que a difusão da fração antigênica comum a ambas riquetsias, epidêmica e murina, no meio líquido em que elas estão suspensas, se faz de maneira ininterrupta.

Tornou-se assim clara, graças principalmente aos trabalhos ultimamente publicados por Plotz (23 e 25), a vantagem da utilização de antígenos purificados por centrifugação recente para o diagnóstico diferencial entre o tifo epidêmico e o murino. A falta de purificação das amostras de antígeno por nós utilizadas para a reação com o sôro Vollet dificultou-nos inicialmente o diagnóstico específico da riquetsiose em causa, o qual poude no entanto ser feito ulteriormente com precisão pelo isolamento e pela identificação da Rickettsia mooseri.

Já os resultados das reações com a terceira amostra de sôro foram suficientes para nos sugerir a possibilidade da explicação que vimos expondo. Essa hipótese converteu-se, em seguida, em certeza pelo melhor conhecimento por nós adquirido de importante literatura sobre o assunto que tinha sido até então mantida sob segredo de guerra pelo Govêrno dos Estados Unidos.

Avendaño (26) obtinha aliás em Santiago, do Chile, na ocasião em que trabalhavamos, resultados similares aos por nós encontrados não só com o sôro Vollet como com os de vários outros casos a serem publicados mais tarde. O investigador chileno teve a gentileza de nos enviar um apanhado dos seus trabalhos a respeito, no qual ele dá explicação cabal para as reações cruzadas observadas entre o tifo murino e o epidêmico com os antígenos de Bengtson e que podem levar o pesquisador, na falta de uma crítica apurada dos resultados, a um falso diagnóstico diferencial entre as duas riquetsioses do chamado grupo "typhus".

A noção de que os antígenos murino e epidêmico e os anticorpos correspondentes se decompõem em fração específica e fração comum, aliada ao conhecimento de que: 1.°) a fração comum ativa pode estar natural ou artificialmente muito reduzida numa determinada partida de antígeno e 2.°) o anticorpo comum é de aparecimento mais precoce no sôro que o anticorpo específico, permite pois dar a verdadeira interpretação dos resultados semelhantes aos por nós obtidos com a segunda amostra de sôro Vollet.

A baixa do título da fixação em presença do antígeno epidêmico Breinl (2.ª amostra: 1/320; 3.ª amostra: 1/40) é facilmente explicavel por uma redução, que teria ocorrido no intervalo entre as duas sangrias, do teor de anticorpo comum no sôro.

No mesmo período teria havido uma variação em sentido inverso do teor de anticorpo específico no sôro, o que explicaria a diferença observada nos títulos das reações praticadas em presença do antígeno murino (2.ª amostra: 1/10; 3.ª amostra: 1/160). Foi assinalado realmente por Avendaño (26) que o anticorpo comum tende a desaparecer do sôro mais rapidamente que o específico.

A certeza do diagnóstico de tifo murino para o caso Vollet, dada pelo isolamento e pela identificação da Rickettsia mooseri, permitiu-nos interpretar corretamente os resultados das reações de fixação do complemento que praticámos com o seu sôro. Teria sido realmente muito dificil, senão impossivel, chegar no caso Vollet, pela reação de fixação do complemento, a um diagnóstico diferencial seguramente comprovado entre o tifo epidêmico e o murino, por não dispormos então de antígenos purificados.

Foi, no entanto, o resultado das reações de fixação do complemento realizadas já com a segunda amostra de sôro que nos forneceu o diagnóstico seguro de riquetsiose do grupo "typhus" (compreendidas nessa designação o tifo epidêmico e o murino). Realmente os antígenos de Bengtson com os quais trabalhámos são bastante específicos no que se refere á distinção entre a febre maculosa, de um lado, e o grupo "typhus" do outro.

Ainda mais, foram os resultados das reações de fixação do complemento que nos levaram, desde o início das nossas investigações, a pesquisar de preferência o tifo murino, dada a existência já então reconhecida de reações cruzadas entre as doenças do grupo "typhus" e visto falarem os dados epidemiológicos contra a hipótese de tifo epidêmico não só para o caso Vollet como para vários outros similares ocorridos em S. Paulo.

A reação de fixação do complemento, praticada com a amostra de sôro colhida do paciente Vollet cerca de 4 meses após a cura da infecção, foi ainda positiva em face do antígeno murino e do epidêmico Breinl, aos títulos de 1/40 e 1/10, respectivamente.

No quadro N.º 2 estão reproduzidos os resultados das várias reações praticadas com o sôro do doente.

b) Sôro de ratos experimentalmente infectados — Foi a reação de fixação do complemento que nos deu em primenro lugar a certeza de que haviamos conseguido transmitir experimentalmente ao rato a infecção em estudo. Vimos anteriormente, com efeito, que o sôro de um dos ratos inoculados com o sangue do paciente fixou o complemento em presença do antígeno murino.

No correr das passagens sucessivas quer, inicialmente, de cobaia a rato, quer, posteriormente, de rato a rato, realizámos grande número de reações de fixação do complemento com sôro deste último animal, utilizando para isso o antígeno epidêmico e o murino. Os resultados foram em sua maioria positivos, sendo os títulos em geral mais altos com o antígeno murino do que com o epidêmico. A interpretação da reação tornou-se assim mais facil que no caso do sôro de segunda sangria do doente Vollet. Alguns sôros de ratos foram examinados tambem em presença do antígeno de febre maculosa, não havendo nenhum deles fixado o complemento.

De qualquer maneira, aliás, a positividade das reações de fixação do complemento, quer com o antígeno murino quer com o epidêmico, forneceu-nos o diagnóstico de riquetsiose do grupo "typhus" para a infecção que haviamos conseguido transmitir a numerosos ratos.

Ainda mais, graças áquelas reações, o virus poude ser acompanhado até a sua 32.ª passagem de rato a rato. A fixação do complemento levava-nos assim indiretamente, excluida a hipótese de tifo epidêmico, ao diagnóstico de tifo murino. E' sabido, com efeito, que a Rickettsia prowazeki tem a sua virulência atenuada e, em seguida, desaparece ao ser transmitida sucessivamente de rato a rato, não sobrevivendo em geral a mais de 10-12 passagens (19).

A reação de Weil-Felix foi praticada com grande número de sôros de ratos infectados com o virus em estudo, tendo o resultado sido positivo na maioria das vezes.

c) Sôro de cobaias experimentalmente infectadas — As reações de fixação do complemento praticadas com sôros de cobaias infectadas com o virus Vollet deram resultados mais nítidos do que as realizadas quer com o sôro do paciente quer mesmo com os sôros de ratos. Realmente, foram muito raros os sôros de cobaias que, quando experimentados em presença do antígeno murino e do epidêmico, fixaram o complemento a título mais alto em face deste último.

Avendaño, aliás, observou o mesmo fato em investigações realizadas no Instituto Bacteriológico de Santiago do Chile.

- d) Sôro de coelhos experimentalmente infectados Vimos anteriormente que a reação de fixação do complemento e a de Weil-Felix foram positivas com o sôro de 6 coelhos inoculados com suspensão de vaginal de cobaia infectada.
- c) Antígeno preparado com a riquetsia em estudo Já vimos igualmente que, com vitelinas de embrião de galinhão infectado com a riquetsia Vollet, foi preparado um antígeno. Praticámos várias reações de fixação do complemento, em presença desse antígeno, com vários sôros de cobaias e ratos infec-

tados. A reação foi positiva com os anti-sôros Vollet e Wilmington e negativa com o de febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Como controles, utilizámos os antígenos recebidos do "National Institute of Health" e preparados, um com a amostra Wilmington de Rickettsia mooseri e os outros com as amostras Madrid e Breinl de Rickettsia prowazeki.

## PROVAS DE IMUNIDADE CRUZADA

Foram feitas na cobaia provas de imunidade cruzada com a amostra Vollet em estudo e as amostras de riquetsias seguintes: amostra Favorita e Cupecê de Dermacentroxenus rickettsi, isoladas em S. Paulo de Amblyomona cajennense naturalmente infectado; amostra Wilmington de Rickettsia mooseri, recebida do "National Institute of Health" de Washington; amostras de riquetsia isoladas de cérebros de ratos capturados no foco onde o paciente provavelmente adquiriu a infecção, assim como de pulgas parasitas desses mesmos roedores.

Uma parte das cobaias foi imunizada mediante uma única inoculação com virus vivo; os animais restantes receberam duas doses imunizantes antes da inoculação de prova. Esta foi feita em todos os casos pelo menos 20 dias após of fim do último período de febre determinado pelas inoculações imunizantes.

- I Cobaias inoculadas com a amostra Vollet e reinoculadas com a riquetsia da febre maculosa.
- a) Sangue de cobaia infectada com a riquetsia da febre maculosa das Montanhas Rochosas foi inoculado em 9 cobaias que haviam anteriormente so-frido uma isfecção com o virus Vollet. Seis cobaias haviam apresentado reação térmica e escrotal em consequência da primeira inoculação; a infecção das tres restantes com a riquetsia Vollet ficou comprovada pela positividade da reação de fixação do complemento praticada com o seu sôro em presença do antígeno murino.

Oito dos nove animais reinoculados tiveram uma infecção com o período de incubação, a reação febril e a esplenomegalia usualmente observados na cobaia inoculada com a riquetsia da febre maculosa; a cobaia restante morreu precocemente. Dessas 8 cobaias, 5 sucumbiram á infecção.

b) O virus da febre maculosa foi tambem inoculado em 4 cobaias que, após terem sofrido uma infecção com virus Vollet, haviam sido injetadas com uma amostra de riquetsia isolada de cérebro de rato. As 4 cobaias reagiram com febre ao virus Vollet; 3 delas apresentaram reação escrotal, tendo o sôro da restante fixado o complemento em presença do antígeno murino. O único sinal de infecção consequente á inoculação do virus isolado de rato foi a reação térmica, que não se manteve por mais de um dia, observada em uma cobaia apenas.

Tres das 4 cobaias reagiram febrilmente á reinoculação com a Dermacentroxenus rickettsi e faleceram em consequência da infecção. O animal restante não apresentou reação térmica e foi sacrificado 12 dias após á inoculação; mostrou, no entanto, acentuada esplenomegalia á autópsia.

II — Cobaias imunizadas contra a febre maculosa e reinoculadas com a amostra Vollet — O virus Vollet foi inoculado em 12 cobaias que haviam anteriormente sido injetadas por duas vezes com a Dermacentroxenus rickettsi, sendo a primeira inoculação praticada com uma vacina morta pelo acido fênico e a segunda, 12 dias após, com o virus vivo. A vacinação com o virus morto havia conferido ás 12 cobaias uma imunidade sólida á febre maculosa.

Em 10 cobaias a inoculação do virus Vollet provocou reação térmica e escrotal, esta última pouco intensa em alguns animais; nenhum sinal de infecção foi notado nas duas cobaias restantes.

III — Cobaias imunes á febre maculosa e reinoculadas com a amostra Wilmington — O virus Wilmington foi inoculado em 6 cobaias que haviam anteriormente sido hipermunizadas contra a febre maculosa, de maneira similar á utilizada com os animais do grupo precedente.

Das 6 cobaias, 5 reagiram com febre á inoculação com virus Wilmington, tendo 3 delas apresentado reação escrotal; nenhum sinal de infecção foi observado no animal restante.

- IV Cobaias inoculadas com a amostra Vollet e reinoculadas com diferentes amostras de riquetsias isoladas de ratos e pulgas De ratos capturados no foco onde provavelmente se contaminou o paciente Vollet e de pulgas que os parasitavam foram isoladas diversas amostras de riquetsias.
- a) Uma dessas amostras, isolada de pulga, foi injetada em 5 cobaias que anteriormente haviam sido inoculadas com a amostra Vollet. Em nenhuma cobaia foi observado sinal algum de infecção em seguida á reinoculação.
- b) Uma amostra de riquetsia isolada de cérebro de rato foi injetada em 12 cobaias anteriormente inoculadas com a amostra Vollet. Apenas em 2 cobaias foi observada febre que não atingiu 40°C.; os 10 animais restantes não reagiram á reinoculação.
- V Cobaias injetadas com diferentes amostras de riquetsia isoladas de ratos e pulgas e reinoculados com a amostra Vollet.
- a) O virus Vollet foi inoculado em 5 cobaias anteriormente injetadas com uma amostra de riquetsia isolada de pulga de rato capturado no foco já mencionado. Apenas uma das 5 cobaias reinoculadas teve uma reação febril que não atingiu 40°C.; nas 4 restantes nenhum sinal de infecção foi observado.

b) O virus Vollet foi tambem inoculado em 4 grupos de cobaias anteriormente injetadas com diferentes amostras de riquetsias isoladas de cérebro de rato capturado no foco acima referido. Dos 16 animais reinoculados, somente um teve rεação térmica que perdurou apenas por um dia e atingiu 39,9°C.; as 15 cobaias restantes não apresentaram sinal algum de infecção.

VI — Cobaias inoculadas com a amostra Vollet e reinoculadas com a amostra Wilmington — A amostra Wilmington foi inoculada em 12 cobais anteriormente injetadas com o virus Vollet. Das cobaias reinoculadas, apenas 2 apresentaram reação febril que durou 24 horas e não atingiu 40°C.. Nenhum sinal de infecção foi observado nos 10 animais restantes.

VII — Cobaias inoculadas com a amostra Wilmington e reinoculadas com a amostra Vollet — A amostra Vollet foi inoculada em 7 cobaias anteriormente injetadas com a amostra Wilmington. Apenas uma reagiu com febre que não se manteve por mais de 24 horas e que atingiu 40,1°C.; os 6 animais restantes não apresentaram sinal algum de infecção.

Em todas as experiências que acabámos de relatar, foi feito o controle do virus de prova pela sua inoculação em cobaias normais. Damos a seguir após a designação de cada experiência o número de cobaias utilizadas como controles: Ia-6; Ib-2; II-4; III-4; IVa-4; IVb-12; Va-4; Vb-16; VI-7; VII-8. A quase totalidade dos testemunhos dos diversos virus empregados mostrou sinais, em geral típicos, de infecção, tifo murino ou febre maculosa, conforme o caso. Aliás, durante o período em que realizámos as provas de imunidade cruzada, a virulência das amostras com as quais trabalhámos foi cuidadosamente mantida por passagens frequentes e regulares em cobaia e rato.

Analisando em primeiro lugar (ver quadro N.º 3) os resultados das provas de imunidade cruzada praticadas com a riquetsia da febre maculosa, de um lado, e com a amostra Wilmington ou a riquetsia isolada do paciente Vollet, de outro lado, somos levados a concluir que esta última não é uma amostra de Dermacentroxenus rickettsi. E' sabido, com efeito, que a vacinação e principalmente a infecção com a riquetsia da febre maculosa das Montanhas Rochosas produzem uma imunidade homóloga sólida; este fato é confirmado pela experiência por nós adquirida em longos anos de trabalho com diversas amostras do virus responsavel pela febre maculosa endêmica em vários estados do Brasil, entre elas as amostras Favorita e Cupecê utilizadas nas provas acima citadas.

A julgar pelos resultados das provas por nós realizadas com os animais hiperimunizados com a Dermacentroxenus rickettsi, si a inoculação com virus morto e a reinoculação com virus vivo produzem na cobaia alguma resistência á infecção quer com a amostra Wilmington quer com a amostra Vollet, ela é, em ambos os casos, ligeira e de grao mais ou menos equivalente ao da imunidade

QUADRO N.º 2

Reações sorológicas com o sôro do paciente

Datas das sangrias	Weil-Felix	Reação de fixação do complemento								
	OX19	D. rickettsi Favorita	R. mooseri Wilmington	R. prowazeki Breinl	R. prowazeki Madrid					
nderson print	1/12.800	seles esti y		Cardon Adams	el statement					
1-12-45	1/20.000	1/10 (++)	1/10 (++)	1/320	1/160					
8- 2-46	н	-	1/160	1/40						
5- 4-46	н	н	1/40	1/10						

(++) = reação parcialmente positiva.

QUADRO N.º 3

Provas de imunidade cruzada

Cobaias inoculadas com as riquetsias	Sintomas de infecção consequente à reinoculação com as riquetsias														
	Derm. rickettsi am. Favorita		R. mooseri am. Wilmington		Amostra Vollet		Amostra isola- da de rato		Amostra isola- da de pulga						
	0	+	++	0	+	++	0	+	++	0	+	++	0	+	++
Derm. rickettsi am. Favorita				1	2	3	2	0	10						558
R. mooseri am. Wilmington	100						б	1	0						
Amostra Vollet	0	1	11	10	2	0				10	2	0	5	0	0
Amostra isolada de rato							15	1	0						
Amostra isolada de pulga							4	1	0						

⊖ = ausência de sintomas

± = sintomas ligeiros

++ = sintomas típicos

Exemplo de leitura do quadro: Das cobaias inoculadas com a amostra Favorita, 6 foram reinoculadas com a amostra Wilmington e 12 com a amostra Vollet. Das 6 primeiras, uma não teve sintomas de infecção consequente à reinoculação, 2 tiveram sintomas ligeiros e 3 tiveram típicos. Das 12 restantes, 2 não tiveram sintomas e 10 tiveram sintomas típicos.

cruzada já constatada por Parker (27) e Castaneda e Silva (28), entre o tifo murino e a febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Esses resultados se harmonizam perfeitamente com a hipótese da identidade imunológica das amostras Vollet e Wilmington. A imunidade cruzada por nós constatada em cobaias infectadas com um desses virus e, em seguida, reinoculada com outro não deixa dúvidas a respeito dessa identidade.

Ficou igualmente constatada, pelas provas de imunidade cruzadas, a identidade imunológica da amostra Vollet e das amostras de virus isoladas quer de ratos quer das pulgas que os parasitavam; a importância dessa identidade para a determinação de espécie da riquetsia Vollet torna-se evidente si considerarmos a origem das amostras com as quais ela foi comparada. Os sôros dos ratos encontrados infectados com algumas dessas amostras fixaram o complemento em presença do antígeno murino; a reação foi aliás positiva com o sôro de numerosos outros ratos, capturados, como aqueles, no mesmo foco de infecção.

Deixaremos para descrever com mais detalhes em trabalho ulterior as bases para a identificação da enzootia de tifo murino, verificada nesse foco. Desejamos aqui apenas referir-nos ao fato para que se torne clara a significação dos resultados de provas citadas.

### CONCLUSÃO

Como vimos no início deste trabalho, estudos epidemiológicos e provas experimentais realizados já há vários anos sugeriam a existência do tifo murino
entre nós. Na literatura publicada até concluirmos a redação destas páginas
não encontrámos, no entanto, referência alguma a caso de isolamento da Rickettsia mooseri no Brasil no qual a identidade do virus tivesse sido comprovada de
modo cabal.

A dificuldade de manter a infecção da cobaia ou do rato por passagem do virus, em série, de animal para animal tornou impossivel em várias ocasiões a execução de provas experimentais, sobretudo as de imunidade cruzada, que permitissem identificar a riquetsia em causa.

O estudo detalhado da amostra Vollet descrito nas paginas precedentes permite-nos agora afirmar com segurança a existência do tifo murino em São Paulo.

Não nos parece que possa haver dúvida sobre a identidade do virus Vollet: todas as suas características estudadas no decurso da nossa experimentação levam a classificá-lo como uma amostra de Rickettsia mooseri.

Entre as propriedades do virus destacam-se a constância com que ele induz o aparecimento do sinal de Neil-Mooser na cobaia, o seu comportamento em provas de imunidade cruzada, idêntico ao da amostra-padrão Wilmington de Rickettsia mooseri, a sua sobrevivência em passagens em série de rato a rato e finalmente o seu poder antigênico específico. Em relação a esta última pro-

priedade, com efeito, vimos, de um lado, que o virus produz no organismo do homem, da cobaia e do rato, anticorpos que fixam o complemento em presença de antígeno-padrão murino e, de outro lado, que com ele é possivel preparar um antígeno que fixa o complemento em presença de sôros conhecidos de tifo murino.

Algumas dessas características são, aliás, suficientes por si sós para nos permitir chegar á conclusão que o virus por nós isolado é uma amostra de Rickettsia mooseri cuja existência no Brasil parece-nos assim ficar comprovada pela primeira vez com segurança.

#### SUMMARY

Rickettsia mooseri was isolated from a human case of murine typhus which occurred in São Paulo City. The disease had since 1937 been known to occur in the State of São Paulo but this is the first time that Rickettsia mooseri is isolated and surely identified in Brazil.

The patient is an employee at a grain located in the urban area of São Paulo and where a considerable number of rats and fleas were found. A positive complement fixation test with Bengtson's antigens (murine or epidemic) was obtained with 3 specimens of blood taken from the patient during or after the disease. Agglutinins for *Proteus* X19 were found in two specimens of serum obtained during the disease, reaching in one of them a titer of 1/20.000.

The virus was isolated from blood which was taken on the last day of fever and inoculated into 2 rats and 2 guinea-pigs. The rats did not show any febrile reaction until the 19th day after the inoculation when they were tested for complement fixing antibodies. A positive reaction with an antigen prepared with the Wilmington strain of *Rickettsia mooseri* was obtained with the serum of one of them, in a dilution of 1/64.

Both rats were then sacrificed and their brains were inoculated into guineapigs and new rats. From then on, the virus was kept through serial pig-to-pig passages. Up to the third passage, the presence of complement fixing antibodies in the blood of many guinea-pigs and rats was the main sign of infectior with the murine virus. In some pigs a scrotal reaction was then observed which became more and more marked and frequent as the virus was further passed.

Rickettsiae were found since the third passage in smears prepared with the tunica vaginalis of infected guinea-pigs.

Up to now the virus has been kept through 17 pig-to-pig and 32 rat-to-rat passages. A typical Neil-Mooser sign has been regularly observed in the infected guinea-pigs since the fifth passage.

Cross-immunity tests left no doubt that the virus is different from Dermacentroxenus rickettsi and identical with the Wilmington strain of Rickettsia mooseri.

The virus was cultivated in the yolk-sac of fertilized hen's eggs and kept through 11 egg-to-egg passages. With the egg cultures an antigen was prepared which was used in complement fixation reactions performed with several sera from infected guinea-pigs and rats. The reaction was positive with the Vollet and Wilmington and negative with the Rocky Mountain spotted fever anti-sera.

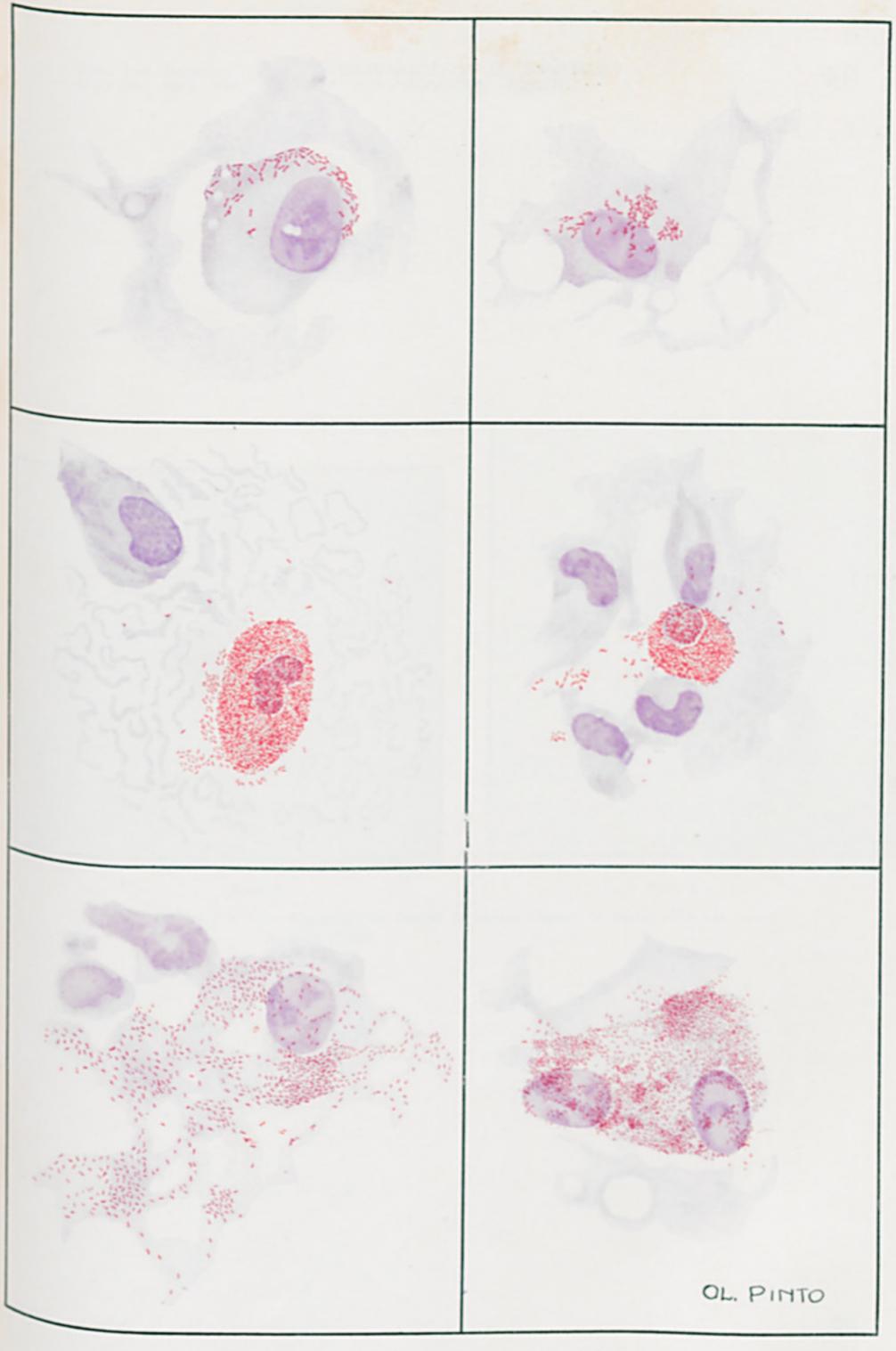
An especially interesting feature of the infection was observed in 6 rabbits moculated with the São Paulo murine strain. They showed a definite scrotal reation though of shorter duration and by far less intense than the one usually produced in the same animal by the inoculation of the São Paulo strain of Dermacentroxenus rickettsi.

Agglutinins for *Proteus* X19 were found in the blood of all six rabbits which gave also a positive complement fixation reaction with a murine (Willington) antigen.

#### BIBLIOGRAFIA

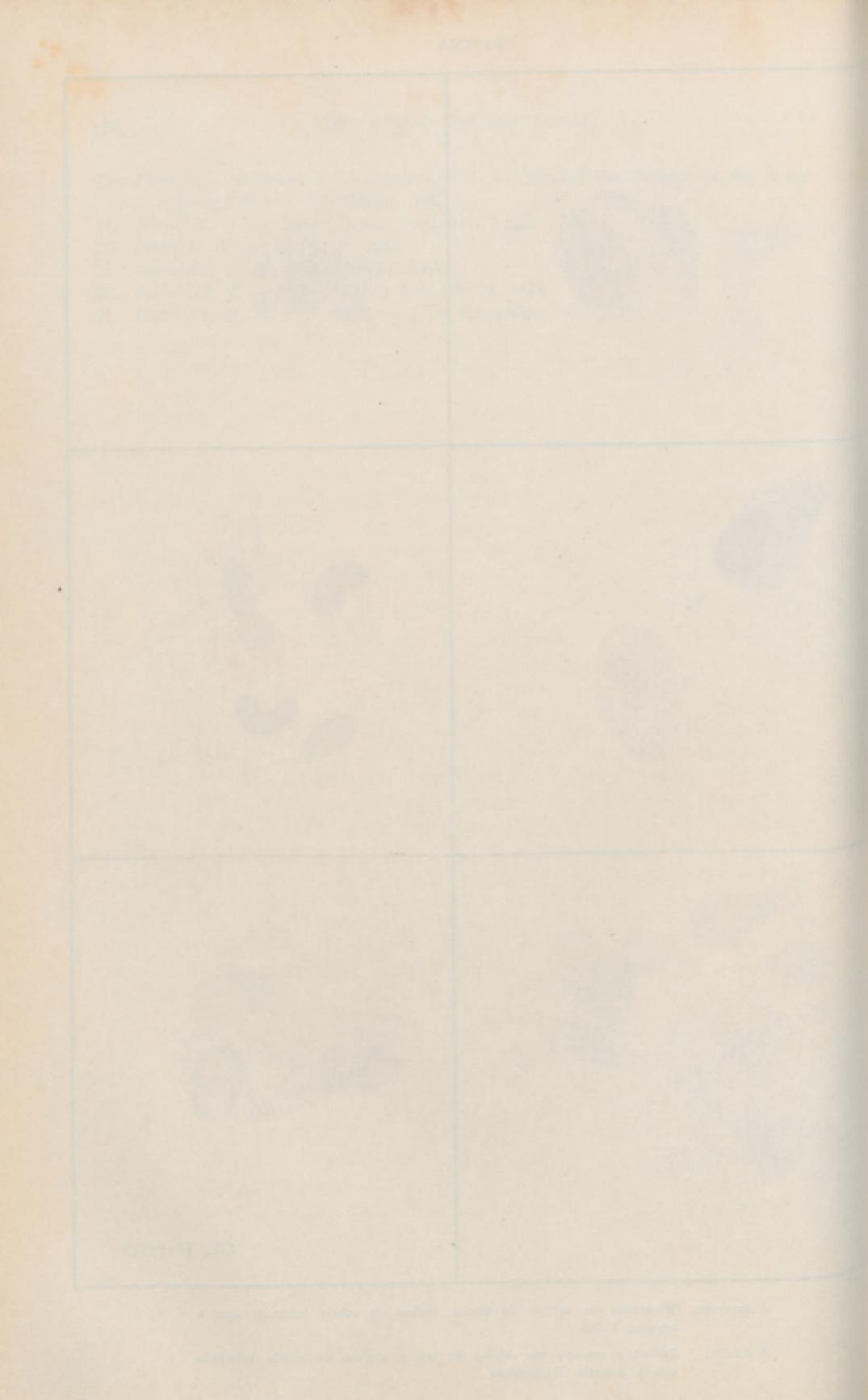
- 1. Maxcy, K. F. Public Health Rep., 41(52):2967, 1926.
- 2. Mooser, H. J. Inf. Diseases, 43:241; 261, 1928.
- 3. Monteiro, J. Lemos & Fonseca, F. da Memórias do Inst. Butantan, 7:41, 1942.
- 4. Pisa, J. T. et al. C. R. Soc. Biol., 106(4):1920, 1931.
- 5. Parker, R. R. & Davis, G. E. Public Health Rep., 48(19):501, 1933.
- 6. Dyer, R. E. Public Health Rep., 48(20):521, 1933.
- 7. Davis, G. E. & Parker, R. R. Public Health Rep., 48:1006, 1933.
- 8. Monteiro, J. Lemos Brasil Médico, 49(5):110, 1935.
- 9. Travassos, J. & Dias, E. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz, 43:149, 1939.
- 10. Gomes, L. Salles Revista do Inst. Adolfo Lutz, 1(1):21, 1941.
- 11. Pascale H. & Cruz, E. Arquivos de Hig. e Saúde Pública 10(24):297, 1945.
- 12. Pascale, H. & Prado, W. S. Arquivos de Hig. e Saúde Pública 10(24): 307, 1945.
- 13. Pascale, H. 1.º Congr. Inter-Americano de Medicina, Rio de Janeiro, 7-15 set. 1946.
- Findlay, G. M. Proc. Royal Soc. Medicine, 35:157, 1941.
- 15. Neil, M. H. Public Health Rep., 32(27):1105, 1917.
- 16. Zinsser, H. Text-book of Bacteriology, D. Appleton Century Co., 8.ª edição, pg. 665.
- 17. Mooser, H. Arch. f. Schiffs-u. Tropen-Hyg., 32:261, 1928.
- 18. Monteiro, J. Lemos Memórias do Inst. Butantan, 7:5,1931.
- 19. Nicolle, C. & Laigret, J. Arch. Inst. Pasteur de Tunis, 21:349, 1932-33.
- 20. Travassos, J. C. R. Soc. Biol., 127(5):457, 1938.
- 21. Monteiro, J. Lemos Memórias do Inst. Butantan, 8:39,1933-34.
- 22. Topping, N. & Shear, M. J. National Inst. of Health (Washington) Bulletin 183:13, 1945.

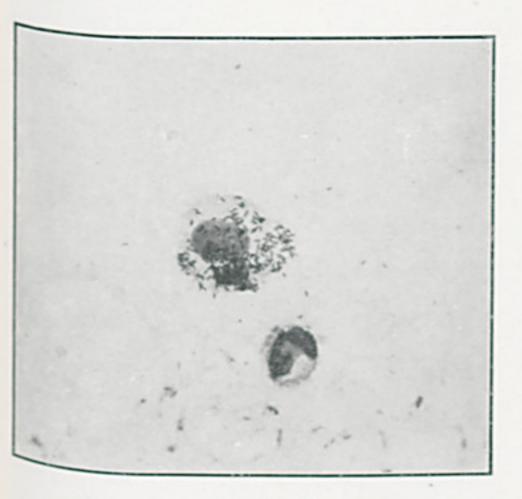
- 23. Plotz, H.; Wertman, K. & Bennett, B. L. Rep. of the Director of the Army Medical School, Washington, 1942.
- 24. Berge, T. O. Public Health Rep., 63(17):529, 1948.
- 25. Plots, H. Science, 97:20, 1943.
- 26. Avendaño, O. Comunicação pessoal.
- 27. Parker, R. R. Public Health Rep., 58:721, 1943.
- 28. Castaneda, M. R. & Silva, R. J. of Immunology, 42:1,1941.



A esquerda: Riquetsias em celulas da tunica vaginal de cobaia infectada com a amostra Vollet.

A direita: Rickettsia mooseri em celulas da tunica vaginal de cobaia infectada com a amostra Wilmington.







**Гото** 6 Fото 5 Foros 5 e 6 — Riquetsias em celulas da tunica vaginal de cobaia infectada com a amostra Vollet.





**Гото** 1

**Foto 2** 





**Гото** 3

**Гото** 4

- Foros 1 e 2 Reação escrotal em cobaia infectada pela Dermacentroxenus rickettsi, amostra isolada em S. Paulo.
- Fото 3 Reação escrotal em cobaia infectada pela *Rickettsia mooseri*, amostra Wilmington.
- Fото 4 Reação escrotal em cobaia infectada pela amostra Vollet.

A PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE 4,4'-DIAMINO-DIFENIL-SULFONA E DERIVADOS PARA A CAMPANHA ANTI-LEPROTICA. NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

FOR FRANCISCO A. BERTI; BERND RIECKMANN; CARLO PEREGO & HANS-W. RZEPPA

(Do Laboratorio de Quimioterapia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Resultados encorajadores do uso de "Promin" (1) e "Diasona" (2) na quimioterapia da lepra são citados na literatura medica desde o 2.º semestre de 1943.

Identicos resultados têm sido observados nos leprosarios do Estado de S. Paulo (3) e em outros Estados do Brasil (4). Consequentemente, foi planejada por este Laboratorio a extensão do tratamento sulfonico aos 8.900 leprosos registrados no Estado.

O principal problema para por em execução o referido plano consistiu na produção de 4,4'-diamino-difenilsulfona em larga escala e de baixo custo. O uso de materias primas de facil aquisição no mercado brasileiro e a produção de uma substancia que possua um grau de pureza maior do que aquela manufaturada por processos que partem de sulfetos e nitro-derivados, constituiram outra parte importante do nosso trabalho. Em nossa pesquisa para estabelecer o melhor metodo de sintese de 4,4'-diamino-difenilsulfona, que satisfizesse estes requisitos, experimentamos os seguintes processos:

1) pela condensação de 4-cloro-nitrobenzeno com sulfeto de sodio, em solução aquosa, foi obtido 4-nitro-4'-amino-difenilsulfeto como descrito por Lantz (5). Depois da acetilação, esta substancia foi oxidada á correspondente 4-nitro-4'-acetilamino-difenilsulfona com "superoxol" (6) ou com acido sulfo-cromico (7). Pela ulterior redução e simultanea desacetilação com cloreto estanhoso e acido cloridrico concentrado (8) ou estanho metalico e acido cloridrico concentrado (9), obtivemos a 4,4'-diamino-difenilsulfona.

Este metodo que foi por nós utilizado numa escala de laboratorio durante um ano, resultou ser antieconomico, 1) pelos grandes volumes necessarios de

- drogas, 2) pelo baixo rendimento final e ainda forneceu um produto escuro contaminado pelos metais usados nas reações intermediarias (Cr e Sn).
- 2) O 4,4'-diamino-difenilsulfeto tambem pode ser usado como materia prima. Afim de obter esta substancia, diferentes sinteses foram experimentadas tais como a ação do enxofre sobre a anilina na presença de oxido de chumbo (10) ou a redução do 4-nitro-4'-amino-difenilsulfeto (7). Os rendimentos são igualmente baixos, não havendo porisso vantagens.
- A aminação da 4,4'-dioxi-difenilsulfona poderia ter sido usada, si não se formassem simultaneamente isomeros durante a sulfonação do fenol (11).
- 4) Processos, usando anilina ou acetanilida, afim de obter a 4,4'-diamino-difenilsulfona numa via direta, não deram resultados. Como agentes sulfonantes experimentamos: trioxido de enxofre e acido clorosulfonico. Tambem pelo metodo de Wenghöffer (12), condensando acetanilida com cloreto de etilsulfurilo, não conseguimos obter 4,4'-diacetil-diamino-difenilsulfona como afirmou o autor.
- 5) A aminação da 4,4'-dicloro-difenilsulfona (13) satisfaz todas as condições acima mencionadas, dando 4,4'-diamino-difenilsulfona com 70% de rendimento. Diversos metodos foram experimentados afim de obter 4,4'-di-cloro-difenilsulfona, tais como sulfonação de clorobenzeno com trioxido de enxofre (14) ou acido sulfurico fumegante, condensação de acido 4-clorobenzensulfonico com clorobenzeno (15), a ação do cloreto de sulfurilo sôbre clorobenzeno na presença de cloreto de aluminio (16), a condensação de cloreto de 4-clorobenzensulfonilo com clorobenzeno, usando cloreto ferrico (17) ou cloreto de aluminio (18) como agentes condensantes. Este ultimo metodo com cloreto de aluminio resultou ser o melhor, tanto do lado pratico como do economico, sendo especialmente aplicavel, no nosso meio.

De todos estes processos, o primeiro poude ser aplicado somente na escala de laboratorio, emquanto que o metodo de aminação de 4,4'-dicloro-difenilsulfona tornou possivel a produção de 4,4'-diamino-difenilsulfona em escala piloto. As vantagens deste metodo são: 1) simplicidade de instalação e equipamento, 2) numero reduzido de reações intermediarias, 3) ausencia de subprodutos e isomeros, 4) nenhuma necessidade de importar materia prima, 5) alta pureza de produtos intermediarios e finais, 6) custo bem baixo da produção.

Com o nosso atual equipamento estamos aptos a produzir mensalmente 35 kg de 4,4'-diamino-difenilsulfona. Ainda que esta quantidade corresponda somente a 50% da produção calculada, ela permite a fabricação de quasi 60 kg de derivados quimioterapicamente ativos os quais são simples produtos de condensação. Apesar da nossa produção ter começado sómente em março deste ano, depois de completado o nosso equipamento industrial, até o fim de 1948

estaremos aptos a produzir quantidades de sulfonas suficientes aos leprosarios do Estado de São Paulo.

#### RESUMO

Em vista dos resultados animadores da aplicação terapeutica na lepra de derivados sulfonicos, foi elaborado um metodo de sintese, que permite a obtenção de 4,4'-diamino-difenilsulfona em grande escala, possibilitando a aplicação de seus derivados em todos os leprosarios do Estado de São Paulo. Depois de descrever brevemente os diversos processos experimentados no laboratorio e expor os inconvenientes relativos que impediram a aplicação industrial dos mesmos, são enumeradas as fases do metodo que resultou ser o melhor e que, baseado numa ciorosulfonação, numa sintese de Friedel-Crafts, seguida de uma aminação sob pressão, possibilitou a produção atual de 4,4'-diamino-difenilsulfona, que é de 35 quilos mensais.

Embora esta quantidade corresponda apenas a 50% da produção mensal planejada para os leprosarios do Estado de São Paulo, ela permite a obtenção de 60 quilos de derivados quimioterapicamente ativos. Iniciada em março do corrente ano, a produção alcançará o maximo previsto no fim de 1948, quando ficarão completas as instalações industriais.

São as seguintes as vantagens do metodo descrito:

- 1) Simplicidade das instalações e aparelhagem.
- 2) Reduzido numero de reações intermediarias.
- 3) Ausencia de produtos secundarios e de isomeros.
- 4) Nenhuma necessidade de importação de materia prima.
- 5) Alta pureza dos produtos intermediarios e do produto finai.
- 6) Muito baixo custo de produção.