

Suscetibilidade de pintos ao virus amarílico neurotrópico (*)

por

Herminio Linhares

A possibilidade de infecção de pintos por virus amarílico, tem sido motivo de estudos feitos por nós, desde 1939.

As pesquisas iniciais foram feitas com o intuito de adaptar o virus neurotrópico Francês em cérebro de pinto e estudar sua capacidade de infecção, ou possível aumento de sua virulência, após determinado número de passagens, em um animal provavelmente suscetível.

Devemos considerar como animal suscetível, todo aquele em que houver possibilidade de multiplicação do virus, mesmo sem alteração aparente do estado geral do animal. Se pintos inoculados com pequenas doses de virus, demonstrarem ter havido acréscimo deste, podemos considerá-los como suscetíveis. Esta averiguação pode ser feita por pesquisa sistemática de virus no sangue, durante vários dias consecutivos à inoculação, por dosagem de virus no sangue ou em órgãos nos quais a capacidade de multiplicação é previamente conhecida para outros animais; em se tratando do virus neurotrópico, logicamente o órgão de preferência escolhido será o cérebro. Quanto à pesquisa sistemática de virus no sangue, devemos estabelecer, de antemão, que a presença do virus no dia imediato à inoculação não tem um significado especial como demonstração de um processo multiplicativo, podendo ser apenas resultante de uma eliminação. Para que haja certeza de que se trata de multiplicação, é necessário a presença de virus durante alguns dias no sangue, e, melhor ainda, um aumento gradativo deste, a partir dos primeiros dias post-inoculação.

O sangue seria, neste caso, um indicador preciso, dos processos íntimos passados nos recessos dos tecidos. Quando as barreiras naturais não tem poder suficiente para exterminar imediatamente o virus inoculado, haverá multiplicação deste nos tecidos, o que redundará na morte do animal ou numa posterior imunização.

Às vezes, e este é o caso de pintos, há multiplicação do virus no sistema nervoso, mas sem afetar o estado geral do animal que normalmente sobrevive e não demonstra mesmo qualquer sintoma que possa ser imputado como sinal de infecção.

* Recebido para publicação a 1 de março e dado à publicidade em abril de 1943.

Este problema de animais suscetíveis e não suscetíveis, tomou grande incremento após a descoberta da febre amarela silvestre, atingindo o acmé com a hipótese, de serem as aves depositários naturais de vírus e possíveis propagadoras de epidemias de febre amarela silvestre.

Nesse trabalho relatamos os resultados das passagens de vírus em série, de cérebro a cérebro de pinto através de 80 gerações, o desenvolvimento de anticorpos após a inoculação por diversas vias, a pesquisa do vírus no sangue e diversos órgãos, assim como ligeira noção de avitaminose experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostra de vírus.

A amostra de vírus usada para a passagem inicial em cérebro de pinto, foi do tipo neurotrópico Francês, obtida de cérebros de camundongos moribundos com encefalite amarílica. Em todas as experiências consecutivas, foram usadas suspensões de cérebros de pintos com vírus de passagens, mas em diferentes níveis.

2. Animais de experiência.

a) Pintos criados no laboratório, de idade variável, conforme a experiência.

b) Camundongos suíços, adultos ou de 21 dias, usados para pesquisas e dosagens de vírus no sangue ou em diversos órgãos.

3. Métodos de infecção dos pintos.

Experiência foram feitas inoculando pintos por via intracerebral, intraperitoneal e intradérmica, com dose variável, de acordo com a idade e a pesquisa.

4. Verificação da presença de vírus.

Para a pesquisa do vírus, quer no cérebro quer nos demais órgãos, sacrificamos os pintos com eter, fizemos suspensão a 10 % do material em solução fisiológica e inoculamos 0,03 cm³ por via intracérebro, em camundongos. Para a pesquisa de vírus circulante, inoculamos 0,03 cm³ de sangue, pela mesma via, imediatamente após a sangria. Sempre foram inoculados grupos de 6 camundongos.

5. Demonstração de imunidade.

Geralmente, 30 dias após a inoculação, os pintos foram sangrados no coração; separávamos, a seguir, o soro, para verificação da imunidade, por meio de prova de proteção em camundongos jovens (de 19 a 21 dias).

6. Secagem e dosagem.

De quando em vez, com o intuito de preservamos o material contra qualquer eventualidade de possível perda, costumamos fazer secagem preparando suspensão a 20 % de cérebros, em solução a 50 % de um soro normal humano ou de macaco e, secando no vácuo a baixa temperatura. O material seco é conservado em empolas fechadas e guardado na geladeira. As dosagens foram feitas diluindo o material de 1:10 até 1:100.000 e inoculando para cada diluição um grupo de 6 camundongos com 0,03 cm³ por via intracerebral. Os títulos foram calculados pelo método de Munch.

7. Métodos de observação e cuidado dos animais.

Em geral, os pintos foram guardados, durante todo o período da experiência, em gaiolas de tela com um compartimento de madeira aquecido por lâmpada.

Foram numerados com esparadrapo enrolado em uma das pernas, e diariamente observados.

PARTE EXPERIMENTAL

1.^a Parte

Início e continuação das passagens em série nos pintos.

A tentativa de estabelecer passagens em série, foi iniciada preparando uma suspensão a 10 %, em solução salina, de cérebros de camundongos moribundos, inoculados com virus neurotrópico Francês de 561.^a passagem.

A primeira passagem foi feita inoculando 0,06 cm³, intracerebral, em pintos de 5 dias. Estes pintos foram observados durante 30 dias, sendo que um deles foi sacrificado 3 dias após a inoculação, retirado o cérebro e feita suspensão a 10 % em solução fisiológica, sendo ao mesmo tempo inoculado um grupo de 6 camundongos por via intracerebral para controle do virus, e, também, pintos para a segunda passagem.

As passagens sucessivas, foram, normalmente, feitas com 3 dias de intervalo; foram feitas inoculações sistemáticas dos cérebros e do sangue dos pintos de cada passagem, nos camundongos, e, em geral, todos morreram de encefalite, entre o 5.^o e 10.^o dia.

Usamos para as passagens, pintos entre recém-nascidos e 5 dias de idade; tais pintos foram inoculados por via intracerebral, com 0,03 cm³ a 0,06 cm³ de acordo com a idade, o que correspondeu, em média, entre 500 a 1.000 D. M. M. para camundongos.

Fizemos 81 passagens e sempre foi evidenciada a presença de virus no cérebro do pinto, por inoculação em camundongos.

As diversas dosagens, feitas com material fresco ou seco, deram título variável entre 500 e 20.000 D. M. M.

Nenhuma alteração no comportamento do virus foi observada, quer em camondongo quer em macaco. Suspensão a 10 % de cérebro de pinto da 72.^a passagem, foi inoculada por via intracerebral, em Rhesus (0,6 cm³), o qual, 6 dias depois, morreu com encefalite.

Conclusão.

1. Parece-nos, depois de grande número de passagens, ser possível assegurar a conservação de virus, por tempo indefinido, em cérebro de pintos, quando as passagens são feitas com intervalos de 2 a 5 dias.
2. Após mais de 80 passagens, não notamos modificações no comportamento do virus em camondongo.
3. Não foram também verificadas modificações no comportamento do virus para Rhesus.

2.^a Parte

Inoculação do virus por via intracerebral.

1. Suscetibilidade.

A suscetibilidade dos pintos inoculados por via intracerebral é grande, aparentemente quase igual à dos camondongos. Grande número de pintos, inoculados com virus em alta diluição, demonstrou ter, não só adquirido imunidade, como também virus circulante nos primeiros dias post-inoculação. Assim a inoculação de 1,7 D. M. M. (para camondongo) deu virus circulante em 2 pintos e anticorpos protetores em um deles (Ver quadro II).

QUADRO N. I

RESULTADOS DAS PESQUISAS DE VIRUS CIRCULANTE EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRACEREBRAL

PINTOS INOC.		SUMÁRIO DA CIRCULAÇÃO DO VIRUS							
N.	Idade	N. de camondongos x	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	N. de pintos s/ virus circulante
8	0-1 dias	n. camon. inf. n. camon. inoc.	8/44	20/45	37/46	18/38	4/32	2/28	1
		% camon. inf.	18%	44.5%	80.5%	47.4%	12.5%	7%	
28	2 dias	n. camon. inf. n. camon. inoc.	61/115	111/155	126/161	118/156	71/145	13/80	1
		% camon. inf.	53%	71.6%	78%	75.6%	49%	16%	
17	5 dias	n. camon. inf. n. camon. inoc.	77/91	68/93	60/95	22/92	10/95	1/94	0
		% camon. inf.	84.6%	73%	63%	24%	10.5%	1.1%	

x Inoculação de grupos de 6 camondongos e por dia de sangria, para cada soro de pinto.

2. Virus circulante.

Em um grupo de 53 pintos, de idade variavel entre recém-nascidos e 5 dias, foi inoculado virus em dose variavel entre 100 e 1.000 D. M. M. Tais pintos foram, em geral, sangrados até o 6.^o dia post-inoculação, para pesquisa de virus circulante. Alta percentagem (96%) de pintos, demonstrou virus na circulação. Os resultados, se bem que não sejam absolutos, mostram variações na presença do virus em relação com a idade. Os pintos com 5 dias tem, possivelmente, menor período de circulação (Quadro n. I).

Uma segunda experiência de carater mais concludente foi feita para verificar a relação entre a quantidade de virus inoculado e a infecção resultante, evidenciada pelo virus circulante e a imunidade.

Um lote de 14 pintos, com 2 dias de idade, foi inoculado com 0,03 cm³ intracerebral de doses decrescentes de virus neurotrópico Francês, da 16.^a passagem em cérebro de pinto e cujo título, para camundongos, foi de 17.800 D. M. M.

Estes pintos foram sangrados nos 5 primeiros dias post-inoculação e o sangue injetado imediatamente depois no cérebro de camundongos, para pesquisa de virus circulante. Decorridos 30 dias, os pintos sobreviventes foram novamente sangrados, e com os soros foram feitos testes imunológicos.

Os resultados obtidos demonstraram que, se por um lado, em baixa diluição, o virus no sangue pode ser apenas resultante de eliminação, por outro lado, virus circulante em animal inoculado com alta diluição, deve ser devido à multiplicação.

Assim, por exemplo, um pinto que recebera menos de 2 D. M. M. apresentou virus circulante nos 5 dias em que foi sangrado. Verificamos, outrossim, que foi possível imunizar pintos com pequena quantidade de virus, inoculado por via intracerebral, certamente porque houve multiplicação. Os resultados desta experiência estão resumidos no quadro II.

3. Distribuição do virus.

a) Tempo de persistência do virus no cérebro:

Com o intuito de verificarmos por quanto tempo seria possível isolar virus do cérebro dos pintos que receberam virus por esta via, inoculamos um lote de pintos e retiramos os cérebros do 7.^o ao 16.^o dia post-inoculação. Fizemos suspensão a 10 % em solução fisiológica e inoculamos para cada cérebro, um grupo de 6 camundongos por via intracerebral. Conseguimos isolar virus até o 15.^o dia post-inoculação. É possível que o virus possa, em alguns casos, persistir por mais uns dias. (Esta experiência é narrada com mais detalhes no capítulo : Desenvolvimento da imunidade). (Ver o quadro n. IV).

QUADRO N. II

RESULTADOS DA INOCULAÇÃO DE VIRUS POR VIA I. C. EM DOSES DECRESCENTES, EM PINTOS DE 2 DIAS DE IDADE

N. DA SÉRIE	D. M. M. INOC.	RESULTADOS					PROVA DE PROTEÇÃO
		VIRUS CIRCULANTE NO:					
		1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	
665.....	17.800	6/6	4/4	6/6	6/6	2/6	Posit. 6/6
666.....	17.800	5/5	6/6	6/6	5/5	4/6	—
667.....	1.780	3/6	6/6	6/6	6/6	6/6	Posit. 6/6
668.....	1.780	0/6	5/6	2/6	2/6	0/6	—
669.....	178	0/6	1/6	6/6	6/6	1/6	Posit. 6/6
670.....	178	1/6	6/6	6/6	6/6	4/6	Posit. 6/6
671.....	17,8	2/6	4/6	0/6	5/6	6/6	—
672.....	17,8	0/6	5/5	6/6	6/6	2/6	Posit. 6/6
673.....	1,7	1/6	5/6	6/6	6/6	6/6	Posit. 6/6
674.....	1,7	0/5	4/5	0/6	1/6	0/6	Negat. 0/6
675.....	> 1	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	—
676.....	> 1	0/6	0/6	0/4	0/6	0/6	Negat. 0/6
677.....	—	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	—
678.....	--	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	Negat. 1/6

b) Pesquisa de virus em diversos órgãos.

Tentamos, nesta experiência, isolar o virus de diversos órgãos, verificando assim sua difusão pelo organismo. Para tal fim, inoculamos um lote de 22 pintos, de idade variavel entre recém-nascidos e 2 dias, com 0,03 cm³ intracerebral, de suspensão a 10 % de virus neurotrópico da 58.^a e 60.^a passagem em cérebro de pintos, e que correspondeu a \pm 200 D. M. M. Foi feita sangria diária, a partir do dia imediato à inoculação, para pesquisa de virus circulante. Sacrificamos, em geral, 2 pintos por dia e retiramos cérebro, pulmão, fígado, baço e rim. Tais órgãos foram triturados em geral, suspensos em solução fisiológica e inoculados em grupos de camundongos.

Resultados :

Foi isolado virus nos diversos órgãos pesquisados, nos primeiros dias post-inoculação; entretanto, apenas uma vez foi evidenciado ao mesmo tempo em que todos os órgãos, sendo, em geral, encontrado apenas em um ou dois. Pequena quantidade de virus foi evidenciada em alguns dos órgãos de dois pintos, sem, no entanto, ter sido encontrado neste dia no sangue. A partir do 6.^o dia, o virus foi evidenciado apenas no cérebro. Provavelmente, o virus isolado dos órgãos é proveniente do sangue que neles circula. O cérebro, é, possivelmente, o único local verdadeiro da infecção. O quadro n. III resume estes resultados.

QUADRO N. III
RESULTADOS DAS EXPERIENCIAS EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRACEREBRAL COM ± 200 D. M. M.

NÚMERO DA SÉRIE	PESQUISA DE VIRUS CIRCULANTE NOS DIAS										DISTRIBUIÇÃO DE VIRUS				
	1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º	9.º	10.º	Cérebro	Pulmão	Fígado	Baço	Rim
P. 1654.....	2/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4/6	0/6	1/6	0/6	0/6
P. 1727.....	0/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3/6	0/6	0/6	0/6	1/6
P. 1601.....	—	4/5	—	—	—	—	—	—	—	—	6/6	0/6	0/5	0/5	2/6
P. 1602.....	—	3/6	—	—	—	—	—	—	—	—	6/6	0/4	0/5	0/6	2/6
P. 1726.....	0/6	2/4	—	—	—	—	—	—	—	—	4/6	0/6	2/6	0/6	1/5
P. 1605.....	—	4/6	5/6	—	—	—	—	—	—	—	4/4	2/6	0/6	1/5	0/4
P. 1728.....	0/6	2/6	6/6	—	—	—	—	—	—	—	6/6	3/6	0/6	2/6	1/6
P. 1606.....	—	4/4	6/6	3/6	—	—	—	—	—	—	6/6	0/5	5/6	1/6	0/6
P. 1729.....	3/6	5/6	6/6	6/6	—	—	—	—	—	—	6/6	6/6	5/6	6/6	4/6
P. 1607.....	—	2/5	3/6	1/6	0/6	—	—	—	—	—	4/4	0/6	0/6	0/5	0/6
P. 1612.....	—	2/6	2/4	2/6	3/6	—	—	—	—	—	5/6	0/6	0/5	0/5	0/5
P. 1730.....	0/5	3/6	5/5	2/5	0/5	—	—	—	—	—	6/6	0/6	0/6	0/5	0/6
P. 1608.....	—	1/6	6/6	5/6	1/5	0/6	—	—	—	—	5/5	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1731.....	0/5	3/4	5/6	2/5	0/4	0/6	—	—	—	—	5/5	1/6	0/6	1/5	0/5
P. 1609.....	—	0/6	0/6	0/6	0/5	0/4	0/6	—	—	—	6/6	0/6	0/6	0/5	0/6
P. 1732.....	3/6	2/6	5/6	2/6	2/5	2/6	0/6	—	—	—	5/5	0/6	0/3	0/6	0/6
P. 1610.....	—	2/4	2/6	3/6	4/4	2/5	0/6	0/5	—	—	4/4	0/5	0/4	0/4	0/5
P. 1733.....	2/4	3/5	4/5	2/6	0/6	0/5	0/6	0/6	—	—	6/6	0/5	0/6	0/6	0/6
P. 1611.....	2/5	2/5	4/5	5/5	3/6	3/6	0/6	0/5	0/6	—	4/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1734.....	0/6	0/6	0/6	0/4	0/6	1/5	0/6	0/6	0/5	—	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1613.....	—	2/6	4/6	3/5	2/6	1/6	0/6	0/4	0/6	0/6	6/6	0/4	0/6	0/6	0/6
P. 1735.....	0/6	2/6	6/6	6/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	0/6	0/6	0/6	0/4

H. Linhares : Suscetibilidades de pintos

4. Desenvolvimento da imunidade.

a) Resultado das provas de proteção post-inoculação.

Cerca de 50 pintos, entre recém-nascidos e 5 dias de idade, foram inoculados por via intracerebral com 0,03 cm³ de suspensão a 10 % de vírus neurotrópico de diversas passagens em pintos, correspondente a \pm 500 D. M. M. Decorridos 30 dias, todos os animais foram sangrados e os soros postos em prova de proteção com camundongos jovens. Os resultados obtidos foram todos positivos.

Parece-nos uma questão resolvida, que pintos inoculados por via intracerebral, com vírus de passagens em cérebros de pintos, adquirem anticorpos protetores na imensa maioria dos casos.

Na experiência em que inoculamos doses decrescentes de vírus (Ver quadro n. II) observamos que, apenas com uma exceção, os pintos que mostraram vírus circulante tornaram-se imunes, o que demonstra ser a imunidade um bom indicador de que a infecção se processou. Entretanto, sua ausência não exclue a hipótese de ter havido uma infecção mínima anterior.

b) Tempo médio necessário para o aparecimento de anticorpos no sangue.

Nosso intuito nesta observação, é verificar quando começa o aparecimento de anticorpos no sangue, em quantidade suficiente para dar prova de proteção positiva, e, ao mesmo tempo, se é possível obter vírus no cérebro e anticorpos protetores no soro. Para tal fim, inoculamos um lote de 24 pintos, de 1 a 3 dias de idade, com 0,03 cm³ de suspensão a 10 % de vírus de passagem, correspondendo a \pm 500 D. M. M. A colheita do sangue foi iniciada a partir do 7.^o dia; os cérebros dos animais sangrados foram retirados e, após ser feita a suspensão a 10 % em solução fisiológica, foram inoculados em camundongos (Quadro n. IV).

Dos resultados obtidos tiramos as seguintes conclusões :

O tempo médio necessário para aparecimento de anticorpos protetores evidenciáveis por prova de proteção, varia em torno do 10.^o dia post-inoculação.

E' possível obter-se anticorpos protetores no soro, ao mesmo tempo em que o vírus é encontrado no cérebro.

c) Influência da idade no processo de imunização :

Após havermos verificado que pintos até 5 dias de idade apresentam anticorpos protetores em elevada percentagem, restava saber se, com a idade, esta capacidade de produção seria diminuída ou mesmo abolida.

Inoculamos um lote de 14 pintos com 35, 28, 25, 20 e 15 dias de idade, por via intracerebral, com dose média de \pm 1.500 D. M. M. (Quadro n. V).

QUADRO N. IV

RESULTADOS DAS PESQUISAS DO TEMPO MÉDIO NECESSÁRIO PARA O APARECIMENTO DE ANTI-CORPOS, APÓS INOCULAÇÃO I. C. DE VIRUS

NÚMERO DA SÉRIE	DIAS POST-INOCULAÇÃO	INOCULAÇÃO DO CÉREBRO	PROVA DE PROTEÇÃO
P. 1008.....	7º dia	6/6	3/6
P. 1009.....	7º dia	5/5	0/6
P. 1010.....	8º dia	6/6	0/6
P. 1011.....	8º dia	6/6	2/6
P. 2255.....	9º dia	—	1/6
P. 2256.....	9º dia	—	0/6
P. 2257.....	9º dia	—	2/6
P. 2258.....	9º dia	—	1/6
P. 1012.....	9º dia	6/6	0/6
P. 1013.....	9º dia	6/6	0/6
P. 1014.....	10º dia	6/6	5/6
P. 1015.....	10º dia	4/4	5/6
P. 931.....	10º dia	—	2/6
P. 1016.....	11º dia	5/6	1/6
P. 1017.....	11º dia	4/4	5/5
P. 1018.....	12º dia	2/5	6/6
P. 1019.....	12º dia	3/5	2/6
P. 1020.....	13º dia	3/5	2/6
P. 1021.....	13º dia	1/5	6/6
P. 1022.....	14º dia	0/6	6/6
P. 1024.....	15º dia	4/6	4/6
P. 1025.....	15º dia	1/6	2/6
P. 1026.....	16º dia	0/5	5/6
P. 1055.....	17º dia	—	6/6

Sangrados 30 dias depois e os soros postos em prova de proteção, todos deram resultados positivos, com apenas uma exceção. Provalmente é possível obtermos prova de proteção positiva, mesmo nos animais adultos, quando inoculados por via intracerebral.

QUADRO N. V

RESULTADOS DAS PROVAS DE PROTEÇÃO EM PINTOS DE IDADE VARIÁVEL ENTRE 15 E 35 DIAS

NÚMERO DA SÉRIE	IDADE EM DIAS	D. M. M. INOCULADA	PROVA DE PROTEÇÃO
1201.....	35 dias	± 2.000	Negat. 0/6
1202.....	35 dias	± 2.000	Posit. 6/6
1203.....	35 dias	± 1.500	Posit. 6/6
1204.....	28 dias	± 1.500	Posit. 6/6
1205.....	28 dias	± 1.500	Posit. 6/6
1206.....	28 dias	± 1.500	Posit. 6/6
1207.....	28 dias	± 1.500	Posit. 6/6
2169.....	25 dias	± 1.500	Posit. 6/6
2170.....	25 dias	± 1.500	Posit. 6/6
2176.....	20 dias	± 1.000	Posit. 6/6
2177.....	20 dias	± 1.000	Posit. 6/6
2179.....	20 dias.....	± 1.000	Posit. 6/6
2552.....	15 dias	± 1.000	Posit. 6/6
2566.....	15 dias	± 1.000	Posit. 5/6

SUMMARY OF INTRACEREBRAL INOCULATION

1. Chicks have great susceptibility, apparently nearly equal to that of mice. 1.7 mouse doses caused circulating virus in both chicks; antibodies in one (Table II).
2. Circulating virus :
With anything more than minimal doses apparently significant concentration of virus circulate at some time during first six days in most (96 %) of chicks of 0-5 days (Table I); questionably signi-

ficant variations in circulating virus with respect to age in first five days; five days chicks have possibly shorter period of circulation. With the smaller doses the peak appearance may be delayed to 2nd or 3rd day (Table II).

3. Virus distribution :

- a) Virus persists in brain up to days post-inoculation (Table IV).
- b) During first six days virus occasionally found in lung, liver, spleen, kidney; the extent of such virus being more or less correlated with presence of significant circulating virus. After 6th day no virus in circulating blood, and none in tissues other than brain (Table III).
- c) This makes it clear that brain is primary, and probably only true site of infection.

4. Development of immunity:

- a) With \pm 500 M. L. D. i.c., 100 per cent of 50 chicks have positive (6/6) protection tests after 30 days.
- b) In single titration experiment (Table II), with one exception, chicks showing circulating virus became immune. Therefore, immunity is a good index that infection has been established. Absence, however, may not exclude prior minimal infection.
- c) Detectable immune bodies appear by 10 th day, at a time when many of the same chicks still have virus in brain (Table IV).
- d) Even up to 35 days of age, chicks inoculated intracerebrally become immune (Table V).

3.^a Parte

Inoculação intraperitoneal.

1. Suscetibilidade.

Para verificarmos a suscetibilidade de pintos que receberam virus por via intraperitoneal, fizemos uma experiência inoculando doses decrescentes de virus e tomando para indicador da sensibilidade os resultados obtidos em provas de proteção com os soros colhidos 30 dias depois da inoculação. Procuramos ainda verificar, na mesma experiência, se a inoculação intracerebral de goma de amido poderia ter alguma influência nos posteriores resultados imunológicos, servindo para aumentar a percentagem dos resultados positivos.

Para esta experiência separamos 2 lotes de pintos com um dia de idade, e, num deles, inoculamos no cerebro 0,03 cm³ de goma de amido a 2 %; em seguida, todos receberam suspensão de virus em doses decrescentes, por

via intraperitoneal. Os resultados (Quadro n. VI) foram mais ou menos idênticos e parece-nos que por esta via há influências individuais maiores que por via i.c., facilitando ou dificultando a produção de anticorpos. Assim, se, por um lado, o pinto 956, que recebeu 1.000 D. M. M. não demonstrou ter adquirido anticorpos, por outro lado o pinto 990, que recebera apenas 2 D. M. M., teve um soro fortemente positivo.

Por esta experiência verificamos a irregularidade nas respostas de pintos muito novos a doses decrescentes de virus, e, ainda mais, a demonstração de que tais animais são menos suscetíveis quando inoculados por via i. p. que por via i. c. Outrossim, verificamos que o traumatismo cerebral produzido pela inoculação de goma no cérebro, não aumentou a suscetibilidade.

Esta suscetibilidade irregular é também vista nos estudos que se seguem sobre virus circulante e imunidade; estes estudos ainda mostram a nítida redução na suscetibilidade com o aumento da idade dos animais.

QUADRO N. VI

RESULTADOS DA INOCULAÇÃO INTRAPERITONEAL DE DOSES DECRESCENTES DE VIRUS EM PINTOS DE UM DIA, COM OU SEM TRAUMATISMO CEREBRAL.

GOMA INTRACEREBRAL			SEM GOMA		
N. DA SÉRIE	D. M. M. INOCULADA	PROVA DE PROTEÇÃO	N. DA SÉRIE	D. M. M. INOCULADA	PROVA DE PROTEÇÃO
p. 778.....	1.500	5/6	p. 782.....	1.500	6/6
p. 956.....	1.000	1/6	p. 962.....	1.000	6/6
p. 986.....	200	6/6	p. 963.....	1.000	6/6
p. 958.....	100	6/6	p. 999.....	200	6/6
p. 959.....	100	6/6	p. 964.....	100	6/6
p. 987.....	20	0/6	p. 995.....	20	6/6
p. 988.....	20	0/6	p. 996.....	20	6/6
p. 960.....	10	6/6	p. 955.....	10	0/6
p. 961.....	10	0/6	—	—	—
p. 989.....	2	0/6	p. 997.....	2	0/6
p. 990.....	2	6/6	p. 998.....	2	0/6
p. 991.....	1	0/6	p. 994.....	1	0/6
p. 992.....	1	0/6	p. 1000.....	1	0/6

2. Virus circulante.

Para pesquisa de virus circulante inoculamos um lote de 39 pintos, sendo 30 com idade máxima de 2 dias e nove de 9 dias, os quais receberam

500 a 1.500 D. M. M. Tais pintos foram sangrados no coração, geralmente, durante os 6 primeiros dias post-inoculação e o sangue imediatamente inoculado no cérebro de um grupo de 6 camondongos.

Pudemos observar os seguintes resultados (Quadro n. VII) :

- a) Pintos inoculados por via i.p. com idade variavel entre recém-nascidos e 2 dias, mostram nivel de virus circulante, durante os 6 primeiros dias post-inoculação, aproximadamente igual ao dos pintos que receberam virus por via i.c. O virus foi evidenciado em 93% dos 30 pintos inoculados.
- b) Com os pintos de 9 dias os resultados foram muito inferiores; apenas 4 pintos, dentre os 9, mostraram virus circulante, porem em nível tão baixo que não deu a impressão de ter havido multiplicação do virus.

QUADRO VII

RESULTADOS DAS PESQUISAS DE VIRUS CIRCULANTE EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRA-PERITONEAL

PINTOS INOC.		SUMÁRIO DA CIRCULAÇÃO DO VIRUS							
N.	Idade	N. de camondongos	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	N. de pintos s/virus circulante
17	0-1 dias	n. camon. inf. n. camon. inoc.	21/96	39/92	60/96	61/91	27/77	4/71	1
		% camon. inf.	22%	42%	62,5%	67%	35%	5,6%	
13	2 dias	n. camon. inf. n. camon. inoc.	19/72	26/73	43/71	54/73	21/75	6/70	1
		% camon. inf.	26%	35,6%	60,5%	74%	28%	8,5%	
9	9 dias	n. camon. inf. n. camon. inoc.	6/50	1/54	2/54	5/47	0/41	0/41	5
		% camon. inf.	12%	2%	4%	10,6%	0%	0%	

3. Distribuição de virus.

Em um lote de 22 pintos recém-nascidos, inoculamos 0,02 cm³ i. p. de suspensão a 10 % de virus neurotrópico de 55.^a e 61.^a passagens em cérebro de pintos, correspondendo a \pm 1.500 D. M. M. Todos os pintos foram sangrados diariamente, e sacrificamos, em geral, 2 por dia, do 1.^o ao 10.^o dia, para pesquisarmos virus no cérebro, pulmão, fígado, baço e rim.

Foram obtidos os seguintes resultados (Quadro n. VIII) :

- a) Durante os primeiros 4 dias, o virus foi irregularmente encontrado no pulmão, fígado, baço e rim, em proporção mais ou menos equivalente ao virus circulante. Neste período não foi evidenciado o virus no cérebro,

QUADRO VIII

RESULTADOS DAS EXPERIÊNCIAS EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRAPERITONEAL COM ± 1.500 D. M. M.

NÚMERO DA SÉRIE	PESQUISA DE VIRUS CIRCULANTE NOS DIAS										DISTRIBUIÇÃO D& VIRUS				
	1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º	9.º	10.º	Cérebro	Pulmão	Fígado	Baço	Rim
P. 1415.....	2/5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0/5	1/5	—	0/6	—
P. 1805.....	2/4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0/6	0/6	0/5	2/6	2/6
P. 1426.....	0/6	2/6	—	—	—	—	—	—	—	—	1/6	1/5	2/5	1/6	0/6
P. 1806.....	3/6	4/6	—	—	—	—	—	—	—	—	0/6	2/6	4/6	1/6	2/6
P. 1424.....	1/6	1/6	3/6	—	—	—	—	—	—	—	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5
P. 1807.....	2/6	3/5	5/6	—	—	—	—	—	—	—	0/3	0/6	5/6	0/6	2/5
P. 1416.....	3/6	5/6	5/6	3/4	—	—	—	—	—	—	0/6	1/6	6/6	6/6	2/6
P. 1808.....	0/5	1/6	1/5	0/6	—	—	—	—	—	—	0/5	1/4	2/6	0/6	0/6
P. 1417.....	2/6	4/5	5/5	5/5	1/6	—	—	—	—	—	6/6	1/6	1/6	3/6	6/6
P. 1809.....	2/4	3/6	3/6	6/6	0/5	—	—	—	—	—	4/6	0/6	3/4	3/6	1/6
P. 1418.....	0/6	1/6	2/6	1/5	3/6	1/6	—	—	—	—	0/6	2/5	0/6	1/5	0/3
P. 1419.....	5/6	3/5	5/6	4/5	4/6	1/6	—	—	—	—	6/6	3/6	0/5	0/6	0/6
P. 1813.....	3/6	3/6	5/5	6/6	3/6	0/6	—	—	—	—	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1420.....	0/6	3/6	6/6	5/6	1/5	0/6	0/5	—	—	—	6/6	0/6	2/4	2/6	0/5
P. 1810.....	3/6	2/6	5/6	6/6	1/5	0/6	0/5	—	—	—	6/6	0/6	0/6	0/6	0/5
P. 1422.....	0/6	5/6	2/6	2/6	4/5	2/5	1/5	0/5	—	—	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1421.....	0/5	1/5	5/5	5/5	1/6	0/5	1/6	0/5	—	—	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1811.....	1/5	2/4	4/6	6/6	5/5	0/6	0/6	0/6	—	—	5/6	0/6	0/5	0/6	0/6
P. 1423.....	0/6	1/4	3/6	4/6	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	—	6/6	0/6	0/6	0/6	0/5
P. 1425.....	0/6	0/6	1/4	2/5	1/5	0/6	0/6	0/6	0/5	—	4/6	0/6	0/5	0/6	0/5
P. 1412*.....	0/6	0/5	0/5	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	0/5	—	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
P. 1814.....	0/4	2/5	3/6	6/6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	5/6	0/6	0/6	0/6	0/6

(*) Provavelmente não houve infecção.

- b) Do 5.^o ao 10.^o dia, apenas com duas exceções, todos os pintos mostraram virus no cérebro. Dos 2 supracitados, um não mostrou virus circulante, e o outro sempre apresentou pequena quantidade de virus circulante.
- c) Depois do 7.^o dia, os pintos não evidenciaram virus em outro órgão a não ser o cérebro, assim como não mais isolamos virus do sangue.
- d) Tais resultados parecem indicar que depois da inoculação i.p., há uma multiplicação inicial do virus em local indeterminado, resultando na circulação do virus, e que a infecção cerebral é proveniente deste virus na circulação; tal fato é constatado na grande maioria de pintos de 0-2 dias de idade, o que prova serem também bastante suscetíveis por esta via.

4. Desenvolvimento da imunidade.

- a) Em um lote de 26 pintos, com idade variavel entre recém-nascidos e 2 dias, inoculamos 0,2 cm³ de suspensão de cérebros de pintos com virus de diversas passagens, os quais receberam de 100 a 3.000 D. M. M.

Decorrido um mês, todos os animais foram sangrados e os soros postos em prova de proteção. Obtivemos 23 resultados positivos e 3 negativos; donde podemos concluir que, pintos nos primeiros dias de nascidos, inoculados com o mínimo de 100 D. M. M., podem adquirir anticorpos protetores em percentagem elevada.

- b) Tempo médio para evidenciação de anticorpos no sangue.

Desejamos observar, nesta experiência, no fim de quantos dias os soros de pintos inoculados por via i.p., apresentam anticorpos em concentração suficiente para neutralizar o virus nas provas de proteção.

Inoculamos 2 lotes de pintos : o primeiro, de 19 pintos, com 1 a 2 dias de idade, recebeu suspensão a 10 % de cérebro da 76.^a passagem, correspondendo a ± 500 D. M. M.; neste lote, sacrificamos os pintos logo após a sangria, retiramos os cérebros e inoculamos em grupos de camundongos, para verificarmos a possibilidade de obtermos virus no cérebro e prova de proteção positiva; por outro lado, inoculamos o sangue recém-colhido de tais pintos no cérebro de camundongos, para pesquisa de virus.

O segundo lote, de 15 pintos, com 6 dias de idade, recebeu suspensão a 10 % de cérebro de pinto da 34.^a passagem, correspondendo a ± 2.000 D. M. M.

No 1.^o grupo iniciamos a sangria no 7.^o dia e no 2.^o grupo a partir do 9.^o dia.

Os resultados (Quadro n. IX) foram irregulares, provavelmente porque a imunização, após inoculação de vírus por via i.p., é mais influenciada por fatores individuais que quando pintos recebem vírus no cérebro. Contudo, 8 dias após inoculação, obtivemos resultado positivo para os pintos mais jovens, e no 10.º dia para os mais velhos.

Se bem que os resultados tenham sido irregulares para as duas séries, são mais regulares para os pintos novos. Assim, apenas 6 soros, dentre os 19, dos pintos de 1 a 2 dias de idade, deram resultados negativos depois de 7.º dia, (e 2 resultados fracamente positivos: 2/6),

QUADRO N. IX

RESULTADOS DAS PESQUISAS DO TEMPO MÉDIO NECESSÁRIO PARA O APARECIMENTO DE ANTICORPOS, APÓS INOCULAÇÃO I. P. DE VIRUS

PINTOS DE 1-2 DIAS INOC. COM \pm 500 D. M. M.					PINTOS DE 6 DIAS INOC. COM \pm 2.000 D. M. M.		
N.º DA SÉRIE	EXAME NO	RESULTADOS			N.º DE SÉRIE	EXAME NO	PROVA DE PROTEÇÃO
		Pesquisa de vírus		PROVA DE PROTEÇÃO			
		Sangue	Cérebro				
p. 2525.....	7º dia	0/6	0/6	2/6	—	—	—
p. 2526.....	8º dia	0/6	0/6	0/6	—	—	—
p. 2527.....	8º dia	0/6	1/6	6/6	—	—	—
p. 2528.....	9º dia	0/6	2/6	4/6	p. 2136.....	9º dia	0/6
p. 2530.....	9º dia	0/6	0/5	2/6	p. 1037.....	9º dia	1/6
p. 2531.....	10º dia	0/6	2/6	5/6	p. 1038.....	10º dia	5/6
p. 2532.....	10º dia	0/6	4/6	6/6	p. 1039.....	10º dia	5/6
p. 2533.....	11º dia	0/6	0/6	2/6	p. 1040.....	11º dia	0/6
p. 2534.....	11º dia	0/6	0/6	0/6	p. 1041.....	11º dia	5/6
p. 2535.....	12º dia	—	0/6	6/6	p. 1042.....	12º dia	1/6
p. 2536.....	12º dia	—	0/6	6/6	p. 1043.....	12º dia	0/6
p. 2537.....	13º dia	—	0/6	5/6	p. 1045.....	13º dia	0/6
p. 2538.....	13º dia	—	0/6	0/6	p. 1046.....	13º dia	6/6
p. 2539.....	14º dia	—	0/6	0/6	p. 1047.....	14º dia	1/6
p. 2540.....	14º dia	—	0/6	0/6	p. 1048.....	14º dia	0/6
p. 2541.....	15º dia	—	0/6	6/6	p. 1051.....	15º dia	6/6
p. 2542.....	15º dia	—	0/6	5/6	—	—	—
p. 2543.....	16º dia	—	0/5	0/6	p. 1052.....	16º dia	5/6
p. 2544.....	16º dia	—	0/5	6/6	p. 1053.....	16º dia	0/6

ao passo que, em 15 soros de pintos com 6 dias, 9 foram negativos a partir do 9.º dia.

Podemos considerar o tempo médio para o aparecimento de anticorpos, o mesmo que para via intracerebral, isto é, o 10.º dia. Também foi possível isolar vírus do cérebro de alguns pintos com anticorpos no soro.

c) Influência da idade.

Para estudarmos a influência da idade no processo de imunização, inoculamos um lote de 14 pintos de 8 a 25 dias de idade, com 1.000 a 3.000 D. M. M. Todos foram sangrados 30 dias após à inoculação e os soros postos em prova de proteção (Quadro n. X).

Obtivemos apenas um resultado positivo a partir do 15.º dia. Pintos com 8, 9 e 10 dias mostraram resultados irregulares. É provável que, além da idade, que asseguraria melhores defesas nas barreiras do sistema nervoso central, outros fatores individuais venham influir

QUADRO N. X

RESULTADOS DAS PROVAS DE PROTEÇÃO EM PINTOS DE 8 A 25 DIAS DE IDADE

NUMERO DA SÉRIE	IDADE EM DIAS	D. M. M. INOCULADA	PROVA DE PROTEÇÃO
2172.....	25 dias	± 3.000	0/6
2174.....	25 dias	± 3.000	0/6
2180.....	20 dias	± 3.000	0/6
2182.....	20 dias	± 3.000	0/6
511.....	15 dias	± 1.000	0/6
512.....	15 dias	± 1.000	0/4
513.....	15 dias	± 1.000	0/6
515.....	15 dias	± 1.000	0/6
520.....	15 dias	± 1.000	4/6
858.....	10 dias	± 1.500	5/6
853.....	9 dias	± 1.500	4/6
1218.....	9 dias	± 1.500	1/6
1219.....	9 dias	± 1.500	6/6
851.....	8 dias	± 1.500	0/6

nos resultados, como, por exemplo, uma absorção lenta e maior capacidade do sangue e do sistema retículo-endotelial, em geral, em destruir o vírus.

SUMMARY OF INTRAPERITONEAL INOCULATION

1. Susceptibility — Single titration experiment in newly hatched chicks (Table VI), using subsequent immunity as index, shows irregular response to graded virus doses, and indicates that chick is less susceptible by this route than by intracerebral. Same experiment fails to suggest that cerebral injury, by intracerebral starch inoculation, increases intraperitoneal susceptibility. This irregular susceptibility also shown in following circulating virus and immunity studies. These studies also show marked reduction in susceptibility with age.
2. Circulating virus.
 - a) Chicks of 0-2 days inoculated with 500-1.500 M.L.D., of virus intraperitoneally show levels of circulating virus during the first six days nearly equal to those of chicks inoculated intracerebrally (Table VII). Virus observed in 93 per cent of 30 such chicks.
 - b) 9-day old chicks, however, are very inferior. Only 4 out of 9 showed any virus, and in level appreciably lower.
3. Virus distribution.
 - a) During first 4 days virus irregularly found in lung, liver, spleen, and kidney and in extent more or less related to amount of circulating virus. In this period brain fails to show virus.
 - b) From 5th to 10th day, of the 14 chicks tested, all but two showed significant virus in brain. Of these two, one had shown no circulating virus, and other never showed more than 3/6 virus in blood.
 - c) After 7th day no chick showed virus in other organs than brain, and no circulating virus was noted.
 - d) These results suggest after intraperitoneal inoculation, an initial multiplication of virus occurs in an undetermined site, resulting in circulating virus, and that cerebral infection occurs because of this circulating virus in almost all of 0-2 day old chicks. This means that young chicks, then, are quite susceptible to intraperitoneal virus.
4. Immunity.
 - a) With 100-3.000 M.L.D., i.p., 88 per cent of chicks (of 0-2 days old) shown positive protection test after 30 days.

- b) In a study of 1-2 day, and 6 day chicks (Table IX) tested at intervals of from 7 to 16 days, it was able to show clear cut antibodies as early as 8 days in the younger chicks, and by the 10th days in the older chicks. However, the results amongst chicks tested at subsequent intervals, although irregular in both series, are much more regular in the younger chicks. Only 6 in 19 of the 1-2 day chicks failed to show significant immunity after the 7th day, while 9 in 15 of the 6-day chicks failed after the 9th day.

Virus was found in the brain of some chicks exhibiting antibodies in the serum.

- c) In a serie of older chicks from 8 to 25 days, no chicks became immune older than 15 days after 1.000 to 3.000 M.L.D., and only 1 out of 5 of the 15-day chicks, 8, 9, und 10-day chicks show irregular results.

4.^a Parte

Inoculação intradérmica.

No capítulo anterior verificamos que pintos inoculados por via extra-neural, no caso foi a via i. p., podem apresentar virus circulante e demonstrar o desenvolvimento de imunidade.

Queremos verificar nesta experiência, se pintos inoculados com virus por via intradérmica, adquirem imunidade, e, o que é mais importante, se há circulação e multiplicação do virus. A presença de virus no sangue nem sempre tem importância para provar sua multiplicação. Quando o virus é evidenciado na circulação apenas no 1.^o dia post-inoculação, ou nos dois primeiros dias, porem, com uma diminuição gradativa, devemos pensar que, neste caso, trata-se apenas de eliminação (salvo se for muito pequena a quantidade inoculada) e não o resultado da multiplicação no organismo. E' preciso ser demonstrada a presença de virus no sangue, alem da quantidade que deve se esperar pela absorção do conteúdo inoculado.

Dividimos um lote de 20 pintos recém-nascidos em duas partes e inoculamos, em 10 deles 0,01 cm³ da diluição 1:10 de virus neurotrópico Francês da 80.^a passagem em pinto, correspondendo a \pm 160 D. M. M.; a outra parte recebeu 0,03 cm³ intradérmico, da diluição 1:100 correspondendo a \pm 50 D. M. M. Todos os animais foram inoculados na face interna da coxa e formou-se no local uma pequenina bolha. Foram sangrados no 3.^o 4.^o, 5.^o e 6.^o dia post-inoculação para pesquisa de virus circulante e decorri-

dos 30 dias novamente sangrados para prova de proteção (Quadro n. XI).
Obtivemos os seguintes resultados :

- a) Dos 10 pintos inoculados com ± 160 D. M. M., dois não evidenciaram virus circulante, e os soros de 3, dentre os quais estes dois, deram resultados negativos nas provas de proteção; um dos pintos com resultados negativo apresentou virus circulante.
- b) Nos outros 10 pintos, inoculados com ± 50 D. M. M., apenas um não demonstrou virus na circulação, mas deu prova de proteção positiva. Por outro lado, em um pinto no qual circulou virus, a prova de proteção foi negativa, o que contribue, mais uma vez, para demonstrar que apesar da imunidade ser um bom índice de que a infecção foi estabelecida, sua ausência, contudo, não exclue a possibilidade de uma infecção mínima anterior.
- c) Verificamos, assim, que a maioria de pintos inoculados por via intradérmica com pequena quantidade de virus (50-160 D. M. M.) se infectam.

Os resultados obtidos teem grande importância porque torna possível levar ao terreno das aves o já vasto estudo sobre depositários de virus.

QUADRO N. XI

RESULTADOS DA PESQUISA DE VIRUS CIRCULANTE E PROVAS DE PROTEÇÃO EM PINTOS RECEM-NASCIDOS, INOCULADOS POR VIA INTRADÉRMICA

PINTOS INOC. COM ± 160 D. M. M.						PINTOS INOC. COM ± 50 D. M. M.					
N. da série	RESULTADOS					N. da série	RESULTADOS				
	Dias de sangria				Prova de proteção		Dias de sangria				Prova de proteção
	3º	4º	5º	6º			3º	4º	5º	6º	
2603	1/6	2/6	2/5	2/6	6/6	2613	0/6	1/6	1/6	2/6	6/6
2604	4/6	2/6	0/6	0/5	6/6	2640	3/6	5/6	2/6	0/6	6/6
2605	5/6	2/6	1/5	0/3	6/6	2615	0/5	3/6	3/5	0/6	6/6
2606	5/6	1/4	0/5	0/5	0/6	2616	2/6	3/5	0/5	0/6	6/6
2607	0/6	1/6	1/6	1/5	6/6	2617	3/4	1/6	0/6	0/6	6/6
2608	0/6	1/6	0/6	1/6	6/6	2618	3/6	1/5	0/6	0/6	6/6
2609	0/6	1/5	2/5	1/6	6/6	2619	1/6	0/6	0/6	0/6	5/6
2610	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	2620	0/4	3/5	1/6	0/6	0/6
2611	0/5	0/5	0/6	0/6	0/6	2621	0/6	1/5	1/6	0/5	6/6
2612	0/6	2/6	0/6	0/6	5/6	2622	0/6	0/5	0/6	0/6	6/6

Nossa intenção inicial foi fazer mosquitos infectados picarem pintos recém-nascidos e sangrá-los diariamente durante os 6 primeiros dias. Com a inoculação intradérmica recorreremos a um artifício de técnica, que nos veio mostrar ser muito provável que, se mosquito infectados picarem pintos recém-nascidos, haverá circulação de vírus pelo menos em alguns.

Depois dos estudos de N. C. Davis (*Am. J. Trop. Med.*, 14, 343, 1934) sabemos que mosquitos podem transmitir por picada 100 D. M. M. e talvez mais. Ora, nós inoculamos de 50 a 160 D. M. M., o que corresponde, em média, a uma transmissão por picada de mosquito. Além disso, o mosquito, em geral, introduz a trompa num capilar, facilitando assim a difusão do vírus.

E' pois lógico supor que, se dadas espécies de mosquitos, reconhecidamente capazes de se infectarem com vírus amarelado, picarem pintos com vírus circulante, possam se infectar e transmitir o vírus a outros pintos, e, quiça, a aves recém-nascidas, que neste caso representariam um dos depositários naturais de vírus, de grande importância para o Brasil, onde a avifauna é abundantíssima.

SUMMARY OF INTRADERMAL INOCULATION

Previous experiments (intraperitoneal) show clearly that chicks can circulate virus when inoculated by an extraneural route, and also can develop immunity.

Brief experiment done to test possibility of developing infection with small intradermal doses such as might be transmitted by a blood sucking insect (Table XI).

- a) With 0.01 cm³ containing approximately 160 M. L. D., 10 chicks were inoculated intradermally. Two failed to show circulating virus, and 3, including these 2, were found not to have circulating antibodies after 30 days. One chick, which did circulate virus, failed to develop virus.
- b) With 0.03 cm³ of 10 x less concentrated virus suspension containing about 50 M. L. D., 10 more chicks were similarly inoculated. Only 1 of these failed to show circulating virus, although it was later found to have antibodies. One of these, however, which did circulate virus, failed to develop antibodies.
- c) It is thus apparent that the majority of 0-1 day chicks inoculated intradermally with small virus quantities (50-160 M.L.D.) become infected.

5.^a Parte

Breve estudo sobre introdução do vírus por via gástrica; pesquisa de vírus nas fezes; inoculação de vírus em pintos com avitaminose B.

Nesta parte desejamos relatar os resultados obtidos em experiências que, apesar de feitas com número pequeno de animais, já servem para uma orientação.

1. Pesquisa de anticorpos no soro de pintos que receberam vírus por via gástrica.

Em um lote de 8 pintos recém-nascidos, colocamos no estômago, com o auxílio de uma sonda de vidro, 0,20 cm³ de suspensão de vírus, correspondente a \pm 3.000 D. M. M. Colhidos os soros 30 dias depois, e postos em prova de proteção, todos deram resultados negativos.

Devido ao pequeno número de animais utilizados, não queremos tirar conclusões desta experiência, mas parece-nos que a via gástrica não é favorável à penetração do vírus, impedindo assim a produção de uma posterior imunização; talvez o vírus seja destruído rapidamente no estômago ou não seja absorvido através do ducto gastro-intestinal.

2. Pesquisa de vírus nas fezes.

Inoculamos um lote de 10 pintos recém-nascidos com suspensão a 10 % de vírus da 80.^a passagem, do seguinte modo: 5 pintos receberam \pm 500 D. M. M. por via intracerebral, e os outros 5, cerca de 3.000 D. M. M. por via intraperitoneal. Sacrificamos 2 pintos no 3.^o dia, 4 pintos no 4.^o dia e os 4 restantes no 5.^o dia. As fezes colhidas no intestino delgado e grosso, foram trituradas em gral e feitas suspensões a 10 % em solução fisiológica com 2 % de soro normal humano, sendo a seguir, centrifugadas e filtradas em Berkefeld N. Inoculamos 0,03 cm³ de cada filtrado, em um grupo de 6 camundongos, por via intracerebral. Não foi possível evidenciar vírus no material utilizado.

Apesar de ser pequeno o número de observações, dá-nos a impressão de não ser possível o isolamento de vírus nas fezes de pintos após a inoculação por via intracerebral e intraperitoneal.

3. Inoculação de vírus em pintos com avitaminose B.

Objetivo. Nossa intenção, nesta experiência, foi verificar se haveria possibilidade de obtermos melhores resultados ao inocularmos vírus neurotrópico de passagem em cérebro de pinto, quando trabalhamos com animais debilitados e principalmente com o sistema nervoso afetado. A hipovitaminose B, em aves, principalmente em galinhas, não só provoca lesões nervosas periféricas, como, e o que é mais importante, o sistema nervoso central é muito atingido.

Período prodrômico, sintomatologia e duração da doença. Inicialmente estudamos o período de incubação, a duração da doença e sintomatologia geral, porque todos os trabalhos que consultamos referem-se apenas a frangos ou aves adultas, não nos sendo possível encontrar estudos detalhados sobre pintos com poucos dias de idade.

Verificamos que, enquanto com frangos e galinhas, os primeiros sintomas de doença raramente aparecem antes da 3.^a semana depois do início da alimentação especial, em pintos podemos observar início da doença 9 dias após regime carente. O período de doença nestes pintos é muito mais curto em relação a adultos, sendo que, às vezes, 24 horas após o início dos sintomas o animal vem a morrer.

Se, em vez de pintos com apenas 1 ou 2 dias de idade, trabalharmos com pintos de 5 dias, podemos verificar que, apesar da diferença pequena, já é possível notar aumento no período de incubação e na duração da doença. Por outro lado, verificamos que, em estado adiantado, a volta à alimentação normal não mais faz regredir os sintomas e que no período precomatoso nem mesmo a introdução de vitamina B, por via parenteral, salvará o animal em experimentação.

A sintomatologia é idêntica à dos adultos, apenas em lapso de tempo muito menor : inicia-se, geralmente, com marcha trôpega, titubeante; andam, às vezes, rapidamente para a frente como se houvesse um deslocamento do eixo do equilíbrio. Depois, não mais conseguem manter-se em pé com as pernas erectas, apoiando-se sobre toda a extensão da perna que forma ângulo agudo com a coxa; os dedos estão flectidos; os músculos das asas e pescoço são geralmente atingidos; ficam encolhidos, quietos, as penas eriçadas, a cabeça encostada ao peito; fezes com coloração muito clara. Se não morrerem horas depois, a doença progride rapidamente sendo em geral encontrados 24 horas depois, caídos no fundo da gaiola, o pescoço torcido para trás, com profunda dispnéia, que os obriga a manter o bico aberto, dando-nos a visão do quadro exato do período precomatoso da doença de Eijkman.

Nos pintos muito novos o período da doença dura de poucas horas a 2 dias.

Resultados da experiência.

A inoculação de vírus neurotrópico por via intraperitoneal e intracerebral durante o período de incubação, no início da doença e em um período mais adiantado (suspendendo, a seguir, a alimentação especial) não produziu sintomas que pudessem ser imputados como encefalite amarilica; exames histopatológicos do cérebro, feitos em uma série de animais sacrificados em dias consecutivos, não demonstraram lesões de encefalite por vírus. E'

possível que estudos feitos em larga escala ponham estes resultados em contradição.

6.^a Parte

Patogenicidade.

Em geral, pintos inoculados por via intracerebral ou intraperitoneal não apresentam sintoma algum de doença.

Alguns pintos, entretanto, nos primeiros dias post-inoculação por via intracerebral, ficam com as penas eriçadas, alimentam-se pouco e permanecem quietos; algum tempo depois nada mais demonstram.

Às vezes alguns veem a sucumbir, mas difícil nos será dizer se a morte é proveniente de infecção amarílica.

No decorrer das últimas passagens, como tivéssemos alguns pintos paralíticos, retiramos o cérebro para exame histopatológico.

Em suma, pode verificar-se que, no sistema nervoso central, houve infiltração intersticial e perivascular por linfócitos e alterações degenerativas nas células dos neurônios. Este processo de encefalite foi sempre pouco intenso, e não nos pode dar a segurança de ter sido provocado pelo vírus amarílico.

DISCUSSÃO

O grande número de passagens em série, do vírus neurotrópico Francês, demonstrou ser possível a conservação deste, em cérebro de pintos, nos primeiros dias de nascidos, sem que, no entanto, manifestações patológicas fossem verificadas, senão excepcionalmente. Neste caso, provavelmente por condições muito especiais de certos pintos (ou devido a uma doença intercorrente), foram observados animais doentes depois da inoculação intracerebral, e mesmo alguns sucumbiram com sintomas de encefalite. Retirado o cérebro de tais pintos, observamos um processo de encefalite pouco intenso, incapaz de justificar a sintomatologia apresentada. É provável que após inoculação intracerebral de vírus haja em muitos pintos um processo ligeiro de encefalite que facilmente regride. Mesmo provocando em pintos um estado carencial, que dificultaria todas as defesas naturais e, ademais, prepararia o terreno nervoso para uma infecção, não conseguimos provocar a morte por encefalite. Este foi o caso da hipovitaminose B experimental, em que, apesar de trabalharmos com número relativamente pequeno de animais, não obtivemos resultados que eram de esperar; é possível que, com este processo e com número elevado de pintos inoculados com doses grandes de vírus, se consiga matá-los com encefalite amarílica. Assim, os pintos que

morreram apresentando, dias após a inoculação, paralisia, são casos esporádicos, devido a uma susceptibilidade especial, ou talvez a outra doença intercorrente.

A questão mais importante de nossas investigações é a que trata da circulação e multiplicação de vírus após a inoculação intracerebral, intraperitoneal e intradérmica. Esta última tem importância primordial, porque é quase idêntica à maneira natural da infecção e, devido a pequena quantidade de vírus que inoculamos, mais ou menos equivalente à picada de um mosquito, podemos formular a hipótese de que tais animais possam servir de depositários de vírus, e talvez muitas outras aves ainda não estudadas, contribuindo para a disseminação da febre amarela silvestre. A idade, pelo menos em pintos, é o fator mais importante no problema da circulação do vírus. De um modo geral, podemos dizer que a presença do vírus no sangue, varia na razão inversa da idade, isto é, quanto mais velho é o pinto, tanto menor a possibilidade de obtermos vírus circulante, sendo que dificilmente poderá ser evidenciado em animais com mais de 10 dias, salvo se a quantidade administrada for muito grande; neste caso, o vírus isolado do sangue é, muito provavelmente, resultante da eliminação e não o significado de uma multiplicação. A difusão do vírus no organismo é feita por via circulatória, sendo possível nos primeiros dias post-inoculação, evidenciar vírus em diversos órgãos. Parece não ter significação especial o encontro de pequena quantidade de vírus em certos órgãos, sem que no mesmo dia tenha sido isolado do sangue; o fato importante, e que demonstra a afinidade especial do vírus para o tecido nervoso, é não ser possível isolar vírus do cérebro nos primeiros dias que seguem à inoculação extraneural, e, mais tarde, o desaparecimento dele do sangue e dos diversos órgãos, sendo apenas encontrado no cérebro (e provavelmente em todo sistema nervoso central), por vários dias.

O desenvolvimento da imunidade verifica-se em grande número de pintos inoculados por via intracerebral, intraperitoneal e intradérmica, mesmo quando pequenas quantidades de vírus são introduzidas, devido à multiplicação no organismo. O aparecimento de anticorpos no sangue, em quantidade suficiente para neutralizar o vírus nas provas de proteção, se processa rapidamente, em média 10 dias após a inoculação, não obstante haver ainda vírus no cérebro.

A idade tem grande influência para o desenvolvimento da imunidade de pintos inoculados por via extraneural, provavelmente devido ao melhor desenvolvimento da barreira hematoencefálica, ou talvez por ser a absorção mais lenta, assim como maior a capacidade do sangue em destruir o vírus. De qualquer modo, não nos foi possível imunizar pintos com mais de 15 dias

de idade, inoculados por via intraperitoneal, ao passo que, por inoculação intracerebral obtivemos resultados positivos em animais de 35 dias.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1. O vírus neurotrópico Francês pode ser transferido em série de cérebro de pinto, sem modificações essenciais no comportamento do vírus em camundongos e pintos.
2. Pintos são suscetíveis à inoculação de vírus por via intracerebral, intraperitoneal e intradérmica, evidenciando vírus circulante e desenvolvimento de imunidade, em alta percentagem, para os inoculados nos primeiros dias de nascidos. A presença, porém, de vírus no sangue varia na razão inversa da idade. Não parece ser possível infectar pintos por via gástrica.
3. O vírus pode ser encontrado, ocasionalmente, no pulmão, fígado, baço e rim; alguns dias depois é apenas isolado do cérebro, onde pode ser evidenciado até o 10.^o dia post-inoculação intraperitoneal e até o 15.^o dia depois de inoculação intracerebral, e talvez em data posterior. Não conseguimos, porém, isolar vírus das fezes.
4. Não parece haver diferença na suscetibilidade ao vírus amarelo, em pintos com avitaminose B.
5. Anticorpos são evidenciáveis no soro em média 10 a 11 dias após inoculação intraperitoneal e intracerebral, sendo possível isolar ao mesmo tempo, vírus do cérebro.
6. A idade tem influência nítida no desenvolvimento da imunidade, em pintos inoculados por via intraperitoneal.
7. A multiplicação e circulação de vírus após inoculação intradérmica de 50 a 160 D. M. M., torna possível a hipótese de mosquitos infectados difundirem o vírus entre pintos e talvez a outras aves, com poucos dias de idade.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. After 80 serial passages from brain to brain of chicks, neurotropic virus fails to show essential modifications in the behaviour of the virus in mice or chicks.
2. Chicks are susceptible by intracerebral, intraperitoneal and intradermal route, showing high levels of circulating virus and become immune when inoculated during the first days after birth. But, circulating virus varies, however, in inverse ratio to age. It does not seem possible to infect chicks by gastric route.

-
3. During first days virus may be found, occasionally in the lungs, liver, spleen and kidneys; some days afterwards, no chicks showed virus in other organs than brain, in which virus persists up to 10th day post-intraperitoneal inoculation and up to 15th day after the intracerebral inoculation, and perhaps till later. We have however, not been able to isolate the virus from excretions.
 4. There does not seem to be any difference in susceptibillity to the yellow fever virus, on chicks with B avitaminosis.
 5. Detectable immune bodies appear by 10-11 day after intraperitoneal and intracerebral inoculation, at time, that many of some chicks still have virus in the brain.
 6. Age has a marked influence on the development of immunity, in chicks inoculated by intraperitoneal route.
 7. The multiplication and circulation of virus after intradermal inoculation of 50 to 160 M.L.D., renders possible to suggest that infected mosquitoes can difuse the virus among chicks and, perhaps, to other birds, a few days old.
-