

Suscetibilidade de camundongos ao vírus amarelíco administrado por vias extraneurais (*)

por

Herminio Linhares

As vias de inoculação pelas quais as infecções são produzidas em animais, para diversos vírus patogênicos, tem importância particular, ajudando a caracterizar diferentes amostras de vírus, assim como servindo para indicar possíveis modos de transmissão. Por outro lado, a suscetibilidade de diferentes espécies de animais, para uma dada amostra de vírus, pode ser comparada, de acordo com as respostas à inoculação por várias vias; e, ademais, nas experiências feitas com uma única espécie de animal, é possível comparar diferentes vírus, de acordo com a capacidade de infecção ou de imunização, quando inoculado por vias diversas. Em tais experiências, pode-se demonstrar a afinidade especial de um tecido para um dado vírus, e também sua capacidade de invadir o animal pela circulação em geral ou de outra maneira.

Contudo, uma vez escolhida uma dada espécie de animal, certos fatores, dentre os quais a idade é provavelmente o mais importante, podem afetar a resistência oferecida por qualquer via.

O vírus da febre amarela é representado por um grande número de amostras, quer naturais, quer modificadas por processos de laboratório, as quais possuem diferentes graus de virulência e afinidades tissulares.

Em camundongo, há muito é conhecido que o vírus da febre amarela é apenas capaz de produzir infecção no sistema nervoso. A diferenciação de várias amostras, por infecção intracerebral em camundongos, só pode ser feita de maneira geral, de acordo com o período de incubação da doença e o tempo médio de sobrevivência depois da inoculação de quantidades equivalentes em D. M. M. As infecções produzidas por inoculações extraneurais dependem da capacidade do vírus alcançar o sistema nervoso, do local de inoculação. Em camundongos adultos, exceto por via intranasal, via nervo olfativo, as barreiras do sistema nervoso central são suficientes, e o vírus em circulação, devido à inoculação extraneural, raramente pode se localizar no tecido nervoso, a menos que tais defesas sejam rompidas, por uma pre-

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

liminar inoculação de goma intracerebral. Essas barreiras, contudo, desenvolvem-se com a idade; assim, se se usa camundongos nos quais estas defesas naturais estão incompletamente desenvolvidas, ou nos quais as barreiras tiverem sido rompidas, pode-se fazer o estudo sobre a capacidade de amostras atingirem o sistema nervoso. O camundongo pode tornar-se, neste caso, um animal útil para a medida de capacidade geral de invasão de uma amostra de vírus, além de demonstrar simplesmente suas qualidades neurotrópicas.

Nesta comunicação são relatados os estudos sobre as possibilidades de invasão, de diferentes amostras de vírus, em camundongos de várias idades, nos quais o vírus foi administrado por diversas vias, e os resultados observados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Amostras de vírus* :

- a) *Vírus neurotrópico Francês*; obtido do cérebro de camundongos moribundos com encefalite, da passagem 555.
- b) *Vírus de vacina* : vírus 17D; material dessecado de um lote de vacina (A. 660) preparado com soro humano e embriões de pintos infectados.
- c) *Vírus Asibi* : obtido de soros de Rhesus infectados e sangrados no 3.^o e 4.^o dia. Os soros foram dessecados e reidratados no momento de usar.
- d) *Vírus Asibi Egg I* : cuja origem (1) foi a 19.^a subcultura em meio do tipo de Maitland contendo tecidos de embrião de camundongos e depois mantido em série por inoculação direta em embrião de galinha; foi usado material da 81.^a passagem.
- e) *Asibi Egg III* : é semelhante à amostra anterior, mas o vírus original é de soro de macaco; foi usado material da 8.^a passagem.

2. *Animais* : Camundongos suíços, criados no Laboratório. Foram usados camundongos muito jovens, de 0-6 dias, camundongos recém-desmamados, isto é, com 21 dias e adultos de 36 dias.

3. *Inoculações* : as diferentes técnicas de inoculação para cada tipo de experiência serão descritas no próprio texto de cada experiência. Aqui relatamos apenas a inoculação intracerebral de goma, feita em alguns grupos de camundongos com 21 dias e em todos os adultos. Prepara-se uma emulsão de goma de amido a 2 % e inocula-se 0,03 cm.³ intracerebral, usando seringa de tuberculina; esta inoculação é feita, comumente, 1 hora antes da administração de vírus.

4. *Observações :*

- a) Os animais foram observados, diariamente, durante 30 dias e todos os sintomas registados em cartões adequados.
- b) Prova de imunidade : Findo o prazo de observação, todos os camundongos foram inoculados com 0,03 cm³ de goma de amido a 2 %, por via intracerebral e 0,20 cm³ intraperitoneal, de suspensão a 15 % (em solução fisiológica) de virus neurotrópico Francês, de passagem em cérebro de camundongo. Quando não há imunidade, os camundongos morrem, em geral, do 5.^o ao 10.^o dia.

5. *Títulos :*

As quantidades de virus foram determinadas pela inoculação intracerebral em camundongos suíços, adultos, anestesiados pelo eter, de 0,03 cm³ para cada camundongo, de diversas suspensões.

Foram preparadas diluições decimais de virus e com cada qual inoculado um grupo de 6 camundongos. A mortalidade de 50 %, o ponto limite na titulação, foi calculada pelo método de Reed e Muench (2). Uma D. M. M. é definida com a quantidade de virus contida em 0,03 cm³ da diluição "ponto-limite".

Virus neurotrópico deu título baixo, $\pm 1.000.000$; usamos, nas experiências, suspensão a 10 %.

Virus de vacina foi usado em suspensão rehidratada, cujo título foi de ± 5.000 .

O título do virus Asibi usado, foi 400.000; Asibi Egg I e III deram títulos de 10.000 e 5.000 respectivamente.

PARTE EXPERIMENTAL

I. *Instilação de virus nas narinas.*

A mucosa nasal é uma das mais sensíveis para a penetração do virus, talvez mesmo podendo-se considerar como uma modalidade de inoculação neural, mas de interesse para comparação de várias amostras de virus amarelíco. Findlay e Clarke (3) conseguiram infectar macacos e camundongos por instilação nasal de virus; em 50 camundongos, 36 tiveram encefalite e, dos 6 macacos usados, 5 ficaram doentes.

Nesta experiência trabalhamos apenas com camundongos jovens, de 21 dias, e dois métodos diversos foram usados para instilação do virus; no primeiro deixou-se cair lentamente a suspensão sobre as narinas e, pela inspira-

ção, o líquido penetrou com facilidade nas fossas nasais; no outro método, a agulha foi introduzida com facilidade alguns milímetros para dentro das narinas, injetando-se o líquido lentamente; com o animal anestesiado, é mínimo o perigo de ferí-lo, sendo talvez esta a melhor técnica, pois sabemos exatamente a quantidade posta em contacto com a mucosa.

Experimentamos 3 amostras de vírus e observamos os animais durante 30 dias; findo este prazo, todos foram inoculados, afim de estudarmos as possibilidades de desenvolvimento da imunidade.

A amostra de vírus neurotrópico foi instilada na concentração de ± 100.000 D. M. M. por $0,03 \text{ cm}^3$, em 23 camundongos, com e sem goma intracerebral, o que não mostrou diferenças nos resultados. 74 % dos camundongos morreram com encefalite e os restantes demonstraram ter adquirido imunidade (Quadro n. I).

QUADRO N. I

RESULTADOS DA INSTILAÇÃO DE VIRUS NAS NARINAS DE CAMONDONGOS COM 21 DIAS

VIRUS		GOMA I. C.	N. DE CAMON- DONGOS	RESULTADOS			
Amostra	D. M. M. instiladas			N. de mortos e. encefalite	N. de imunes	Total infectado	% de infecção
Neurotr.....	± 100.000	S	11	8	3	11	100
Neurotr.....	± 100.000	N	12	9	3	12	100
Asibi.....	± 400.000	S	11	2	9	11	100
Asibi.....	± 400.000	N	12	5	7	12	100
Vacina.....	± 10.000	S	12	0	7	7	58
Vacina.....	± 10.000	N	12	0	11	11	91

O vírus Asibi, empregado na concentração de ± 400.000 D. M. M., para $0,03 \text{ cm}^3$ foi instilado em 23 camundongos, dos quais 7 morreram com sintomas de encefalite e os sobreviventes provaram ter adquirido imunidade, quando reinoculados.

Por último, usamos a amostra de vírus de vacina (17D), na concentração de ± 5.000 D. M. M., por $0,03 \text{ cm}^3$ (instilamos $0,06 \text{ cm}^3$) em 24 camundongos. Nenhum morreu de encefalite, mas, quando reinoculados, 18 mostraram-se imunes, ou melhor 75 %.

Devido à discordância entre as concentrações empregadas, há apenas possibilidades de comparar as amostras neurotrópica e Asibi. Ambas teem forte poder infectante por via nasal, talvez um pouco mais acentuado na

primeira. Examinando em conjunto, observamos que, em 46 camundongos, 24 morreram de encefalite, ou seja 52 %, resultados estes de acordo com os de Findlay e Clarke, que obtiveram, porem, percentagens mais elevadas (72%).

E' muito possivel que, se empregássemos virus de vacina em concentraçãõ idêntica à amostra Asibi, por exemplo, obtivéssemos diversos camundongos mortos por encefalite.

Temos a impressãõ que a inoculaçãõ intracerebral de goma de amido não tem influênciã neste caso. O fato de ter havido maior número de mortos com encefalite e, no caso de virus de vacina, maior número de imunes, nos animais que não receberam goma, não parece ter uma significaçãõ especial. Ora, é lógico assim supor, já que devemos considerar como a mais provavel via de infecçãõ a penetraçãõ do virus pelos espaçõs linfáticos perineurais dos nervos olfativos, se bem que não possa ser de todo afastada a hipótese de penetraçãõ por via sanguínea.

II. Instilaçãõ de virus no ouvido.

A possibilidade de infectar camundongos jovens por passagem de virus atravêõs da mucosa intacta do ouvido, foi estudada por nós, com três amostras diferentes. A instilaçãõ foi feita deixando-se cair, gota a gota, o volume desejado, o mais internamente possivel, em comundongos anestesiados pelo eter. Todos os cuidados foram tomados afim de que não se produzisse qualquer soluçãõ de continuidade na mucosa, que püdesse alterar os resultados da experiênciã. Usamos apenas camundongos de 21 dias, de modo que, para cada material, um grupo fosse previamente inoculado com goma intracerebral (Quadro n. II).

QUADRO N. II

RESULTADOS DA INSTILAÇãõ DE VIRUS NO OUVIDO DE CAMONDONGOS COM 21 DIAS

VIRUS		GOMA I. C.	N. DE CAMON- DONGOS	RESULTADOS			
Amostra	D. M. M. instiladas			N. de mortos c. encefalite	N. de imunes	Total infetado	% de infecçãõ
Neurotr.....	± 100.000	S	11	0	5	5	45
Neurotr.....	± 100.000	N	12	0	4	4	33
Asibi.....	± 400.000	S	11	0	3	3	27
Asibi.....	± 400.000	N	9	0	2	2	22
Vacina.....	± 10.000	S	12	0	1	1	8
Vacina.....	± 10.000	N	11	0	0	0	0

Instilamos em 23 camundongos cerca de 100.000 D. M. M. de virus neurotrópico. Não foi observado qualquer sintoma de infecção durante o período de observações, mas, quando inoculados para prova de imunidade, 9 mostraram-se imunes, ou seja 39 %.

Da amostra viscerotrópica Asibi, instilamos 0,03 cm³ de suspensão correspondente a \pm 400.000 D. M. M., em 20 camundongos; assim como na amostra anterior, nenhum animal morreu durante os 30 dias de observação, mas 5 adquiriram imunidade, isto é, 25 %.

Por fim, em 23 camundongos, nos quais foi instilado 0,06 cm³ de virus de vacina, correspondendo a cerca de 10.000 D. M. M., apenas 1 mostrou-se imune, na prova de imunidade.

Estes resultados tem algum interesse, pois sugerem que o virus pode atravessar a mucosa do ouvido, se bem que com dificuldade e dar infecção inaparente, porem revelada na prova de imunidade. O número total de animais imunes, isto é, 15 em 66, cerca de 23 % (ou 32 % se nos referirmos somente ao virus Asibi e neurotrópico, pois o virus de vacina foi empregado em concentração muito menor) é relativamente elevado e afasta a hipótese destes casos serem devidos a escoriações no momento da instilação, ou mesmo uma ruptura da membrana do tímpano.

III. *Instilação de virus no olho.*

A possibilidade de infectar animais por penetração do virus amarelado através da córnea intacta ou escarificada, ou pela conjuntiva, ainda não levou, os diversos pesquisadores, a um acordo.

Assim Beeuwkes (4) acha que o virus não pode penetrar através da conjuntiva e, mais tarde, Theiler (5) não obteve infecção de camundongos depondo o virus na córnea, mesmo esfregando ou escarificando, mas conseguiu matá-los inoculando no olho; entretanto, os sobreviventes não demonstraram ter adquirido imunidade. Por outro lado, Marchoux (6) conseguiu infectar Rhesus por deposição de virus no saco conjuntival e idênticos resultados obtiveram Aragão e Costa Lima (7) usando fezes de mosquitos infectados; além destes, Findlay e Clarke (3) instilaram virus neurotrópico no saco conjuntival de 20 camundongos e 8 tiveram encefalite. Nós pretendemos trazer uma pequena contribuição para este estudo, verificando a possibilidade de infectar camundongos com diversas amostras de virus amarelado, por simples instilação na córnea ou por escarificação feita com agulha de injeção.

Experimentamos três amostras de virus, geralmente, em camundongos de 21 dias; cada grupo foi dividido de modo que fosse possível observar, para um mesmo material, animais com ou sem irritação da córnea que rece-

beram ou não goma intracerebral. Após um período de 30 dias de observação, os animais foram reinoculados, para verificação da imunidade (Quadro n. III).

QUADRO N. III

RESULTADOS DA INSTILAÇÃO DE VIRUS NA COREA

IDADE	VIRUS		TÉCNICA		N. DE CAMONDONGOS	RESULTADOS			
	Amostra	D. M. M. instiladas	Goma i. c.	Escarificação		N. mortos e. encef.	N. de imunes	Total infectado	% infecção
Adultos.....	Neurotr.	± 200.000	N	N	12	0	0	0	0%
Adultos.....	Neurotr.	± 200.000	S	N	5	0	0	0	0%
Adultos.....	Neurotr.	± 200.000	S	S	5	0	0	0	0%
21 dias.....	Neurotr.	± 100.000	S	S	11	6	2	8	72%
21 dias.....	Neurotr.	± 100.000	N	S	14	1	4	5	35%
21 dias.....	Neurotr.	± 100.000	S	N	11	0	1	1	9%
21 dias.....	Neurotr.	± 100.000	N	N	15	0	0	0	0%
21 dias.....	Asibi	± 400.000	S	S	12	0	3	3	25%
21 dias.....	Asibi	± 400.000	N	S	12	0	4	4	33%
21 dias.....	Asibi	± 400.000	S	N	12	0	0	0	0%
21 dias.....	Asibi	± 400.000	N	N	12	0	0	0	0%
21 dias.....	Vacina.	± 10.000	S	S	11	0	1	1	9%
21 dias.....	Vacina.	± 10.000	N	S	12	0	1	1	8%
21 dias.....	Vacina.	± 10.000	S	N	12	0	0	0	0%
21 dias.....	Vacina.	± 10.000	N	N	10	0	0	0	0%

Em 22 camundongos adultos foram instiladas na córnea cerca de 200.000 D. M. M. e, em 51 camundongos jovens, ± 100.000 D. M. M. de virus neurotrópico Francês. Nenhum dos camundongos adultos (com ou sem escarificação; com ou sem goma intracerebral) mostrou sinais de infecção e todos morreram, quando reinoculados 30 dias depois, demonstrando não terem adquirido imunidade. Resultados muito diferentes foram porem obtidos em camundongos de 21 dias; a escarificação da córnea, nos animais que receberam goma, causou encefalite em 6 dentre 11, sendo que 2 dos 5 sobreviventes, mostraram ter adquirido imunidade, o que significa um total de 72 % de infecção; porem animais que não receberam goma, sofrendo apenas a escarificação, um só adoeceu, morrendo de encefalite, mas 4 tornaram-se imunes dentre os 19 sobreviventes, dando um índice geral de infecção de

35 %. Os animais não escarificados, com apenas uma exceção, não se infectaram.

A amostra Asibi, numa concentração de cerca de 400.000 D. M. M. por 0,03 cm³, foi usada em 48 camundongos de 21 dias. Nenhum camundongo morreu com sintomas de encefalite; contudo, nos animais que sofreram escarificação, 7 demonstraram ter adquirido imunidade, ou seja 29 %. Nos camundongos em que o vírus foi instilado, sem que fosse a córnea escarificada, não houve infecção.

A terceira amostra usada foi de vírus de vacina (17D), recebendo cada animal \pm 100.000 D. M. M. Também neste caso não morreu qualquer camundongo e 2 (dentre os escarificados) adquiriram imunidade.

Os resultados obtidos em animais adultos, se bem que em pequeno número, sugerem ser muito difícil a infecção ou talvez mesmo impossível.

Os resultados obtidos em camundongos de 21 dias se prestam para observação sobre as nítidas diferenças existentes entre os animais que sofreram ou não escarificação da córnea. Assim, se no primeiro caso em 72 camundongos, 30,5 % se infectaram (ou 41 % se consideramos apenas o vírus Asibi e neurotrópico) em idêntico número de animais, em que apenas o vírus foi instilado, somente um camundongo sobreviveu ao teste de imunidade.

Tais resultados demonstram ser muito difícil a infecção, mesmo de camundongos jovens, cuja suscetibilidade é muito maior que em adultos, quando o vírus amarílico é apenas instilado sobre a córnea normal. A escarificação, entretanto, permite a penetração do vírus, que pode alcançar o cérebro e matar os animais com encefalite ou produzir uma infecção inaparente capaz de imunizá-los. Devemos ainda relatar que a escarificação da córnea ocasiona frequentemente, intensa conjuntivite que, por certo, muito contribue para absorção do vírus através da mucosa conjuntival hiperemiada.

A inoculação intracerebral de goma de amido mostrou resultados dúbios; assim, se com o vírus neurotrópico há diferença flagrante entre os animais com e sem traumatismo cerebral, com o vírus Asibi tal fato não se verificou.

IV. *Introdução de vírus no estômago.*

Apesar da via gástrica apresentar muitos fatores que tornam difícil o controle, é de interesse verificar a possibilidade de infecção por esta via com diferentes amostras de vírus, especialmente depois da comunicação de Findlay e Mac Callum (8), relatando ser possível infectar Rhesus e *Cercopithecus oethiops* administrando, com sonda, vírus no estômago; trabalharam com cinco amostras de vírus e os animais que não morreram, adquiriram imunidade.

Para introdução do material, os camundongos foram anestesiados pelo éter e inoculados por meio de uma fina sonda reta de vidro, adaptada a uma seringa de tuberculina e introduzida com cuidado pelo esôfago. Em cada um, foi inoculado de 0,12 a 0,20 cm³. A possibilidade de traumatismo não pode ser completamente afastada, mas todos os cuidados foram tomados para evitá-lo.

Desta maneira foram examinadas cinco amostras de virus, em camundongos de 21 dias ou em adultos, ou ainda em ambos, sendo uma parte de cada grupo previamente inoculada com goma intracerebral.

Os camundongos foram observados durante 30 dias post-inoculação, tempo relativamente amplo para que se manifestassem sinais de encefalite. Findo este prazo, foram inoculados com virus neurotrópicos por via intraperitoneal e goma intracerebral (segundo a técnica usual descrita em material e métodos) para prova de imunidade.

A amostra de virus neurotrópicos de passagem, foi inoculada na concentração ± 100.000 D. M. M. por 0,03 cm³, em 12 camundongos adultos e 46 de 21 dias. Um, dentre os 6 camundongos adultos previamente inoculados com goma intracerebral, morreu aparentemente com encefalite amariçca. Os demais camundongos adultos não mostraram sinais visíveis de infecção, e, decorridos 30 dias, não resistiram à reinoculação (com apenas uma exceção), indicando que eles não tinham sido imunizados. Entretanto, resultados diferentes foram obtidos com camundongos de 21 dias; 29 deles morreram com encefalite, e 12 dos sobreviventes provaram ter adquirido imunidade quando reinoculados, dando um total de 31 infectados em 46 inoculados, ou seja 89 %. Não foi observada diferença entre camundongos com ou sem goma intracerebral.

A amostra Asibi, numa concentração de cerca de 400.000 D. M. M., por 0,03 cm³ foi usada para inocular 45 camundongos de 21 dias (0,12 cm³). Neste caso houve uma percentagem muito alta de infecção nos camundongos previamente inoculados com goma intracerebral; de 23 assim tratados, 5 morreram com encefalite e 17 mostraram, mais tarde, imunidade, dando uma incidência de infecção de 95 %. Entretanto, dos 22 camundongos sem goma, 5 também morreram de encefalite, mas somente 9 demonstraram posterior imunidade e a percentagem de infecção foi, assim, somente de 63 %.

Duas recentes amostras originárias da amostra Asibi, foram também experimentadas; são denominadas Asibi Egg I e Asibi Egg III. O número de camundongos empregados para esta prova, foi pequeno e os resultados em conjunto puderam ser melhor considerados. A experiência foi feita com a concentração de virus entre 5.000 a 10.000 D. M. M. por 0,03 cm³. De 11 camundongos adultos com goma intracerebral, um morreu com encefalite.

falite e 6 tornaram-se imunes, dando uma incidência total de infecção de 64%. Por outro lado, dos 12 camundongos de 21 dias empregados nesta experiência, apenas um morreu de encefalite, mas todos os outros demonstraram imunidade.

Em pequena experiência feita com 12 camundongos de 30 dias, que receberam goma intracerebral, usando Asibi Egg I, foi observado que 20 dias depois, mais de 50 % dos camundongos estavam imunes.

A última experiência foi feita com a amostra de virus de vacina (17D) correntemente usada, em concentração de mais ou menos 5.000 D. M. M. por 0,03 cm³. Aquí, foram novamente observadas diferenças entre camundongos com e sem goma intracerebral. Dos 24 camundongos previamente inoculados com goma, 4 morreram de encefalite e 15 tornaram-se imunes, dando um total de 19 infectados, ou 79 %; dos 23 camundongos que não receberam goma, 3 morreram de encefalite e 7 tornaram-se imunes, isto é, um total de 10 infectados, ou melhor 43 %.

O quadro n. IV sumaria esta experiência.

QUADRO N. IV

RESULTADOS DA INTRODUÇÃO DE VIRUS NO ESTÔMAGO

IDADE	VIRUS		GOMA I. C. I. C.	N. DE CAMON- DONGOS	RESULTADOS			
	Amostra	D. M. M. introduzidas			N. de mortos c. encef.	N. de imunes	Total infectado	% de infecção
Adultos.....	Neutror.	± 650.000	S	6	1	1	2	33
Adultos.....	Neurotr.	± 650.000	N	6	0	0	0	0
21 dias.....	Neurotr.	± 650.000	S	22	14	6	20	91
21 dias.....	Neurotr.	± 650.000	N	24	15	6	21	87
21 dias.....	Asibi	± 1.200.000	S	23	5	17	22	95
21 dias.....	Asibi	± 1.200.000	N	22	5	9	14	63
Adultos.....	A. Egg I	± 65.000	S	6	1	4	5	83
21 dias.....	A. Egg I	± 65.000	N	6	0	6	6	100
Adultos.....	A. Egg III	± 35.000	S	5	0	2	2	40
21 dias.....	A. Egg III	± 35.000	N	6	1	5	6	100
21 dias.....	Vacina	± 35.000	S	24	4	15	19	79
21 dias.....	Vacina	± 35.000	N	23	3	7	10	43

Considerando em conjunto, o grande número de camundongos infectados por via intragástrica (73%), com diversas amostras de virus, torna-se razoavel supor que o virus da febre amarela pode passar através da mucosa

intacta do tubo gastro-intestinal, desde que consideremos muito pequena a percentagem de camundongos que poderiam ter sofrido qualquer traumatismo da mucosa, ou já terem, anteriormente, qualquer lesão.

O fato de ser mais elevada a percentagem de camundongos jovens (21 dias) infectados, do que adultos, é provavelmente apenas uma indicação que camundongos jovens são mais acessíveis a uma infecção com pequena quantidade de vírus na torrente circulatória, que nos camundongos mais velhos. A localização cerebral do vírus é a causa provável da infecção, e é indicada pelo fato de ser geralmente maior a incidência de infecção ocorrida em camundongos previamente inoculados com goma do que nos sem goma.

Esta experiência não se presta para uma comparação direta da capacidade de várias amostras de vírus a uma infecção inicial por penetração através da mucosa gastro-intestinal, devido à nítida discordância existente entre as concentrações empregadas. Contudo, certos pontos interessantes podem ser observados, tais como a diferença entre o vírus Asibi e neurotrópico, quando inoculados em camundongos de 21 dias que não receberam goma, o primeiro com 63 % de animais infectados e o último com 87 %, apesar do dobro de D. M. M. empregados para o vírus Asibi; talvez isto seja uma indicação de que as barreiras intactas do sistema nervoso central sejam mais facilmente transpostas pela amostra neurotrópica. Com significação mais importante é a diferença nos resultados observados entre as amostra I e III de derivação recente da amostra Asibi, com a amostra 17D também originária de Asibi. Todas estas amostras não são patogênicas para o macaco, teem propriedades semelhantes em relação à inoculação intracerebral em camundongos, à multiplicação em embriões de galinha e cultura de tecido. Observou-se que 100 % de camundongos com 21 dias, que receberam vírus Asibi Egg I e III, infectaram-se, enquanto camundongos semelhantes que receberam aproximadamente a mesma concentração de vírus 17D, mostraram apenas 43 % de infecção, e, mesmo quando previamente inoculados com goma, apenas 79 %.

Uma questão não elucidada é se o vírus penetra pela mucosa do estômago, do duodeno, ou, talvez, pelo esôfago. Entretanto, esta última hipótese é de todas a menos provável; a sonda entra com facilidade até o estômago e não foram observadas regurgitações, pelo menos nos primeiros momentos que se seguiram à deposição de vírus, sendo porem possível que se dessem mais tarde. A contaminação do esôfago ou mesmo faringe, pela sonda, principalmente depois de retirada do estômago, não pode ser de todo afastada, mas a grande parte do material, senão todo, foi depositada no estômago. A quantidade líquida administrada, de 0,12 a 0,20 cm³ provavelmente

passa depressa para o intestino, não sofrendo a ação do pH gástrico; mesmo que a suspensão permaneça no estômago algum tempo, a influência da acidez não deve ser grande, por causa do volume líquido. Talvez, no caso da via gástrica, o volume líquido da suspensão tenha muita importância; por exemplo, se tivermos uma mesma concentração em D. M. M., mas em volumes líquidos diversos, o maior volume causará maior número de infecções; mas isto é uma simples hipótese. E', porem, muito provavel que o virus seja, não só absorvido pela mucosa gástrica, como também pelas paredes intestinais.

V. *Deposição do virus na pele.*

A possibilidade do virus amarelado atravessar a pele normal ou escarificada tem sido estudada por diversos pesquisadores, com resultados semelhantes nos casos de escarificação.

Para Beeuwkes (4), o virus pode atravessar a pele do Rhesus, escarificada, raspada e mesmo coberta de pelos, e, Aragão e Costa Lima (7) infectaram Rhesus por simples deposição, na pele normal, de fezes de mosquitos infectados. Marchoux (6), porem, não conseguiu que o virus atravessasse a pele íntegra de Rhesus, mais infectou-os fazendo escoriações cutâneas profundas. Bauer e Hudson (9), obtiveram infecção de Rhesus após esfregar suspensão de virus na pele íntegra e escarificada. Theiler (5), usando a mesma técnica, imunizou 1 camondongo entre 6 utilizados. Os mesmos resultados foram obtidos por Peltier e col. (10), os quais concluíram que o virus amarelado neurotrópico possui a propriedade de atravessar a pele ligeiramente escarificada do homem e do macaco, provocando imunidade.

Nesta experiência vamos estudar a possibilidade de infectar camondongos muito novos, com idade variavel entre recém-nascidos e 6 dias, por simples deposição do virus, ou esfregando-o na pele íntegra e escarificada.

Foi empregada apenas a amostra neurotrópica na concentração de ± 100.000 D. M. M. por $0,03$ cm³.

A simples deposição foi feita colocando a suspensão na região dorsal; em alguns camondongos passamos eter no local, afim de verificarmos se desengordurando a região, o virus poderia penetrar com mais facilidade. Nos outros camondongos, quer com a pele íntegra, quer depois de sofrer escarificações no dorso, feitas com agulha de injeção, a suspensão de virus foi esfregada várias vezes com o corpo de uma agulha grossa.

E' impossivel determinar exatamente a quantidade de virus empregada porque sempre se perdem pequenas porções de material, pela natural movimentação dos camondongos que, devido a tão tenra idade, não quisemos anestesiar; por outro lado, é possivel que depois da deposição do virus haja atrito

do camundongo com as paredes da caixa ou de uns com os outros, facilitando a entrada do virus.

A concentração de virus usada foi grande para camundongos novos, muito sensíveis ao virus amarelado, pelo menos se administrado por via intraperitoneal ou subcutânea.

Observamos ser possível a infecção, por simples deposição de virus, em pequeno número de animais; assim em 72 camundongos usados, 7 morreram com encefalite, e um mostrou-se imune quando inoculado 30 dias depois, ou seja um índice de infecção de 11 %; o desengorduramento feito pelo eter não teve influência sobre o desenvolvimento da infecção. Nos animais em que esfregamos o virus na pele intacta, 13 morreram de encefalite, em 26 inoculados, dando 50 % de infecção. Nos animais que foram escarificados, obtivemos alto índice de mortalidade; em 30 camundongos em experiência, 23 morreram com encefalite e um mostrou-se imune quando reinoculado, obtendo-se assim 80 % de infecção.

QUADRO N. V

RESULTADOS DAS EXPERIENCIAS COM VIRUS NEUROTROPICO NA PELE

IDADE	D. M. M. EMPREGADAS	TÉCNICA	N. DE CAMON- DONGOS	RESULTADOS			
				N. de mortes c. encef.	N. de imunes	Total infectado	% de infecção
0-1 dia.....	± 100.000	Deposição	37	3	0	3	8
2 dias.....	± 100.000	Deposição	10	1	0	1	10
3 dias.....	± 100.000	Deposição	10	2	0	2	20
4 dias.....	± 100.000	Deposição	10	1	1	2	20
6 dias.....	± 400.000	Deposição	5	1	0	1	20
r. nasc.....	± 100.000	Esfregaço	8	3	0	3	37
3 dias.....	± 100.000	Esfregaço	6	2	0	2	33
6 dias.....	± 400.000	Esfregaço	12	8	0	8	66
r. nasc.....	± 100.000	Escarif.	10	8	0	8	80
3 dias.....	± 100.000	Escarif.	10	7	0	7	70
6 dias.....	± 400.000	Escarif.	10	8	1	9	90

Retiramos o cérebro de alguns camundongos mortos de encefalite, fizemos suspensão a 10 % em solução fisiológica e inoculamos 6 camundongos por via intracerebral, para cada uma suspensão. Os camundongos morreram com sintomas de encefalite, demonstrando a presença de virus no cérebro dos animais mortos.

A idade, nos primeiros dias, parece que não modifica a sensibilidade dos animais, desenvolvendo-se a infecção em percentagens mais ou menos semelhantes. Fato interessante foi que, enquanto 43 camundongos morreram com encefalite, apenas 2 demonstraram ter adquirido imunidade, quando inoculados 30 dias mais tarde; tal fato sugere que os camundongos muito jovens ou se infectam e morrem com encefalite, ou sobrevivem à deposição na pele por terem escapado à infecção devido ao vírus não ter penetrado no organismo.

Como era de se esperar, a infecção através da pele íntegra dificilmente se deu, por ser o tegumento cutâneo uma barreira natural de defesa. Entretanto, a pele dos camundongos nos primeiros dias de nascidos é muito fina e sem quase nenhuma proteção pilosa, o que deve contribuir muito para facilitar a penetração do vírus; assim, verificamos que, esfregando o vírus sobre a pele íntegra, a absorção foi muito mais fácil, sendo evidenciada pelo índice de infecção mais elevado, o que muito se acentuou quando o material foi esfregado na pele escarificada.

DISCUSSÃO

As experiências aqui descritas sugerem que as diversas amostras de vírus da febre amarela administradas por vias extraneurais, podem infectar camundongos jovens, matando-os com sintomas de encefalite ou produzindo infecções inaparentes evidenciáveis, porém, nas provas de imunidade. A localização cerebral do vírus é provavelmente a causa das infecções, o que pode ser melhor observado pela maior incidência verificada, em muitos casos, nos camundongos previamente inoculados com goma, mesmo nos animais jovens em que as barreiras hematoencefálicas estão ainda incompletamente formadas.

O vírus, com exceção talvez no caso da via nasal, penetra no torrente circulatória de onde alcança em seguida o cérebro; a via nasal ainda não está de todo elucidada, mas parece que o vírus pode seguir diretamente por via nervo olfativo, ou melhor, pelos espaços linfáticos perineurais, sem que seja necessário penetrar na circulação.

Tanto a pele como as mucosas normais são barreiras naturais à entrada do vírus. Isto porém, não impede que certa quantidade de vírus consiga transpô-las produzindo infecção, quando se administra grande número de D. M. M. As soluções de continuidade aumentam porém muito a percentagem de infecção como verificamos nos casos de escarificação cutânea e da córnea.

Difícil é fazer-se um estudo comparativo sobre a capacidade infectante das diversas amostras de vírus devido às nítidas discordâncias entre as concentrações empregadas. Entretanto, se compararmos a amostra de vírus neu-

rotrópico Francês com a de virus Asibi, verificamos que apesar da primeira ter sido empregada em dose inferior sempre produziu maior percentagem de infecção.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1. Virus neurotrópico Francês, Asibi e de vacina (17D) infectam camundongos jovens, quando instilados nas narinas, matando-os com encefalite ou desenvolvendo imunidade.
2. Virus neurotrópico Francês e Asibi (e talvez o virus de vacina) quando instilados no ouvido de camundongos jovens, podem infectá-los produzindo o desenvolvimento de imunidade.
3. Após instilação na córnea escarificada de camundongos jovens, virus neurotrópicos Francês, Asibi e, talvez de vacina, podem produzir infecção. Com a córnea íntegra, no entanto, não foi possível infectar camundongos.
4. Virus neurotrópicos Francês, Asibi, de vacina, Asibi Egg I e Egg III introduzidos no estômago, podem infectar camundongos jovens, matando-os com encefalite ou imunizando-os.
5. É possível infectar camundongos de 0-6 dias de idade por simples deposição de virus ou esfregando a suspensão na pele íntegra e escarificada.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. French neurotropic, Asibi and vaccine (17D) virus, infect young mice (21 days) when instilled in the nostrils, killing them with symptoms of encephalitis or developing immunity.
2. French neurotropic virus and Asibi (and perhaps vaccine virus), when instilled in the ear of young mice, may infect them producing development of immunity.
3. After instillation in the scarified cornea of young mice, French neurotropic virus, Asibi and perhaps vaccine virus, may produce infection. The cornea being, however, whole it has not been able to infect mice.
4. French neurotropic virus, Asibi, vaccine, Asibi Egg I and Egg III introduced into the stomach, may infect young mice, causing e fatal encephalitis or rendering them immune.
5. It is possible to infect mice 0-6 days old by simple deposition of virus or rubbing the suspension on the whole and scarified skin.

BIBLIOGRAFIA

1. PENNA, H. A. e MOUSSATCHÉ, H.: *Brasil Médico*, 38, 903, 1939.
 2. REED, L. J. e MUENCH, H.: *Am. J. Hyg.*: 27, 493, 1938.
 3. FINDLAY, G. M. e CLARKE, L. P.: *J. Path. and Bact.*: 40, 55, 1935.
 4. BEEUWKES, H.: *Recents Studies in Yellow Fever — Conferência da Febre Amarela*. Dakar, 23 de abril - 1.º de maio de 1928.
 5. THEILER, M.: *Ann. Trop. Med. Parasitol.*: 24, 249, 1930.
 6. MARCHOUX, E.: *C. R. Acad. Sc.*: 187, 260, 1928.
 7. ARAGÃO, H. B. e COSTA LIMA, A.: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*: 9 (supl.) 133, 1929.
 8. FINDLAY, G. M. e Mc CALLUM, F. O.: *J. Path. and Bact.*: 49, 53, 1939.
 9. BAUER, J. H. e HUDSON, N. P.: *Am. J. Trop. Med.*: 8, 371, 1928.
 10. PELTIER, M., DURIEUX, C., JONCHÈRE, H. e ARQUIÉ, E.: *Bull. Acad. Med. Paris*: 121, 657, 1939.
-