INSTITUTO DE HYGIENE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE HYGIENE E SAUDE PUBLICA DO ESTADO
DIRECTOR: PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

BOLETIM N.º 62

« PROVA DE PROTECÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMONDONGO,
COM O VIRUS ISOLADO EM SÃO PAULO
DE UM CASO DE FEBRE AMARELLA SILVESTRE »

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

EDIÇÃO OFFICIAL

1 9 3 8
IMPRESA OFFICIAL DO ESTADO
SAO PAULO

Trabalho do Instituto de Hygiene de São Paulo

PROVA DE PROTECÇÃO INTRA-CEREBRAL
EM CAMONDONGO, COM O VIRUS ISOLADO EM
SÃO PAULO DE UM CASO DE FEBRE AMARELLA
SILVESTRE (*)

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO
1.º Assistente

E' idéa classica e já mais que secular que um ataque de febre amarella produz immuidade permanente.

O sôro dos doentes que se curam de febre amarella adquire propriedades preventivas.

Um processo de laboratorio para evidenciar esta immuidade pelas propriedades preventivas que adquire o sôro desses doentes, permite que se faça o diagnostico retrospectivo do mal amarillico.

Verificação nesse sentido foi feita por STOKES, BAUER e HUDSON (1928) (1) que mostraram poder o *Macacus rhesus* ser protegido contra a innoculação do virus pela injeção mesmo de 0,1c.c. de sôro de convalescente.

Esta neutralização do virus com sôro de convalescente é conhecida por "prova de protecção" e foi iniciada, portanto, em *Macacus rhesus*, primeiro animal descoberto como bem sensível ao virus amarillico.

Com a prova de protecção é possível determinar se houve ou não febre amarella em uma região durante a vida da geração actual. Ha, a respeito, a verificação de SAWYER (1931), mostrando que a sôroprotecção se manifesta até 80 annos após a molestia. Pode-se com ella determinar o tempo e a extensão dessa infecção, assim como solucionar um caso de duvida entre febre amarella e outra molestia de syntoma-

(*) Trabalho apresentado á Sociedade de Biologia de São Paulo. Sessão de 8 de maio de 1937.

tologia semelhante; também verificar se as pessoas vacinadas pelos diversos métodos propostos ficam ou não imunizadas; serve ainda para as provas de imunidade cruzada, indispensáveis na identificação do vírus e pelas quais pode ser confirmada a identidade entre os vírus africano e americano da febre amarela.

A descoberta, em 1930, por M. THEILER (2), da Universidade de Harvard, demonstrando a susceptibilidade do camondongo branco ao vírus da febre amarela, concorreu de maneira notável para o desenvolvimento do estudo experimental dessa moléstia.

Antes de THEILER, foram feitas pesquisas para verificar se o camondongo branco era susceptível ao vírus amarílico, dando resultados negativos as inoculações subcutâneas, intramusculares e intraperitoneas. THEILER verificou que a “raça franceza” do vírus amarílico africano pôde infectar o camondongo em inoculação intracerebral, o que se não observa quando a inoculação é feita por outras vias; e que essa inoculação intracerebral produzia uma encefalite específica transmissível em série nesse animal.

Observou THEILIER que a febre amarela no camondongo é diferente da do macaco. No camondongo o vírus é neurotrópico, apresentando uma encefalite com as respectivas lesões e principalmente inclusões intramusculares das células ganglionares; no macaco elle é viscerotrópico.

SELLARDS (1931) e ainda LLOYD e PENNA (1933) (3) mostraram que este vírus adaptado ao cérebro de camondongos, quando inoculado em *Macacus rhesus* por via cerebral produzia também uma encefalite nesses animais; o que se não observava quando pela mesma via era inoculado o vírus neurotrópico. Contudo, PENNA (4), recentemente, conseguiu produzir encefalite em *Macacus rhesus* com o vírus viscerotrópico da febre amarela, inoculando-o no cérebro desses animais previamente injectados no peritônio com soro amarílico imune.

THEILER, no seu trabalho original, apresentado em 1930, revelou a um só tempo a sensibilidade do camondongo ao vírus amarílico e a possibilidade de ser feita prova de protecção nesse animal: misturando soro imune e vírus em partes iguais e injectando a mistura no cérebro de camondongos, notou neutralisação parcial ou completa desse vírus tanto pelo soro de macacos imunes á febre ama-

rella, como pelo sôro humano de pessoas naturalmente infectadas, sôros estes provindos do Brasil, Africa e Colombia.

Esses resultados, contudo, não foram muito claros, principalmente devido á grande quantidade de virus usada nas provas.

Em trabalho publicado em 1931, THEILER (5) procura melhorar a sua prova de protecção intracerebral. Experimenta 13 sôros de convalescentes de febre amarella com o virus diluido a 1/10 e 1/100, empregando ainda como diluente apenas a agua physiologica. Misturas em partes iguaes de sôro e diluição do virus eram injectadas no cerebro de camondongos, em grupos de 6. Embora ainda um pouco irregulares, o melhor resultado foi obtido nas misturas com o virus a 1/100.

J. E. DINGER (1931) confirmou esta verificação de THEILER, mas em lugar de usar a suspensão de virus apenas centrifugada, mostrou a importancia da sua filtração previa.

Em 1933 THEILER (6), corrigindo os defeitos das suas technicas anteriores, obteve melhores e mais regulares resultados.

Em primeiro lugar empregou como diluente do virus agua physiologica com 10% de sôro humano normal, isto de accordo com as experiencias de BAUER e MAHAFFY (7) que já haviam averiguado que o virus morria rapidamente quando suspenso em agua physiologica, resistindo muito mais quando ao diluente juntava-se, no minimo, essa quantidade de sôro.

Como um cerebro pode ter mais virus que um outro, empregou no preparo do virus diversos cerebros de camondongos nitidamente doentes do quarto ao quinto dia após a injeção intracerebral. Esses cerebros eram bem triturados com o diluente e a suspensão centrifugada durante meia hora a 2.500 rotações por minuto. Em seguida fazia diluições desse virus a 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000 ás quaes juntava partes iguaes dos sôros a examinar, puros ou diluidos, injectando as misturas no cerebro de camondongos, na quantidade de 0,03c.c., empregando para cada diluição de virus ou de sôro um grupo de seis camondongos.

THEILER só conta como mortos por infecção amarillica os camondongos que morrem do quarto ao decimo dia, nunca

tendo observado morte antes do quarto dia mesmo com as mais virulentas fontes de virus amarillico.

Nesse seu trabalho, THEILER considera como dose minima mortal do virus, a menor quantidade que injectada nessas condições no cerebro de camondongos mata a metade delles do quarto ao decimo dia, tendo observado que geralmente essa minima mortal varia de 1/100.000 a 1/200.000. Na maioria dos casos essa minima mortal foi de 1/200.000.

Nota-se, nos seus quadros, que nas provas de protecção com o virus diluido a 1/1000 e 1/10000 os resultados foram bons, com uma partida de virus cuja dose minima mortal foi de 1/100.000. Aconselha como boa quantidade de virus para a prova, que nos 0,03c.c. da mistura sôro mais virus a injectar no cerebro dos camondongos cada um receba mais ou menos trinta e duas doses minimas mortaes.

*
* *
*

No vale do Canaan, Estado do Espirito Santo, Brasil, em março de 1932, SOPER (8) e seus collaboradores da Fundação Rockefeller observaram e estudaram um surto epidemico produzido por um novo typo de febre amarella, que descreveram como "febre amarella rural sem *Aedes aegypti*". A identificação dessa epidemia foi por elles feita pelas observações clinicas, autopsias, provas de protecção e isolamento do virus.

Em nota previa apresentada á Sociedade de Biologia de São Paulo (9), em abril deste anno, tivemos occasião de discutir os resultados dos exames por nós feitos dos sangues que nos tinham sido enviados de casos suspeitos de febre amarella sylvestre em surto epidemico irrompido em diversas localidades do Estado.

A pedido da Directoria do Serviço Sanitario do Estado e para esclarecimento do surto epidemico então observado, cujos doentes eram encontrados entre os que trabalhavam no interior das mattas ou na sua derrubada ou que moravam na sua proximidade, procuramos isolar o virus do sangue desses doentes, o que conseguimos, e iniciamos os estudos para a sua identificação ao da febre amarella, identificação esta até então só feita pela Fundação Rockefeller.

Tendo isolado diversas fontes de virus e não dispondo

na occasião de *Macacus rhesus*, seccamos algumas fontes e continuamos a fazer passagens intra-cerebraes, no camondongo, de uma dellas.

Tentamos verificar se um dos virus por nós isolado (o do doente P. B., n.º 2), que se encontrava em 6.^a passagem no cerebro de camondongos, matando-os uniformemente, seria neutralizado por um sôro amarillico imune de maneira identica ao virus amarillico neurotropico, fazendo a experiencia em uma prova de protecção intra-peritoneal.

A prova de protecção intra-peritoneal proposta por SAWYER e LLOYD (10) (que apenas soffreu pequenas modificações) é a prova hoje universalmente adoptada, cujos resultados são uniformes e claros, como demonstraram milhares de sôros já examinados por essa technica.

Como estudo preliminar fizemos seguindo a technica de SAWYER e LLOYD, duas provas em dois grupos de seis camondongos: uma, com a emulsão do virus do doente n.º 2 (6.^a passagem) mais sôro normal; outra, com o virus neurotropico da febre amarella F 503 (*) mais o mesmo sôro normal. Irritamos o cerebro dos comondongos com a solução de amido e innoculamos essas misturas de sôro-virus no peritoneo. Resultado: morreram todos os camondongos da prova com o virus neurotropico F 503, e, nenhum do grupo com o virus do doente n.º 2.

Esse factó é perfeitamente explicavel. O nosso virus, então em 6.^a passagem intra-cerebral, ainda não tinha accentuado o seu neurotropismo. Injectado no peritoneo e irritado o cerebro, nelle ainda não se fixava como o virus neurotropico (com 503 passagens) que, com o seu neurotropismo exaltado por um grande numero de passagens intracerebraes vae fixar-se no cerebro irritado, onde produz a encephalite mortal.

Não sendo o virus da febre amarella pathogenico para o camondongo adulto na innoculação intra-peritoneal, se o seu neurotropismo não estiver exaltado por diversas passagens intra-cerebraes elle não matará os camondongos, mesmo nas condições da irritação prévia do cerebro.

(*) Este virus nos foi fornecido em estado seco pela Fundação Rockefeller com a indicação F 503. A secagem foi feita no seu laboratorio da Bahia, em 4 de dezembro de 1936. Foi por nós aberto um tubo desse virus em 5-V-937. Os cerebros dos camondongos doentes da 4.^a passagem intra-cerebral desse virus serviram para a prova.

Teríamos que esperar algum tempo ainda fazendo mais passagens do nosso virus no cerebro de camondongos.

Lembramo-nos, então, de fazer a prova por via intracerebral, pois o virus por nós isolado já matava uniformemente todos os camondongos innoculados por essa via.

Para esse fim servimo-nos da ultima technica de MAX THEILER, acima resumida.

Fizemos provas parallelas com o virus por nós isolado e com o virus africano neurotropico da febre amarella, F 503.

Empregamos os seguintes sóros nas provas: I.P.113, sôro imune amarillico; N.P.110, sôro normal. Estes sóros, com as respectivas indicações, nós os recebemos da Fundação Rockefeller, que os usa em suas provas de protecção, como testemunhas do seu bom funcionamento.

As provas foram feitas no mesmo dia, com as mesmas partidas de virus e em tudo seguindo a ultima technica proposta por THEILER.

Como não sabiamos qual a minima mortal do nosso virus, para tomal-a como base na prova, resolvemos na mesma experiencia medir a sua virulencia em confronto com o virus neurotropico, diluindo ambos os virus a 1/100, 1/1000, 1/10.000 e 1/100.000.

As diluições de cada um desses virus foram misturadas com partes iguaes dos sóros imune e normal que acabamos de citar e incontinentemente enjectadas na quantidade de 0,03c.c., nos cerebros dos camondongos (grupos de cinco).

Vemos a seguir o comportamento da prova com o virus por nós isolado de um caso de febre amarella sylvestre.

Provas de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/100

Grupo de camandongos 117	19	21	23	25	27	29	31	2							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Soro normal (N. P. 110)	1					d	+								
	2					d	+								
	3					/	m	+							
	4					/	m	+							
Data: 19-V-937	5					/	d	d	m	+					

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (15.ª passagem)

Provas de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/1.000

Grupo de camandongos 118	19	21	23	25	27	29	31	2							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Soro normal (N. P. 110)	1					/	d	+							
	2						d	m	m	+					
	3						d	m	m	+					
	4						/	d	d	+					
Data: 19-V-937	5					/	d	d	+						

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (15.ª passagem)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/10.000

Grupo de camandongos 119	19		21		23		25		27		29		31		2
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1							d	+							
Sêro normal (N. P. 110)	2						/	m	m	+					
	3						/	m	m	m	+				
	4							d	d	m	+				
Data: 19-V-937	5							d	d	m	m	+			

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (15.ª passagem)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/100.000

Grupo de camandongos 120	19		21		23		25		27		29		31		2
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	13
1								d	d	+					
Sêro normal (N. P. 110)	2							d	d	+					
	3							d	d	m	+				
	4								/	m	+				
Data: 19-V-937	5								/		/				

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (14.ª passagem)

Signaes :

- / suspeito de doente
- d doente
- m moribundo
- + morto
- ≠ sacrificado para passagem

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/10.000

Grupo de camandongos 119	19		21		23		25		27		29		31		2
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sêro normal (N. P. 110)	1						d	+							
	2						/	m	m	+					
	3						/	m	m	m	+				
	4							d	d	m	+				
Data: 19-V-937	5							d	d	m	m	+			

Fonte de vírus: Doente P. B. n.º 2 (15.^a passagem)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/100.000

Grupo de camandongos 120	19		21		23		25		27		29		31		2
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sêro normal (N. P. 110)	1							d	d	+					
	2							d	d	+					
	3							d	d	m	+				
	4								/	m	+				
	Data: 19-V-937	5							/		/				

Fonte de vírus: Doente P. B. n.º 2 (14.^a passagem)

Signaes:

- / suspeito de doente
- d doente
- m moribundo
- +
- ⊕ morto
- ⊕ sacrificado para passagem

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/100

Grupo de camandongos 114	19	21	23	25	27	29	31	2							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Soro immune positivo (I. P. 113)	1														
	2														
	3														
	4														
Data: 19-V-937	5														

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (15.ª passagem)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/1.000

Grupo de camandongos 115	19	21	23	25	27	29	31	2							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Soro immune positivo (I. P. 113)	1														
	2														
	3														
	4														
Data: 19-V-937	5														

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (15.ª passagem)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus silvestre (S. Paulo) diluído a 1/10.000

Grupo de camandongos 116	19	21	23	25	27	29	31	2							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Soro immune positivo (I. P. 113)	1														
	2														
	3														
	4														
Data: 19-V-937	5														

Fonte de virus: Doente P. B. n.º 2 (15.ª passagem)

Nas fichas acima pode-se observar o seguinte: na prova com soro normal, a morte de todos os camundongos até a ultima diluição do virus a 1/100.000, onde apenas um escapou; na com soro amarillico imune, feita com o virus nas diluições de 1/100, 1/1.000 e 1/10.000, neutralização completa do virus, sobrevivendo todos os camundongos. Verifica-se ainda um periodo de incubação maior nas innoculações com menos virus: maioria de camundongos doentes no 5.º dia com o virus a 1/100, no 6.º dia a 1/1.000, no setimo a 1/10.000 e no 8.º a 1/100.000. Em sua quasi totalidade os camundongos morreram do quinto ao decimo dia, (melhor espaço de tempo estabelecido para morrerem os camundongos innoculados com o virus amarillico) e após um a quatro dias de doença, apresentando diversos entre elles paralyisia das patas posteriores.

A dose minima mortal desse virus deve ser um pouco maior de 1/100.000, se a quizermos determinar pela technica de THEILER, como vimos acima.

Para contróle fizemos na mesma occasião prova identica com os mesmos sôros, mas com o virus neurotropico da febre amarella F 503, isolado em Dakar, conhecido pela denominação de “raça franceza”.

Damos a seguir as fichas dessas provas:

Prova de protecção intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/100

Grupo de camundongos 125	21	23	25	27	29	31	2	4							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sôro normal (N. P. 110)	1			/	d	+									
	2			/	d	+									
	3				d	+									
	4				d	d	+								
	5					d	m	+							

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/1.000

Grupo de camundongos 126	21	23	25	27	29	31	2	4							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sôro normal (N. P. 110)	1				d	+									
	2				d	m	+								
	3				/	m	+								
	4					d	+								
	5					/	m	+							

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/10.000

Grupo de camundongos 127		21		23		25		27		29		31		2		4
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sêro normal (N. P. 110)	1					/	+									
	2						+									
	3						d	+								
	4						/	+								
Data: 21-V-937	5					/	d	+								

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/100.000

Grupo de camundongos 128		21		23		25		27		29		31		2		4
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sêro normal (N. P. 110)	1						d	+								
	2						d	+								
	3						d	d	+							
	4							d	+							
Data: 21-V-937	5							m	+							

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/100

Grupo de camandongos 122		21		23		25		27		29		31		2		4
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sôro immune positivo (I. P. 113)	1													+		
	2															
	3															
	4															
	5															

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

Prova de protecção Intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/1.000

Grupo de camandongos 123		21		23		25		27		29		31		2		5
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sôro immune positivo (I. P. 113)	1															
	2															
	3															
	4															
	5															

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

Prova de protecção intra-cerebral
Virus africano diluido a 1/10.000

Grupo de camandongos 124		21		23		25		27		29		31		2		4
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sôro immune positivo (I.P.113)	1															
	2															
	3															
	4															
	5															

Fonte de virus: F 503 (virus neurotropico)

O resultado foi praticamente identico ao obtido com o virus sylvestre.

Nas misturas com sôro normal morreram todos os camondongos innoculados mesmo na ultima diluição do virus, a 1/100.000. O periodo de incubação foi menor apenas um dia. Os camondongos morreram após um a dois dias de doença apresentando maior numero com paralyisia dos membros posteriores. Os camondongos innoculados com menores quantidades de virus morreram após menos dias de doença, geralmente ficavam doentes num dia e amanheciam mortos no outro.

Nas misturas com sôro imune amarillico houve neutralização completa do virus em todas as suas diluições, apenas tendo amanhecido um camondongo morto no decimo primeiro dia com o virus diluido a 1/100.

Portanto, nas provas que acabamos de fazer, o virus por nós isolado de um caso de febre amarella sylvestre e o virus neurotropico da febre amarella ou "raça franceza", isolada em Dakar (F 503), portaram-se de maneira identica, sendo ambos neutralizados pelo mesmo sôro imune amarillico.

RESUMO E CONCLUSÕES

O A. fez duas series de provas de protecção intra-cerebraes, em camondongos, seguindo a technica apresentada por MAX THEILER em 1933: Uma, empregando o “virus neurotropico” denominado “raça franceza” (F 503), isolado em Dakar; outra, com o virus isolado pelo A. em São Paulo, de um caso de febre amarella sylvestre da ultima epidemia.

As duas provas foram feitas com os mesmos sôros, fornecidos pela Fundação Rockefeller: I.P. 113-sôro imune amarillico verificado positivo em prova de protecção intraperitoneal; N. P. 110-sôro normal verificado negativo.

Cada série de provas foi feita com sete grupos de 5 camondongos.

O virus neurotropico da febre amarella foi fornecido ao A. em estado secco pela Fundação Rockefeller, com a indicação F 503.

A outra serie de provas foi feita com o virus isolado pelo A., na ocasião na 15.^a passagem intra-cerebral em camondongos.

As provas deram resultados iguaes com os dois virus.

Nas provas *com sôro normal*, o resultado foi o seguinte: com a raça neurotropica da febre amarella morreram todos os camondongos inoculados com o virus nas diluições feitas (1/100, 1/1.000, 1/10.000 e 1/100.000); *com o virus sylvestre*, isolado em São Paulo, o resultado praticamente foi o mesmo, pois só no grupo inoculado com a diluição do virus a 1/100.000 escapou um camondongo dos cinco inoculados.

As provas *com sôro imune amarillico* foram feitas com os virus nas diluições de 1/100, 1/1.000 e 1/10.000. Em todas estas diluições, tanto com o virus neurotropico como com o sylvestre, houve neutralização de ambos, sendo as provas de protecção igualmente positivas.

Os dois virus até a diluição de 1/100.000, ultima experimentada, mostraram-se de virulencia approximadamente igual.

Os camondongos, nas provas com sôro normal, morreram do 5.º ao 10.º dia, em sua quasi totalidade, portanto, no melhor espaço de tempo estabelecido para essas provas.

Nessas provas ainda poude o A. observar o seguinte: a) com o virus sylvestre (15.^a passagem) foi maior o periodo de incubação, apresentando-se os camondongos doentes no 5.º dia com o virus diluido a 1/100, ao passo que, com o virus africano neurotropico (503 passagens) em diluição idêntica, já se apresentavam dois camondongos suspeitos no terceiro e quatro doentes no 4.º dia; b) quanto mais diluidos os virus, maior o periodo de incubação; c) com o virus africano os camondongos morreram após um a dois dias de doença, sendo que, com o virus sylvestre, alguns após tres a quatro dias; d) com a raça neurotropica os camondongos innoculados com menores quantidades de virus morreram após menos dias de doença; com o virus sylvestre, em sua 15.^a passagem, este ultimo facto não poude ser observado.

As pequenas diferenças no comportamento desses virus nos camondongos, segundo o A., devem correr por conta principalmente do numero desigual de passagens entre esses dois virus no cerebro de camondongos.

O virus neurotropico da febre amarella “raça franceza” (F 503), e o virus isolado em S. Paulo, pelo A., de um caso de febre amarella sylvestre, mostraram, nas provas apresentadas, identidade immunologica, sendo ambos igualmente neutralizados pelo mesmo sôro amarillico imune.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The A. made two series of intracerebral protection tests on mice, using the technique described by MAX THEILER in 1933: one with the neurotropic virus called "French strain (F 503) isolated at Dakar; the other with virus isolated in S. Paulo, by the Author, from a case of jungle yellow fever, from last epidemic.

Both tests were made with the same serum furnished by the Rockefeller Foundation: I.P.113 — yellow fever immune serum, proved positive by intraperitoneal protection test; N.P.110 — negativé tested normal serum.

Each series of tests was made on seven groups of five mice.

The neurotropic yellow fever virus was given to the A. by the Rockefeller Foundation under dried form, as F. 503.

The other series of tests was made with virus isolated by the author, on its 15th. intracerebral transfer on mice.

The tests gave identical results with both viruses.

In tests with *normal serum* the result was as follows: with the neurotropic yellow fever strain all the inoculated mice died, when the following dilutions were used (1/100, 1/1.000, 1/10.000 and 1/100.000): with the *jungle virus* isolated in S. Paulo the results were practically the same, for only in the groups inoculated with a virus dilution of 1/100.000 did one mouse escape death.

The tests with *immune yellow fever serum* was made with virus in the following dilutions 1/100, 1/1.000, 1/10.000. There was neutralization in all these dilutions, both with the neurotropic and the jungle virus, and the protection tests were also positive.

In these tests the A. observed also: a) the period of incubation was longer with the jungle virus (15th. transfer) since the mice became sick on the 5th. day with virus dilu-

ted to 1/100, while with the neurotropic African virus in identical dilution, 2 mice looked suspicious on the 3rd., and 4 mice were sick on the 4th. day; b) the more diluted the virus, the longer the period of incubation; c) with the African virus the mice died after one or two days of sickness, while with the jungle virus some died after three to four days; d) with the neurotropic strain the mice inoculated with smaller amounts of virus died after fewer days of sickness; this last fact could not be observed with the jungle virus in its 15th. transfer.

The A. believes that the small differences noted in the behaviour of these viruses on mice, should depend principally on the unequal number of transfers of these viruses in the brain of mice.

The yellow fever neurotropic virus "French strain (F 503) and the virus isolated in S. Paulo by the A. from a case of jungle yellow fever revealed in the aests used immunological identity, both being equally neutralized by the same immune yellow fever serum.

BIBLIOGRAPHIA

- (1) STIOKES, A., BAUER, J. H., and HUDSON.
1928 — Experimental transmission of yellow fever to laboratory animal. *Amer. Jour. Trop. Med.* Vol. VIII.
- (2) THEILER, M.
1930 — Studies on the action of yellow fever virus in mice. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* Vol. XXIV.
- (3) LLOYD, W., and PENNA, H. A.
1933 — Studies on the pathogenesis of neurotropic yellow fever virus in *Macacus rhesus*. Vol. XIII.
- (4) PENNA, H. A.
1936 — The production of encephalitis in *Macacus rhesus* with viscerotropic yellow fever virus. *The Am. Jour. of Trop. Med.* Vol. XVI.
- (5) THEILER, M.
1931 — Neutralisation tests with immune yellow fever sera and a strain of yellow fever virus adapted to mice. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* Vol. XXV.
- (6) THEILER, M.
1933 — A yellow fever protection test in mice by intracerebral injection. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* Vol. XXVII.

- (7) BAUER, J. H., and MAHAFFY, A. F.
1930 — Studies on the filtrability of yellow fever virus. The Amer. Jour. of Hyg. Vol. XII.
- (8) SOPER, F. L., PENNA, H., CARDOSO, E., SERAFIM, J., FROBISHER, M., and PINHEIRO, J.
1933 — Yellow fever without *Aedes aegypti*. Study of a Rural Epidemie in the Valle do Chanaan, Espirito Santo, Brasil, 1932. A Jour. Hyg. Vol. XVIII.
- (9) ASSUMPÇÃO, L.
1937 — O virus isolado dos doentes de febre amarella sylvestre que ora se observa no Est. de S. Paulo. Soc. de Biol. de S. Paulo. Sessão 8-IV-937. (Nota previa).