

Relatorio a respeito de algumas pesquisas sobre a febre amarella.

Pelo Dr. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO.

(Chefe de Serviço)

Os casos de febre amarella recentemente occorridos no Rio de Janeiro nos offereceram oportunidade para uma serie de pesquisas experimentaes, sobre o assumpto, cujos resultados dão motivo ao presente trabalho. Antes de relatal-os aproveitamos o ensejo para externar aqui os nossos sinceros agradecimentos aos Drs. CLEMENTINO FRAGA, ROCHA LIMA, FREDERICO SOPER, NELSON DAVIS, JOHANNES BAUER, BARROS BARRETO, SINVAL LINS, BRUNO PESTANA, RAUL DI PRIMIO, AMADEU FIALHO, ARRUDA BOTELHO, CARLOS DRUMMOND, assim como aos Drs. CARLOS CHAGAS, ALCIDES GODOY e todos os collegas companheiros de Manguinhos pelo valioso auxilio que, por diversas maneiras, prestaram a essas investigações.

Os assumptos que mais de perto nos interessaram até aqui foram os seguintes:

- I. Transmissão da febre amarella aos macacos.
- II. Pesquisas do virus no sangue e órgãos de individuos fallecidos de febre amarella.
- III. Pesquisa da *Leptospira icteroides* no doente, no cadaver e nos macacos infectados.
- IV. Identidade entre febre amarella africana e a sul americana.
- V. Diagnostico sôrologico da febre amarella.
- VI. Vacinação contra a febre amarella.

TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELLA AOS MACACOS.

A descoberta, por parte de STOKES, BAUER e HUDSON de que a febre amarella na Africa era transmissivel aos *Macacus rhesus*, veio abrir largo campo para as pesquisas experimentaes sobre o assumpto, no qual até então, só tinham tido successo seguro as experiencias feitas no homem. Os casos de febre amarella do Rio de Janeiro nos offereceram oportunidade para que igualmente tentassemos obter a transmissão da molestia americana a algumas especies de simios, usando nós, com esse objectivo, até agora de exemplares das seguintes especies: *Macacus rhesus*, *Macacus cynomolgus*, *Macacus speciosus* todos estes de origem asiatica e da especie brasileira, muito commum, *Pseudocebus azarae*.

As tres primeiras especies se mostraram sensiveis sendo possivel produzir nellas a infecção amarillica tanto por inoculações de sangue humano como pela picada e inoculações de mosquitos experimentalmente infectados em doentes, ou ainda pela inoculação nos animaes dessas especies, de sangue e órgãos de macacos infectados no laboratorio.

A maioria de nossas observações foi feita em *Macacus rhesus*, dos quaes temos tido em uso bastantes exemplares.

As inoculações de material humano em *Macacus rhesus* e *cynomolgus* foi feita com material retirado de 21 doentes, uns com formas graves, outros benignas, sendo 16 com 10 a 72 horas de molestia e 5 com prazo maior de 3 dias. Esses sangues foram inoculados em 26 *rhesus* e 1 *cynomolgus*.

Algumas vezes por dispormos, no começo, de poucos animaes fomos obrigados a inocular sangue de dous doentes em um unico animal; desde, porém, que tivemos *rhesus* em maior numero se tornou possivel injectar cada sangue em um macaco e ás vezes o sangue do mesmo doente, em diferentes dias de molestia, foi inoculado a varios macacos.

As quantidades de sangue injectadas oscillaram entre 5 e 10 cc.; raramente mais. Ora o sangue era citratado, ora não, e, neste caso, o que se injectava era sôro, ás vezes um tanto sanguinolento, pela presença nelle de muitos globulos vermelhos.

As infecções mortaes, obtidas nos macacos inoculados com sangue de doentes com menos de 72 horas, alcançaram o numero de 4, tendo sido negativas todas as feitas com sangue de individuos com mais de 72 horas de molestia.

Dos macacos que não morreram em consequencia de injeccões de sangue de doentes com menos de 72 horas, um certo numero apresentou reacções febris, mais ou menos typicas, algumas das quaes foram evidentemente uma infecção benigna, porquanto esses macacos inoculados ulteriormente com o figado virulento nenhuma reacção apresentaram, demonstrando que estavam immunes. Outros macacos, porém, nas mesmas condições que os anteriores, injectados com o mesmo virus, succumbiram á injeccão, parecendo não terem tido uma infecção especifica, ou a immuniidade por acaso por elles adquirida, em consequencia da injeccão do sangue do doente, não foi sufficiente para protegel-os contra a infecção produzida pela inoculação de material virulento.

Observámos uma vez que o sangue de um doente (caso grave e mortal) injectado em dous dias successivos causou a morte do animal com a amostra colhida 36 horas depois do inicio da molestia, ao passo que, aquella que foi retirada estando o doente com 10 horas apenas, não produziu, no animal, senão pequenas oscillações febris pouco typicas. Este macaco, porém, se mostrou immune á injeccão ulterior de virus, o que demonstrou ter elle tido uma infecção ligeira mas insufficiente para produzir a sua morte. Os mosquitos que sugaram o mesmo doente tanto com 10 como com 36 horas de molestia se infectaram e se mostraram capazes de transmittir a molestia ao *Macacus rhesus*.

Dos 4 casos em que a inoculação de sangue produziu uma infecção mortal nos macacos, 3 provinham de doentes muito benignos de febre amarella e 1 de um caso grave mortal, o que parece demonstrar que os casos benignos são mais favoraveis á infecção dos macacos do que os graves. Na maioria dos casos as injeccões de sangue foram feitas no mesmo dia da colheita, mas não ha nenhum inconveniente em que o sangue seja conservado na geladeira a 8 grãos, pois tivemos 2 inoculações positivas com sangue que estivera 48 horas naquella temperatura, e 1 com sangue guar-

dado, nas mesmas condições, durante 9 dias. Estes mesmos sangues que foram positivos com 48 horas deram resultados negativos quando inoculados com 14 dias de conservação em temperatura de 0°, não nos parecendo que a conservação do virus a frio, seja segura além de 10 dias, nem que temperaturas abaixo de zero sejam especialmente favoráveis para isso, pois não observámos melhor conservação do virus nesta temperatura.

Os resultados das inoculações de sangue dos doentes nos *Macacus rhesus* mostram que estes simios não são tão sensíveis quanto fôra de esperar-se e, que de um grande numero de animaes, sómente alguns delles vêm a morrer, e outros ou têm uma infecção ligeira ou nada apresentam e nem mesmo adquirem, alguns, uma immuniidade solida capaz de os fazer resistir a uma inoculação ulterior do virus.

A actividade do virus isolado do animal não parece ser desde logo muito grande, depois de 4 passagens não obtivemos mais de 0,2 cc. de sangue como dose minima mortal, mas certamente, com inoculações successivas em *rhesus*, afinal se conseguirá obter virus capazes de matar na dose de 0,0001 milligramma, como succede aos isolados na Africa.

A molestia no *rhesus* infectado pela inoculação de sangue de doente, ou sangue e orgãos de outro *rhesus*, ou a obtida pela picada do *Aedes ægypti* ou pela inoculação de emulsões desses insectos, evolue num prazo que varia de 5 a 15 dias, sendo este o periodo maximo por nós observado. A doença transcorre, entre nós, de modo absolutamente semelhante ao observado nos animaes infectados com os virus isolados na Africa, pela commissão americana.

Nos casos de evolução rapida a temperatura se eleva, ás vezes, desde os primeiros dias; outras vezes ha, a principio, algumas alternativas de elevações e baixas de temperatura, mais ou menos accentuadas, e no 4° e 5° dias a curva thermica sobe bruscamente de 1 a 1,5 grãos acima da normal primitiva do animal e no dia seguinte começa a cahir, rapidamente, entrando elle em hypothermia accentuada e afinal morre em colapso. Os traçados juntos (figs. 6, 7 e 8) dão uma ideia clara das curvas thermicas em taes casos.

Geralmente, no periodo em que a temperatura se eleva bruscamente, o animal perde o appetite e começa a apresentar menor vivacidade. Quando ella principia a cahir rapidamente abaixo da normal o macaco fica triste, encolhido a um canto da gaiola; deixa-se facilmente apanhar e muito enfraquecido apoia o corpo nos membros dianteiros um tanto affastados um do outro, e sua cabeça pende para diante, numa posição muito característica. Finalmente o animal tomba a fio comprido na gaiola e não tarda a morrer. (Figs. 2 e 3).

Nem sempre, porém, uma baixa accentuada da temperatura é signal seguro de morte do animal, o qual póde recuperar a temperatura e curar-se mesmo depois de uma quêda brusca de cerca de dous a tres grãos abaixo da normal.

Quando a molestia se prolonga muito, então a regra é haver duas ou mais elevações thermicas, seguidas de periodos de temperatura quasi normal, ou sub-normal, antes que occorra a morte do *rhesus* (Figs. 4 e 5). Ha casos ainda em que a molestia evolue durante dias após á inoculação de sangue virulento sem alterações thermicas notaveis; permanecendo a curva

quasi inalterada para só se elevar nos dous dias que precedem a morte do animal (Fig. 9).

Além das infecções com sangue humano também foi possível obter a infecção dos *Macacus rhesus* por meio da picada de mosquitos que tinham sugado o doente 17 a 30 dias antes, sendo suficiente, neste ultimo caso, um só mosquito para produzir uma infecção mortal no macaco.

Duas vezes também nos foi possível obter a infecção de um *rhesus* pela inoculação de emulsões de mosquitos, experimentalmente infectados, sendo que uma dellas foi conseguida pela inoculação de emulsão de 10 *Aedes aegypti* que 5 dias antes haviam sugado um doente. Esta experiencia mostra que o virus da febre amarella existe no mosquito, em boas condições para infectar, antes que este seja capaz de transmittil-o por picada, isto é, que tenha virus no seu aparelho secretor salivar, o que confirma os resultados anteriormente obtidos na Africa por BAUER e HUDSON.

Nem todos os *Macacus rhesus* inoculados com o virus de outro *rhesus* anteriormente infectado apresentam uma molestia typica e vêm a morrer. Não poucos escapam depois de apresentarem alterações thermicas elevadas, dias seguidos, e chegarem a ter as urinas muito amarellas e carregadas de albumina como é a regra nos periodos adiantados da molestia no *rhesus*. Este facto talvez seja devido á virulencia ainda não bastante forte do virus ou talvez a uma outra causa ainda por esclarecer.

Como já tivemos occasião de dizer, além do *Macacus rhesus* também pesquisámos a sensibilidade do virus amarillico para o *Macacus cynomolgus*, o *Macacus speciosus* e o *Pseudocebus azarae*.

O primeiro *Macacus cynomolgus* nós o infectámos inoculando-o com sangue de 2 doentes atacados de febre amarella benigna e o animal veio a morrer 8 dias depois com a fôrma typica da molestia, curva thermica caracteristica e lesões anatomopathologicas macro e microscopicas absolutamente eguaes ás dos *Macacus rhesus*. Um segundo *cynomolgus* inoculado com 0,2 cc. de sangue de um *rhesus* infectado morreu do mesmo modo que o anterior, 6 dias depois da inoculação, com lesões e curva thermica caracteristicas (Fig. 8).

Em ambos os casos se tratava de animaes adultos e muitos desenvolvidos. Temos a impressão de que o *cynomolgus* é um macaco tão sensivel quanto o *rhesus* á inoculação do virus humano ou de origem animal e pelo seu grande tamanho offerece vantagem para certas experiencias, pois não sómente póde fornecer grande quantidade de sangue como de orgãos, o que tem importancia no caso do preparo de vaccina anti-amarillica.

Da especie *Macacus speciosus* só tivemos um exemplar de 3 mezes de idade. Este macaco foi inoculado com a emulsão de figado de um *rhesus* que morrera de febre amarella e teve uma forma prolongada da molestia com algumas elevações thermicas (Fig. 5) e veio a morrer, ao cabo de 13 dias da inoculação, com lesões caracteristicas, porém mais discretas que as dos outros dous macacos já experimentados.

Quanto ao *Pseudocebus azarae* só tivemos occasião de inocular 2 exemplares; um com sangue de um doente com mais de 72 horas de molestia não teve reacção alguma; outro injectado com virus de *rhesus* teve febre durante varios dias, mas sacrificado, ainda durante o periodo febril, nada apresentou de suspeito pelo exame anatomopathologico de suas visceras.

Alem destas especies de simios não temos usado de outras nas experiencias até agora feitas.

As lesões anatomo-pathologicas nos macacos sensiveis á infecção amarillica, o *M. rhesus*, o *M. cynomolgus* e o *M. speciosus*, são de um modo geral as mesmas e em tudo identicas ás observadas nos macacos infectados com o virus africano, e muito semelhantes ás do homem, e como estas, absolutamente caracteristicas e constantes.

Estas lesões de um modo geral são as seguintes :

Ictericia pouco accentuada e só ás vezes notavel por uma cor ligeiramente amarellada da pelle e mucosas e pelo colorido da aorta. Hemorrhagias no estomago e intestino pódem ser encontradas especialmente nos casos em que a molestia é prolongada; ellas faltam ou são muito escassas e então quasi que limitadas ao estomago, nas formas agudas. Pequenas petechias podem ser observadas na pleura, no pericardio e endocardio. Coração em geral pallido e flaccido. Fígado amarello camurça em muitos casos, em outros amarellado na totalidade do orgão, ou pardacento com áreas amarelladas mais ou menos extensas; lobulos visiveis e vasos injectados. O orgão é mais ou menos friavel e tem o seu colorido em dependencia com a gordura nelle contida.

Baço ligeiramente augmentado de volume com colorido vermelho escuro, ás vezes um tanto azulado. A superficie de secção é nitida, a polpa consistente e os glomerulos visiveis.

Rins um pouco augmentados, pardo amarellados mais claros que os normaes com a superficie de secção parda avermelhada e as camadas cortical e central distinctas. Capsula destacando-se bem. A bexiga contem, ás vezes, urina de colorido amarello intenso, rica de albumina e contendo cylindros hyalinos e granuloses.

O exame microscopico dos orgãos revela pequenas hemorrhagias no pulmão, coração, estomago e intestino em certos casos. No figado intensa degeneração gorda, necrose mais ou menos intensa das cellulas com alterações acidophilas do protoplasma e dos nucleos, pycnose e caryorrhixis. Não raro as cellulas perdem suas connexões normaes, outras apparecem com o aspecto de amebas. Os nucleos se córam mal e apparecem alterados na fórma. A necrose das cellulas occupa em geral a zona media do lobulo ao longo das traves de HENLE, mas póde se estender e apenas poupar a camada de cellulas que circumda o espaço porta. Infiltrações leucocytarias discretas no figado são frequentemente observadas.

No baço observa-se especialmente uma intensa hyperplasia dos folliculos e augmento das cellulas endotheliaes phagocytarias na periphéria do glomerulo. Nos rins a tumefacção turba lesões de nephrite aguda, degeneração gordurosa e necrose de cellulas; cylindros hyalinos e granuloses e as vezes os de calcio. No figado e rins as lesões são as classicas descriptas pelo Prof. ROCHA LIMA para a febre amarella humana.

A degeneração gordurosa existe em maior ou menor gráo em diversos orgãos, mas no cerebro se observa apenas congestão, não se notando a presença de gordura nas cellulas nervosas do macaco conforme verificações do Prof. JAKOB e Drs. AMADEU FIALHO e E. VILLELA.

As alterações nucleares das cellulas do figado estão sendo objecto

de estudos muito interessantes por parte de nosso collega Dr. MAGARINOS TORRES.

As lesões acima referidas, tanto as macro como as microscopicas, podem variar em intensidade conforme o caso e não faltam nos animaes que socumbem á infecção.

Quando porem se sacrificam os animaes no inicio do periodo thermico ou aquelles com baixa de temperatura post-febril mas inoculados com um virus ainda pouco activo e nos quaes provavelmente a molestia evoluiria para a cura, as lesões classicas do figado e rim podem faltar ou ser muito escassas.

Sempre porem que se sacrifica um animal tanto no periodo de hyperthermia como no de hypothermia mas cujo sôro sanguineo já está amarello devido aos elementos biliares nelle contidos e ha albumina na urina então não faltam as lesões de necrose do figado nem a nephrite, alem da classica degeneração gordurosa, etc.

As lesões anatomo-pathologicas dos macacos infectados com febre amarella no Brasil não differem das obtidas com o virus africano.

II

PESQUIZA DO VIRUS NO SANGUE E ORGÃOS DOS INDIVIDUOS FALLECIDOS DE FEBRE AMARELLA.

Tivemos occasião de pesquisar a virulencia do sangue e dos orgãos de amarellentos para o *Macacus rhesus* com material de 7 autopsias, feitas 1 a 4 horas após a morte, em individuos que tinham fallecido no 4º e 5º dia da molestia. Os macacos foram inoculados 1/2 a 2 horas após a autopsia, verificando-se, na occasião, por sementeiras, a ausencia de bacterias de associação secundaria nos orgãos, os quaes foram colhidos com a possivel asepsia e cujos fragmentos eram lavados em agua physiologica esteril, repetidas vezes, antes de serem usados. Uma parte do orgão depois de esmagada em um gral, com areia esteril, era diluida em 4 partes de agua physiologica, filtrada em gaze e a emulsão obtida servia então para as injeccões nos macacos, por via subcutanea, na dose de 2 a 5 centimetros cubicos.

As inoculações foram feitas com sangue, figado, rim, baço, medulla ossea e cerebro. O figado foi injectado isoladamente em 3 *Macacus rhesus*, assim como o sangue e o rim em dous outros desses macacos. Quatro *rhesus* foram inoculados com mixturas de varios orgãos. Nenhum dos 9 animaes inoculados veio a morrer de febre amarella e dos que tiveram reacções febris dous que foram sacrificados nada apresentavam que fizesse suppor estarem infectados com o virus amarillico.

Tanto quanto se pôde concluir por estes resultados parece que o virus da febre amarella não existe nem no sangue nem nos orgãos dos amarellentos, o que confirma o seu desapparecimento total, no organismo humano, depois do terceiro dia de molestia.

III

PESQUIZA DA *LEPTOSPIRA ICTEROIDES*.

Em 15 casos de febre amarella as pesquisas feitas para descoberta da *Leptospira icteroides* pela verificação microscopica, isolamento em cul-

tura e pela inoculação em cobayas jovens do mais variado material, sangue, urina, de doentes em diversos estadios da molestia, assim como material colhido nos órgãos de cadaveres, figado e rim, alem de sangue e urina, todas deram resultados negativos. Os exames a fresco do material, em campo escuro, as impregnações e colorações não tiveram o minimo successo.

As cobayas inoculadas quando apresentavam temperaturas elevadas foram sangradas no coração ou sacrificadas sendo o seu sangue e emulsões de órgãos inoculados a outros animaes novos. As reacções febris nas cobayas porém, desapparecem ao cabo de 3 pasagens como já foi observado por STOKES, BAUER e HUDSON. No sangue e órgãos de taes animaes não se encontram *Leptospiras*. Tambem resultaram negativas as inoculações de sangue e órgãos de macacos em cobayas e tambem não d eram resultados os exames directos para *Leptospiras* nesses animaes.

A prova de PFEIFFER, feita com 8 sôros diferentes, provenientes de doentes com 8 a 15 dias de convalescença, resultou negativa *in vivo* em cobayas novas, quer com a *Leptospira icteroides* isolada na Bahia por NOGUCHI e seus collaboradores (raça Palmeira) quer com uma raça de *Leptospira icterohæmorrhagiæ*, continuando ambos os parasitas vivos, até 2 horas depois da experiencia, no peritoneo de cobayas injectadas com 1/2 cc. de sôro e 1/2 cc. de cultura.

Diante dos resultados negativos de todas estas pesquisas alliadas a outras anteriormente obtidas por diversos auctores na Africa (STOKES, BAUER e HUDSON, MATHIS e SELLARDS) e tambem no Brasil no homem (GÔMES DE FARIA, MARQUES DA CUNHA, OLYMPIO DA FONSECA, BORGES VIEIRA, BURLE DE FIGUEIREDO) se pôde concluir que a *Leptospira icteroides* não desempenha papel etiologico na febre amarella. Muito provavelmente a *Leptospira icteroides* figura nos casos em que foi isolada como um germe de associação secundaria provindo talvez do intestino nos individuos que ingerem aguas de má qualidade e polluidas por *Leptospira*.

Esta hypothese nos parece provavel em vista do isolamento, cada vez mais frequente, de *Leptospiras* pathogenicas para cobayas, directamente das aguas de minas, arrosaes, poços, etc., o que torna muito provavel que esses germes levados ao tubo digestivo com as aguas contaminadas passem ulteriormente para o sangue em certos estados infectuosos graves como a febre amarella.

Menos provavel nos parece a hypothese de que entre os casos de febre amarella estudados por NOGUCHI e seus collaboradores houvessem alguns de molestia de WEIL que não foram identificados e dos quaes tivesse isolado a *Leptospira* que foi denominada de *icteroides*.

IV

IDENTIDADE DA FEBRE AMARELLA AFRICA NA E SUL AMERICANA.

Os trabalhos realizados entre nós durante a actual epidemia de febre amarella, nas condições as mais favoraveis, permitem excluir, segundo pensamos, o papel etiologico da *Leptospira icteroides* na febre amarella. Tambem na Africa os resultados a este respeito foram absolutamente negativos de modo que se pôde concluir que nenhuma differença etiologica

existe entre as duas molestias, tanto a que reina na Africa como aqui entre nós, ambas devidas a um virus ainda desconhecido.

A identidade entre as duas molestias está, de resto, perfeitamente estabelecida pelos seus aspectos clinicos, lesões anatomo-pathologicas, epidemiologica e por terem ambas, praticamente, um só transmissor, o *Aedes aegypti*.

As experiencias aqui feitas vieram demonstrar que o *Macacus rhesus* era sensivel ao virus americano da mesma forma que ao virus africano, o que ainda mais identifica as duas molestias.

A estas provas ainda podemos juntar mais uma que é a da immuni-
dade cruzada entre o virus africano e a americano.

Tendo o Dr. CARLOS CHAGAS trazido do Instituto Pasteur, conservados em gelo, fragmentos de figado de *rhesus* infectado com o virus africano, o material foi aqui inoculado 20 dias depois num *rhesus* e ulteriormente em outro. O primeiro macaco teve uma reacção febril de 40° no 5° dia e o segundo não teve reacção febril accentuada, parecendo que o virus perdera a virulencia ou a tinha já tão attenuada que era incapaz de causar a morte do animal.

Era de suppôr porêm, que esse virus embora attenuado fosse sufficiente para dar aos *rhesus* uma immuni-
dade contra a inoculação de um virus homologo. De facto foi isto que se verificou, e os dous *Macacus rhesus* acima mencionados, injectados com uma emulsão de figado de *rhesus* infectado com o virus, aqui isolado, nenhuma reacção tiveram, ao passo que um testemunha morria em 7 dias, o que demonstra que a primeira inoculação com o material africano, embora sob uma fórmula attenuada, fôra sufficiente para o proteger contra o nosso virus demonstrando a identidade delles.

V

TENTATIVAS PARA OBTER UM DIAGNOSTICO SOROLOGICO DA FEBRE AMARELLA.

Uma questão da mais elevada importancia na febre amarella é se conseguir um methodo seguro para o seu diagnostico, dado o grande numero dos casos que evoluem atypicamente, e dos que, por sua benignidade, não se differenciam de uma grippe banal, e que por esse facto e pela sua infecciosidade são mais perigosas sob o ponto de vista hygienico. Dahi o interesse que ha em descobri-los a tempo. Com esse objectivo procurámos, desde o começo de nossos trabalhos sobre febre amarella experimental, verificar si não seria possivel obter um diagnostico sorologico do mal, usando do desvio do complemento.

Pondo em pratica este methodo, empregámos ao começo, como antígeno, o sôro de doentes no 1° e 2° dias de molestia, na dose de 0,5 cc., e como anticorpo o sôro de convalescentes com 8 a 15 dias, na dose de 0,2 a 0,5 cc. O complemento empregado foi o de cobaya e como systema hemolytico usámos o sôro de coelho anti-carneiro e globulos de carneiro, lavados.

Os resultados das experiencias em 8 doentes convalescentes tendo sido negativos resolvemos substituir o antigeno, sôro de doente no inicio da molestia, por um extracto phenicado de figado de *rhesus*, preparado

emulsionando-se 5 grammas de polpa do figado, finamente esmagada, em 100 cc. de agua physiologica phenicada a 0,5%. A emulsão assim feita era filtrada em papel, depois deixada em repouso durante alguns dias, sendo então verificado o seu poder impiedente. Este antigeno foi empregado na dose de 0,2 a 0,4 cc. com os mesmos sôros de convalescentes anteriormente usados, não dando, porem, resultado positivo algum.

Os resultados até agora obtidos nas experiencias de desvio do complemento não têm sido absolutamente favoraveis, mas é possivel que, com outras technicas, se chegue afinal ao resultado desejado.

O sôro dos amarellentos nenhuma influencia tem sobre as reacções de WASSERMANN que permanecem negativas e, tanto no começo como na convalescença da molestia, quando antecedentes de syphilis podem ser excluidos como podêmos verificar em 8 casos por nós observados.

Como elemento para estabelecer um diagnostico de febre amarella ainda se pode aproveitar, em certos casos, as propriedades preventivas que adquire o sôro dos individuos que se curam da molestia.

O sôro de convalescente previne facilmente a infecção do macaco, como demonstram STOKES, BAUER e HUDSDN, ao passo que 2 c.c. de sôro de homem normal não têm acção alguma. Assim sempre que estivermos diante de um caso suspeito de ter sido de febre amarella, mas que pela benignidade ou por ter sido visto tardiamente não permittiu um diagnostico preciso, podemos esclarecel-o de um modo relativamente facil, pesquisando as propriedades preventivas do sôro. Tomam-se 2 c.c. de sôro do individuo suspeito ou injecta-se como elle um *Macacus rhesus*, 24 horas depois inocula-se o mesmo animal com uma dose mortal de virus e se elle não adquirir a molestia é que o sôro usado é preventivo e ha toda a probabilidade senão certeza de que o caso tenha sido de febre amarella; si, pelo contrario, o animal adoecer se deverá considerar o caso como negativo. Este é um methodo a experimentar e que póde prestar serviços ao hygienista, esclarecendo certos casos duvidosos, permittindo a filiação de uns casos a outros e fornecendo ao hygienista dados epidemiologicos mais precisos e muito proveitoso em certos casos.

O processo já foi usado em tres casos de certa importancia epidemiologica nesta cidade, observando-se em dous delles, resultados positivos com a verificação das propriedades preventivas do sôro dos individuos suspeitos e no terceiro caso foi a prova considerada negativa e excluida a suspeita de febre amarella por não ter o sôro protegido o *rhesus* contra a inoculação do virus. Foram de grande utilidade para os trabalhos epidemiologicos da Saúde Publica os reultados obtidos com o emprego deste processo de diagnostico para o esclarecimento dos tres casos acima referidos.

VI

VACCINAÇÃO CONTRA A FEBRE AMARELLA.

A vacinação contra a febre amarella póde ser feita por dous methodo diversos, tanto pela immunização passiva por inoculação de sôro de convalescentes ou de um macaco immunizado por inoculações repetidas de material virulento, como pela inoculação de uma vaccina preparada com sangue ou orgãos de macacos infectados.

Temos empregado muitas vezes o sôro de convalescentes como methodo de protecção passageira contra a infecção. Primeiramente elle foi usado em Manguinhos para proteger aquelles que trabalhavam nos laboratorios com macacos infectados e ulteriormente o seu emprego foi ampliado a pessoas que habitam os fôcos e á outras que se queriam proteger contra qualquer eventualidade. Orça por 50 a 60 as pessoas assim protegidas, tendo todas supportado bem as injeccões que, só num ou noutro caso, produziram uma certa depressão passageira, toda individual. O sôro usado foi o de pessoas que estavam com 15 dias a 1 mez de restabelecimento de ataques benignos e graves da molestia. Entre as pessoas assim protegidas contra a febre amarella nenhum caso da molestia occorreu até agora, sendo usados nellas 1 a 2 c.c. de sôro, por via subcutanea, como dóse vaccinante.

O emprego do sôro de convalescentes é, no emtanto, de uso limitado, dadas as difficuldades que ha em obter-o em grandes quantidades para emprego em mais larga escala.

Estamos immunizando, com sangue e orgãos de *rhesus* infectados, 1 cavallo e 2 carneiros e 6 *rhesus*, com o fim de obter delles um sôro que tenha eventualmente, uma acção immunizante sufficiente, de modo que elle possa ser com vantagem mais largamente usado, em certos fôcos da molestia.

E' possivel tambem que o sôro de animaes immunizados cuja acção preventiva acaba de ser demonstrada no Instituto Pasteur de Paris, tenha tambem uma acção curativa efficaz no homem, quando empregado nos primeiros dias de molestia e em grandes quantidades.

A vaccina contra a febre amarella, destinada a ter o maior successo, é evidentemente a preparada com emulsão de orgãos de *Macacus rhesus* ou *cynomolgus* infectados e esterilizados por algum dos processos conhecidos.

A commissão franceza do Instituto Pasteur já havia demonstrado que o sôro aquecido, de um doente nos primeiros dias da molestia, quando o virus está presente nelle, tinha uma acção vaccinante evidente, em relação á infecção amarillica no homem. Era portanto de esperar que os orgãos do *Macacus rhesus* ou *cynomolgus* cheios de virus offerecessem condições muito favoraveis para o preparo de uma vaccina, e assim, desde que infectamos o primeiro *Macacus rhesus*, aproveitamos os orgãos do animal para prepara-la, reduzindo-os a uma polpa que, depois emmulsionada em agua esterilisada na proporção de 1: 9, foi filtrada em gaze e esterilisada pelos vapores de formol, seguindo a technica por nós usada desde 1911 para esterilisar a vaccina contra a espiroquetose das gallinhas.

Já estava a vaccina preparada e em experiencias no *rhesus* e no homem, quando recebemos o trabalho de HINDLE relatando seus interessantes e precusores trabalhos com as vaccinas por elle usadas contra a febre amarella, uma simplesmente formolada, outra glycerinada e phenicada, usando em ambas uma parte de figado para quatro da solução esterilisante, no primeiro caso formol a 1^o/₁₀₀, e no segundo uma solução de 60% de glycerina em agua phenicada a 0,5^o/₁₀₀.

Resolvemos então preparar a vaccina glycerinada e phenicada, como recommenda HINDLE, e para comparação com esta, uma outra formolada a 2^o/₁₀₀ e phenicada a 0,5^o/₁₀₀, visando obter nesta uma garantia mais perfeita de esterilidade em relação á bacterias e bolores, sem prejuizo da conser-

vação do virus. Estas duas vaccinas deram bons resultados nos *rhesus*, protegendo-os contra infecções experimentaes, e foram, por isso, experimentadas no homem.

Como a vaccina glicerinada se tivesse revelado mais dolorosa, começamos a usar no homem, em larga escala, a vaccina phenicada e formolada que é muito mais supportavel, dóe apenas um pouco, no momento da inoculação e não dá reacção ulterior.

A technica que actualmente usamos para o preparo da vaccina é a seguinte: Infecta-se um *rhesus* ou *cynomolgus* sadios, com uma quantidade certamente mortal do virus, e quando o animal, depois de ter a elevação thermica característica, entra na phase de hypothermia e, ás vezes, antes mesmo della, é elle sacrificado pelo chloroformio. Os órgãos são immediatamente retirados com a maxima asepsia, usando-se no preparo da vaccina, o figado, rins, baço e cerebro, que são collocados em grandes placas de PETRI esterilizadas e cuidadosamente examinados. Uma vez reconhecido que estão perfeitamente sadios, são lavados em agua physiologica, enxutos em papel de filtro esteril e pesados.

Em seguida são os órgãos cortados em pequenos fragmentos que se collocam em um gral com areia lavada esteril, sendo então esmagados cuidadosamente. Isto feito, addiciona-se a uma parte de órgão, 5 de agua distillada esterilizada formolada a 2 por mil e phenicada a 0,5% agitando-se e descollando o material até obter uma emulsão fina e homogenea, que é filtrada em 4 folhas de gaze e recebida em um balão esteril. Este filtrado é a vaccina, que se colloca então durante 5 dias na geladeira, verificando-se, depois desse prazo, se sua esterelidade é completa por meio de sementeiras em meios anaerobios e aerobios e inoculação de 0,5 cc. em 2 cobayas.

Desde que os meios de cultura permanecem estereis, a vaccina é distribuida em empolas com os cuidados habituaes e semeada de novo. Si sua esterilidade é perfeita e se as cobayas, decorrido o prazo, permanecem sadias, é a vaccina considerada prompta para o emprego no homem.

A dóse que está sendo usada no homem adulto é de 2 c.c. por via subcutanea, tendo-se o cuidado de agitar a empola para emulsionar o material nella contido, que se deposita quando em repouso.

A vaccina formolada e phenicada, preparada como acima ficou, dito é um líquido roseo amarellado, turvo, dando um pequeno deposito e não tendo cheiro desagradavel, nem se sentindo o do formol ou do acido phenico nella contidos.

Esta vaccina começou a ser usada no Instituto Oswaldo Cruz entre as pessoas que nelle trabalham em febre amarella, e não tendo dado reacções desagradaveis, começou a entrar em uso corrente, e o Departamento de Saúde Publica já recebeu e a está empregando em maior escala, em pequenos fócios isolados de febre amarella e no Estado do Rio, podendo-se calcular que o total de pessoas vaccinadas já excede a tresentas. Ella tem sempre sido bem supportada. Não deu reacções incommodas e, entreos vaccinados, não houve caso algum de febre amarella, mas tratando-se de uma observação em pequena escala, não se pode ainda ter opinião definiva a respeito.

Actualmente cerca de 2 mil doses de vaccina estão promptas para as experiencias á serem feitas pela Saúde Publica.

Com o proseguimento das experiencias de Laboratorio com a vaccina, e com o seu emprego em maior escala na pratica, é de esperar que se chegue, dentro em pouco, a resultados seguros sobre as suas vantagens praticas, tempo de conservação, duração da immuidade, etc.

São estes, em resumo, os resultados á que, até agora, chegamos nestas pesquisas sobre a febre amarella no Rio de Janeiro.



Fig. 1—*Macacus rhesus* normal.
Fig. 1—Normal *Macacus rhesus*.

Phot. J. Pinto.

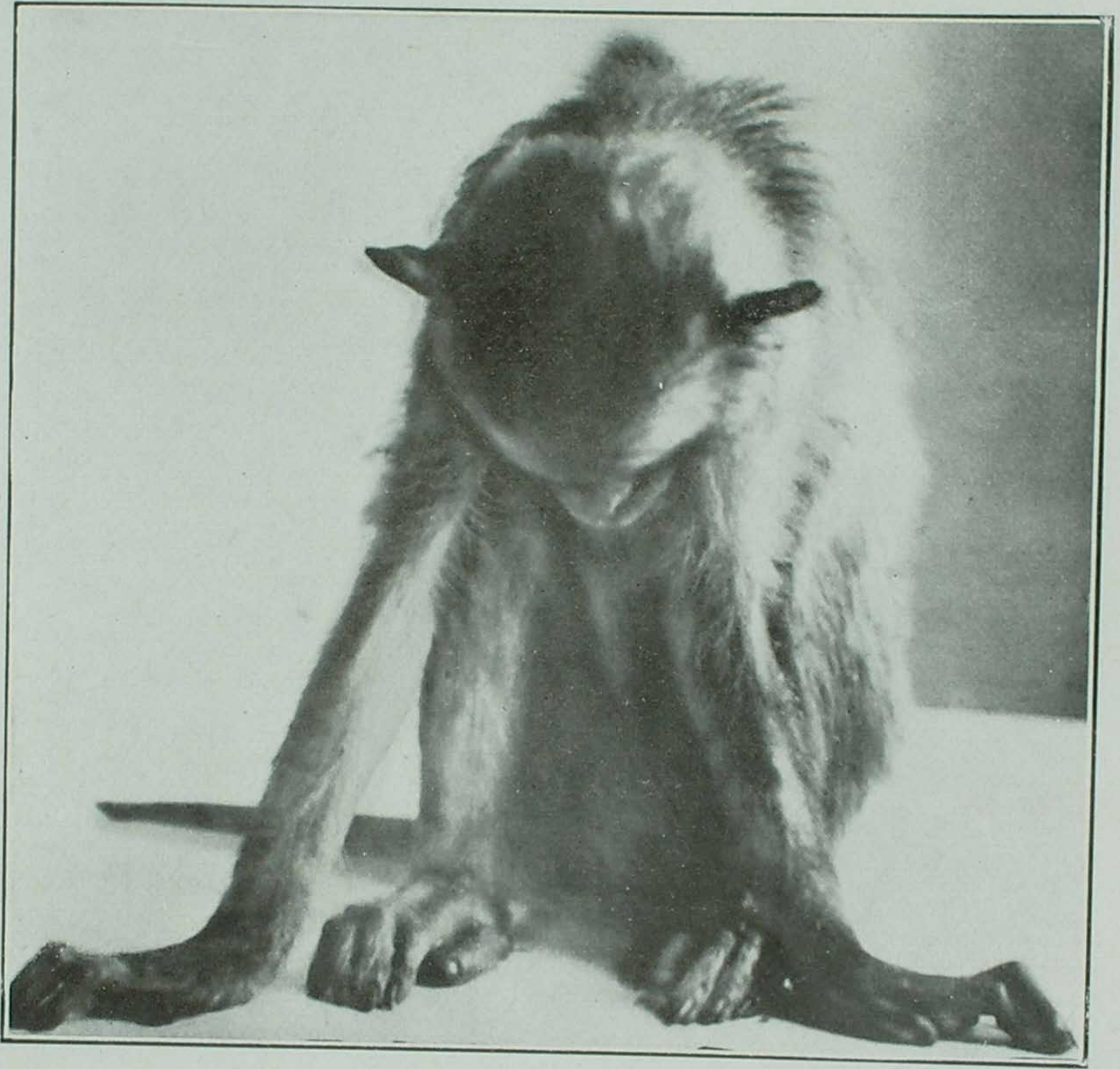


Fig. 2—*Macacus rhesus* doente em periodo adeantado de hypothermia. Temp. 36^o,2.
Fig. 2—*Macacus rhesus*, ill, within the advanced period of hypothermy. Temp. 36^o,2.

Phot. J. Pinto.

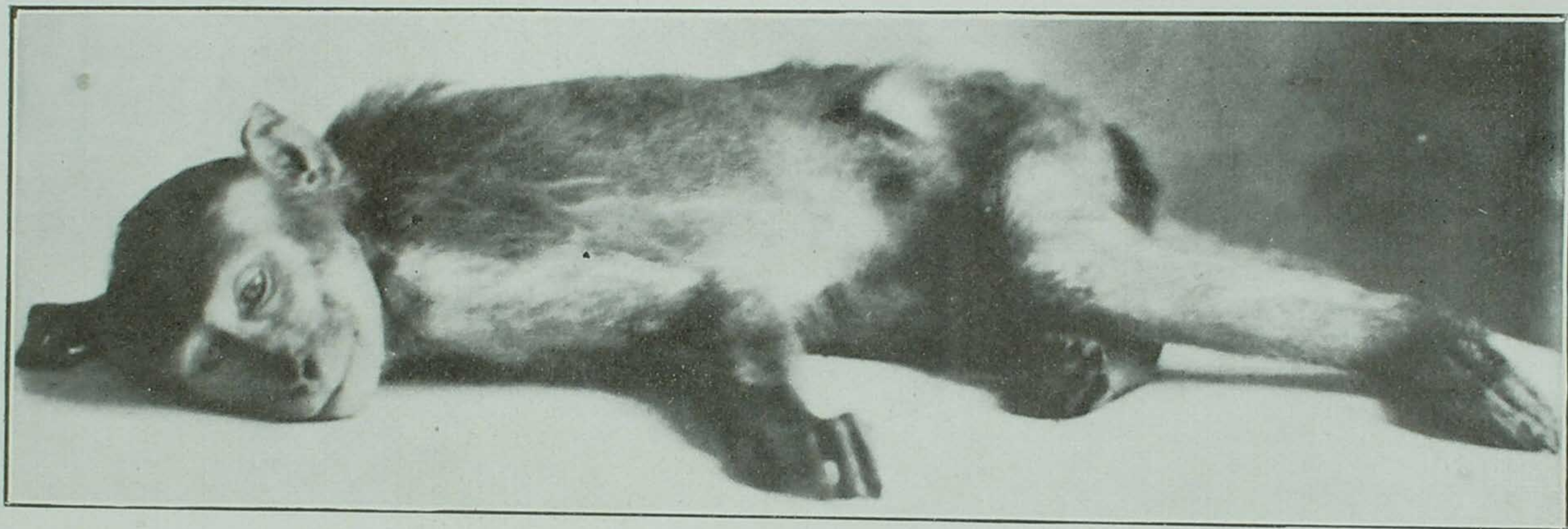


Fig. 3—*Macacus rhesus* doente, em coma, prestes a morrer. Temp. 33°,4.
Fig. 3—*Macacus rhesus*, ill, in collapse, about to die. Temp. 33°,4.

Phot. J. Pinto.

Macacus rhesus
Nº 35

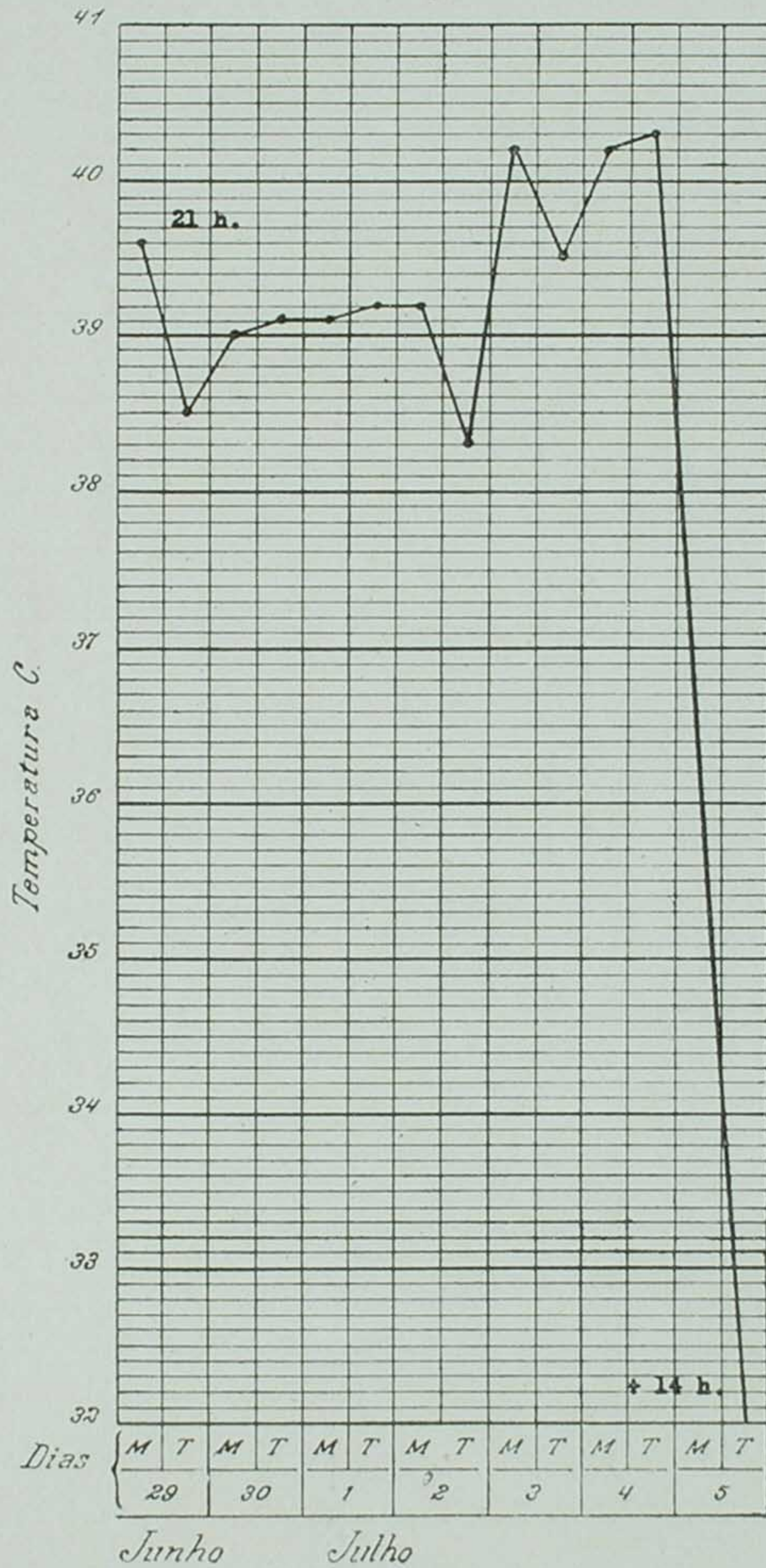


Fig. 6—Curva termica do *rhesus* n. 35. Infectado por mosquitos que tinham picado, 17 dias antes, um doente com 29 horas de molestia.

Fig. 6—Thermic curve of the *rhesus* n. 35. Infected by mosquitoes, which had bitten, 17 days before, a patient with 29 hours illness.

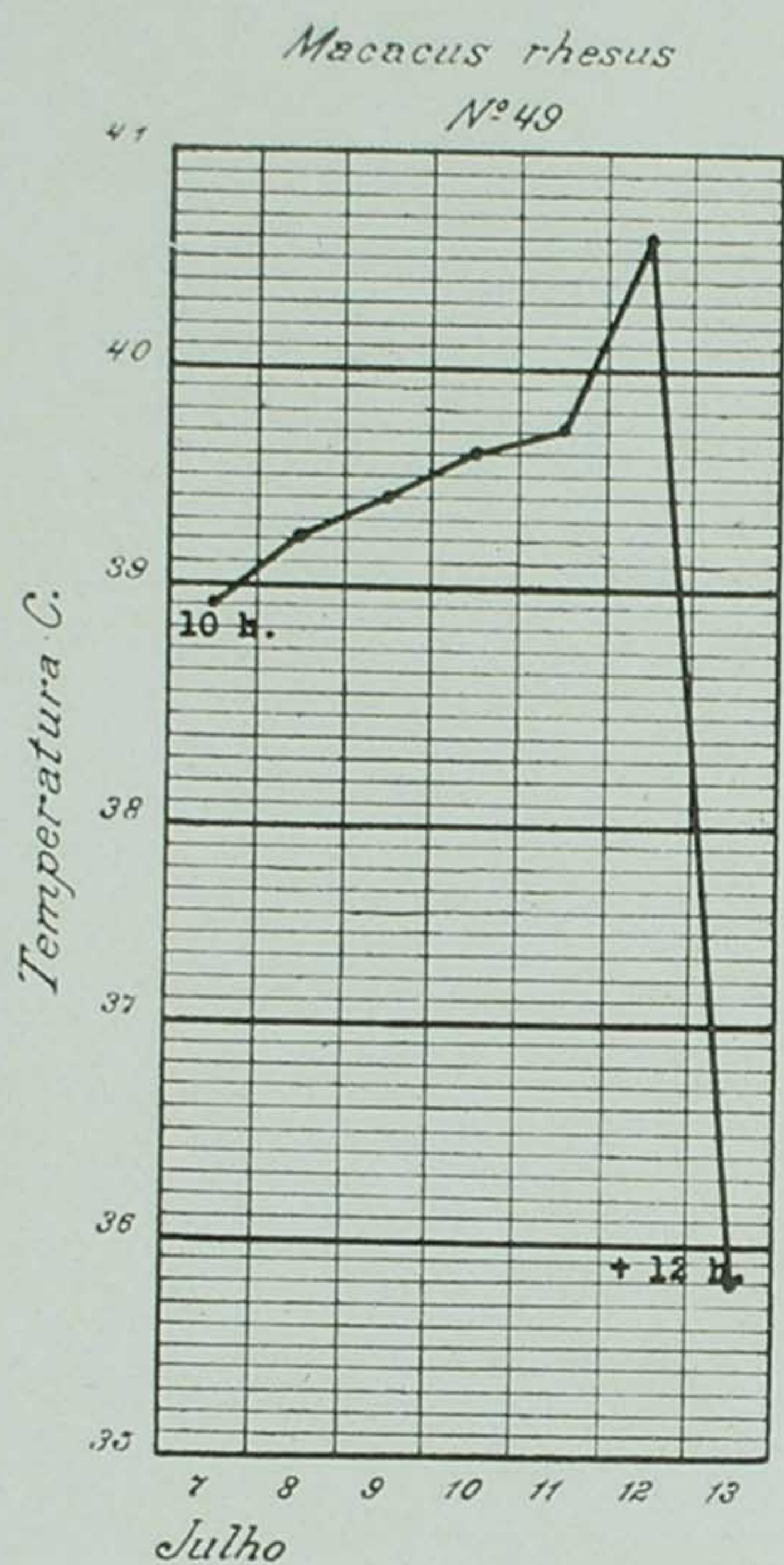


Fig. 7—Curva thermica do *rhesus* n. 49. Infectado com 2 c.c. de sangue citratado do *rhesus* n. 35.

Fig. 7—Thermic curve of the *rhesus* n. 49. Infected with 2 c.c. citrated blood of the *rhesus* n, 35.

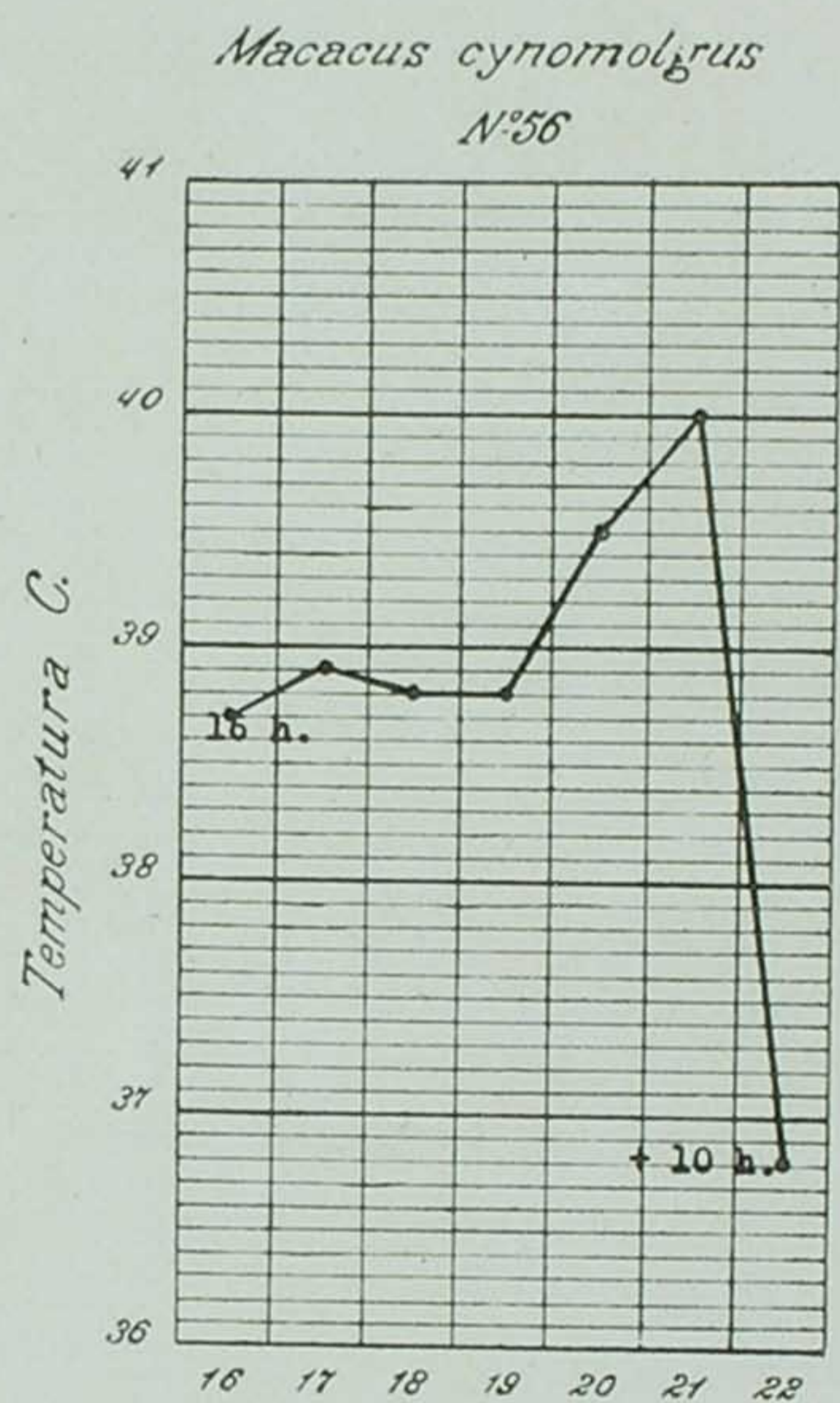


Fig. 8—Curva thermica do *cynomolgus* n. 56. Infectado com 1/2 c.c. de sôro do *rhesus* n. 49.

Fig. 8—Thermic curve of the *cynomolgus* n. 56. Infected with 1/2 c.c. of Serum from *rhesus* n. 49.

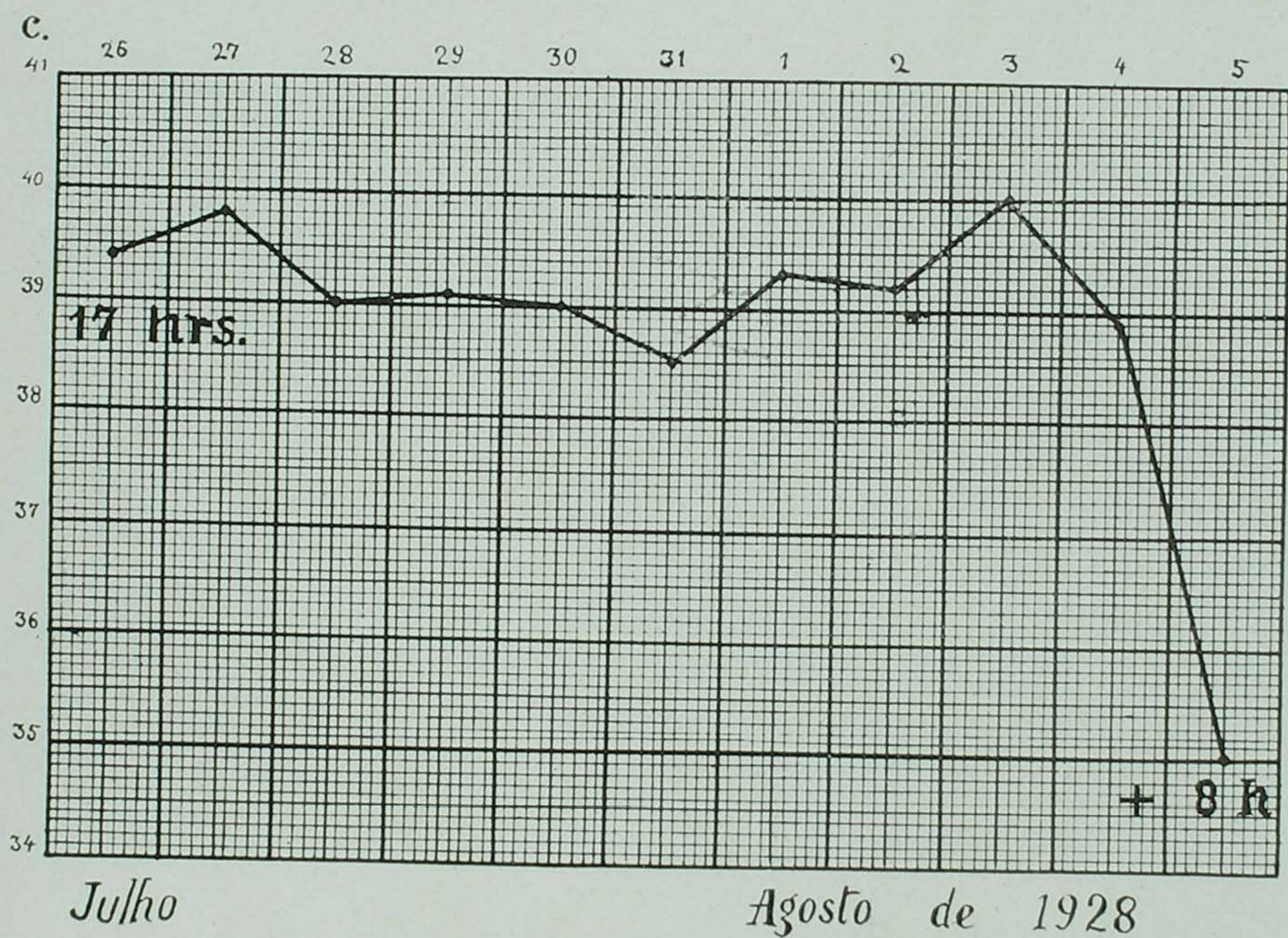


Fig. 9—Curva thermica do *rhesus* n. 76. Infectado com 0,2 c.c. de sôro do *cynomolgus* n. 56.

Fig. 9—Thermic curve of the *rhesus* n. 76. Infected with 0,2 c.c. of serum from the *cynomolgus* n. 56.