

INSTITUTO DE HIGIENE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO  
DIRETOR: PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

## BOLETIM N. 81

**Algumas provas de imunização e neutralização cruzadas entre o virus neurotrópico de febre amarela clássica e o virus isolado de doentes de febre amarela silvestre na epidemia de 1936-1937, no Estado de São Paulo**

**DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO**  
Chefe de Serviço do Instituto de Higiene de São Paulo

1943

Provas de imunização e neutralização  
cruzadas entre o virus neurotrópico  
da febre amarela clássica e o virus isolado  
de doentes de febre amarela silvestre na  
epidemia de 1936-1937, no E. S. Paulo. (\*)

---

**DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO**  
CHEFE de SERVIÇO do INSTITUTO  
DE HIGIENE DE SÃO PAULO.

---

---

(\*) — Trabalho apresentado à Associação Paulista de Medicina (Seção de Higiene e Medicina Tropical), em 4-8-1943.

# Provas de imunização e neutralização cruzadas entre o vírus neurotrópico da febre amarela clássica e o vírus isolado de doentes de febre amarela silvestre na epidemia de 1936-1937, no Estado de São Paulo. (\*)

---

**DR. LUCAS DE ASSUMPCÃO**

CHEFE de SERVIÇO do INSTITUTO  
DE HIGIENE DE SÃO PAULO

---

Após o aparecimento no Vale do Canaan, município de Santa Tereza, Estado do Espírito Santo, em março de 1932, de uma nova modalidade de febre amarela, estudada por SOPER (1) e seus colaboradores e denominada febre amarela silvestre, surgiu uma epidemia de enfermidade idêntica no Estado de S. Paulo, nos anos de 1936 e 1937.

A febre amarela silvestre foi descrita como sendo a febre amarela das zonas rurais, silvestres e fluviais, mas sem o concurso do *Aedes aegypti*. Encontrada principalmente no interior das matas ou em suas proximidades, ela é extra-domiciliar, não sendo o homem o fator de importância na permanência do seu estado endêmico ou na disseminação do vírus; por consequência apresenta quadro epidemiológico diferente do da febre amarela urbana e mesmo rural cujo transmissor é o *Aedes Aegypti*. Nestas a doença é essencialmente domiciliária e o homem fator importante na sua manutenção, que depende do ciclo homem-mosquito-homem.

Entre nós existem clínicos, higienistas e bacteriologistas que não acreditam na identidade etiológica dessas duas moléstias.

BRUNO RANGEL PESTANA (1938) (2) em seu erudito trabalho "Considerações epidemiológicas a respeito da febre amarela silvestre", conclue com as seguintes palavras: "Das considerações feitas por nós e no estado atual da ciência, podemos concluir que a moléstia que hoje reina no Estado de S. Paulo, não é a mesma febre amarela clássica não devendo, portanto, ser registrada no nosso obituário como tal". O A. achou insuficientes as provas apresentadas para que se pudesse afirmar a identidade da febre denominada febre amarela silvestre com a febre amarela clássica.

Nesse trabalho diz ainda BRUNO RANGEL PESTANA "Nada conhecemos publicado a respeito das qualidades do vírus da febre amarela silvestre e da sua relação da imunidade cruzada com o vírus da febre amarela clássica".

---

(\*) — Trabalho apresentado à Associação Paulista de Medicina (Seção de Higiene e Medicina Tropical), em 4-8-1943.

“A não ser as ligeiras referências feitas por Soper e as de agora por Lucas de Assumpção, do Instituto de Higiene, que em nota prévia comunica ter isolado um vírus de doente da zona onde reina, no Estado de São Paulo, a moléstia chamada por Soper de febre amarela silvestre, nada encontramos na literatura sobre os vírus isolados como sendo fator etiológico da febre amarela silvestre, no que concerne às relações de imunidades cruzadas, para prova de identidade do vírus”.

De fato, por se tratar de uma nova modalidades da febre amarela, seria conveniente que se publicasse alguma cousa sobre esse vírus, o que se não tem feito até esta data.

Para a identificação de um vírus é preciso em primeiro lugar estudar as suas propriedades gerais, filtrabilidade nas diversas velas e nas membranas de colódio, ultrafiltração em membranas graduadas; a sua conservação, resistência e ação sobre ele dos antissépticos etc.. Passar em seguida ao estudo das lesões específicas, podendo as lesões histopatológicas caracterizar um vírus. Inocular esse vírus em variadas espécies de animais e de diferentes modos; fazer provas de imunidade com diversos vírus semelhantes e, entre as mais importantes de todas, — as provas de imunidade cruzada.

SOPER e seus colaboradores, ao apresentarem a moléstia silvestre descoberta no Vale do Canaan, identificaram perfeitamente o mal, como sendo febre amarela, pelas suas manifestações clínicas, anatomopatológicas e pelo isolamento do vírus em macacos e camondongos. Se não publicaram estudos minuciosos sobre todas as propriedades do vírus isolado foi — a nosso ver — por julgarem desnecessário, visto terem verificado que o vírus isolado dos doentes de febre amarela silvestre era idêntico ao da febre amarela clássica.

Quanto à doença, não há, praticamente, diferença entre a febre amarela clássica e a febre silvestre. Como disse Aragão (3) “O consenso quasi geral dos médicos que têm observado cuidadosamente a moléstia silvestre e especialmente daqueles que lidaram com a antiga febre amarela das cidades, em outros tempos, é que a moléstia silvática não se diferencia da urbana transmitida pelo estegomya, quer pelas suas manifestações clínicas, quer pelas lesões anatomo e histopatológicas, ou pelas reações de imunidade etc., e que tão somente a epidemiologia é muito diferente num e noutro caso. Há quem alegue ser a moléstia silvestre mais benigna que a antigamente verificada nas cidades, o que a observação dos surtos atuais não justifica muito e, mesmo que assim sucedesse, não seria argumento decisivo para se considerar, só porisso, as moléstias diversas, da mesma forma que não são diferentes a escarlatina e a difteria no Rio e São Paulo, embora sejam muito mais benignas na primeira do que na segunda dessas cidades”.

Quanto ao estudo anatomo-patológico das lesões apresentadas pelo fígado nos casos de febre amarela silvestre, o DR. JOÃO MONTENEGRO (4), no Instituto Bacteriológico de S. Paulo, onde examinou cento e oitenta e dois fígados suspeitos dessa moléstia, chegou ao seguinte resultado: “Concluimos que as lesões hepáticas da febre amarela silvestre são idênticas às da febre amarela urbana”.

No surto epidêmico de febre amarela silvestre que ocorreu no Estado de São Paulo, em 1936-37, tivemos ocasião de isolar, de doentes suspeitos, um vírus que se comportou em camundongo como o vírus da febre amarela clássica: não patogênica para esses animais em inoculações subcutânea e intraperitônioal, mas neles produzindo encefalite mortal quando inoculado no cérebro. Não se mostrou também patogênico para coelho e cobaias quando inoculado no peritônio ou sob a pele. Este vírus só era isolado do sangue dos doentes nos

primeiros dias da doença, sangue que se mostrava esteril nos diversos meios aeróbios e anaeróbios semeados. Verificamos a sua filtrabilidade em velas Berkefeld, Chamberland e filtros Zeits.

Logo com a primeira fonte obtida desse virus, isolada em 10-VIII-1937, do doente P. B. de Rocinha, fizemos — como se vê em nosso trabalho anterior (5) — provas imunitárias que já nos permitiram supor tratar-se do virus da febre amarela: o virus isolado desse doente foi neutralizado por um soro amarelíco imune fornecido pelo Rockefeller (I. P. 113) e tambem por outro soro imune de uma das pessoas por nós vacinada no Instituto de Higiene (\*) com o virus neurotrópico da febre amarela; de outro lado, o soro desse doente, após restabelecimento, neutralizou o virus neurotrópico da febre amarela, como pode ser visto nos protocolos das provas de proteção desse nosso trabalho (loc. cit.). Isso quer dizer que fizemos com o virus da febre amarela e aquele por nós isolado em São Paulo, uma verdadeira prova de imunidade cruzada.

Tambem, em prova de proteção intracerebral (6) tivemos ocasião de verificar que um soro imune amarelíco neutralizou, em idênticas condições, o virus neurotrópico da febre amarela e o virus isolado do nosso doente P. B. n.º 2.

Para completar os estudos que estavamos fazendo, entregamos, naquela época, ao Dr. P. C. ANTUNES, nosso companheiro de Instituto, virus isolado de dois casos, para que ele verificasse o seu comportamento em macacos rhesus; e nós nos incumbimos das provas de proteção, que constam do trabalho no qual mais tarde publicamos as provas de proteção feitas durante a epidemia (7).

Em nota apresentada à Soc. Paulista de Medicina (8) o Dr. Antunes conclue: "As experiências que acabamos de resumir sumariamente, evidenciam que o virus em questão se comporta de maneira idêntica ao da febre amarela urbana quando inoculado em rhesus". "O soro desses animais que antes da inoculação não continha anticorpos, após a mesma protegem os camundongos inoculados com o virus neurotrópico". "Além disso, a presença do virus foi evidenciada no sangue circulante dos animais, do 3.º ao 6.º dia após inoculação, matando os camundongos no prazo e com os sintomas que os mesmos apresentam quando injetados intracerebralmente com o virus urbano".

Nada mais conhecendo publicado sobre o assunto, resolvemos continuar os estudos sobre esse virus, pois conservamos até esta data, em nosso laboratório, as fontes isoladas dos doentes ns. 2, 8, 10 e 12.

Destas, a fonte P. I. R. n.º 12 é a mais importante, por ter falecido o doente e o exame histopatológico do fígado ter revelado o quadro da febre amarela, como se pode ver no primeiro trabalho que publicamos sobre o virus da febre amarela silvestre (loc. cit.).

## PARTE EXPERIMENTAL

### I — Imunização de camundongos, cobaias e coelhos.

#### 1) Amostras de virus:

- a) Virus neurotrópico da febre amarela clássica (F. 654).
- b) Fonte D 2, por nós isolada em 11-II-1937, do doente P. B., n.º 2, de Rocinha, suspeito de febre amarela silvestre. Deste doente, após o seu restabelecimento, foi-nos enviado soro para prova de proteção, que deu resultado positivo.

(\*) — Vacinas preparadas pela Fundação Rockefeller.

- c) Fonte D 12, por nós isolada em 3-IV-1937, do doente P. I. R. de Parnaíba, suspeito de febre amarela silvestre. Este doente faleceu, sendo positivo o exame histopatológico do fígado que revelou o quadro da febre amarela.

## 2) Imunização de camundongos:

Foram imunizados camundongos suíços, criados no Instituto de Higiene, com 40 dias de vida. Fazíamos 3 injeções intraperitoniais de vírus, com 10-13 dias de intervalo: 1.<sup>a</sup> injeção 0,5 cc. do vírus diluído a 1/15, 2.<sup>a</sup> e 3.<sup>a</sup> injeções 0,5 cc. da diluição a 1/10. O vírus empregado foi sempre suspensão em sol. fisiológica de cérebro de camundongo moribundo com encefalite.

Quinze dias após a última injeção eram usados nas provas para verificação da imunidade.

Apesar dos camundongos adultos geralmente serem insensíveis ao vírus da febre amarela inoculado no peritônio, por se conhecer, desde os estudos iniciais de THEILER (1930) que esses animais são susceptíveis ao vírus amarílico apenas quando este é inoculado no sistema nervoso, constatamos, nas nossas imunizações, a morte de diversos camundongos que não atribuímos a defeitos de técnica. Alguns apresentavam encefalite nítida, mostrando paralisia do trem posterior, com passagem positiva do material do cérebro, em inoculações intracerebrais em outros camundongos. Tratando-se de camundongos muito novos, é possível que neles ainda não estejam suficientemente desenvolvidas as barreiras que nos adultos impedem que o vírus circulante possa localizar-se no tecido nervoso. Em camundongos adultos, para se obter a encefalite mortal, tem-se que inocular o vírus diretamente no cérebro. Quando a inoculação é feita por via extraneural o vírus em circulação muito raramente produz encefalite, por se não localizar no tecido nervoso, a não ser que aí o flixemos pela inoculação preliminar de goma no cérebro, como se faz na prova de proteção intracerebral em camundongos.

## 3) Imunização de coelhos:

Os coelhos fazem parte dos animais que se mostram insensíveis ao vírus da febre amarela por qualquer via que seja inoculado. Assim também, entre outros, os seguintes animais: cavalo, asno, cachorro, gato, furão, etc..

Geralmente esses animais, que não reagem, apresentam o vírus no sangue circulante durante alguns dias, sendo de grande importância ainda o fato da inoculação de vírus nesses animais provocar a produção de anticorpos facilmente evidenciáveis pela prova do sero-neutralização. Quer se inocule nesses animais o vírus natural (pantrópico) como o vírus modificado (viscerotrópico e neurotrópico), aparecem os mesmos anticorpos e que são capazes de neutralizar indiferentemente qualquer desses vírus.

Foram tomados coelhos de 1.800 grs. a 2.000 grs. de peso. As inoculações para imunização foram feitas no peritônio, com intervalo de 13 dias, a 1.<sup>a</sup> com um cérebro de camundongo com encefalite, a 2.<sup>a</sup> com dois cérebros e a 3.<sup>a</sup> também com dois cérebros, sempre triturados em geral, com água fisiológica. Para se obter o soro usado nas provas a sangria era feita 30 dias após a última injeção. Nenhum coelho ficou aparentemente doente.

Para controle também imunizamos um coelho nas mesmas condições, mas injetando apenas cérebro de camundongo normal.

## 4) Imunização de cobaias:

As cobaias são insensíveis ao vírus da febre amarela inoculado por via extraneural. Mas STAFANOPOULO conseguiu infecção experimental inoculando o vírus neurotrópico por via cerebral. Também se consegue infecção

por essa via com o virus oriundo diretamente de macacos. Após inoculação intracerebral as cobaias apresentam moléstia comparavel a dos camondongos — sintomas de encéfalo-mielite. Mas a passagem de cobaia a cobaia vai diminuindo a virulência do virus, o contrário do que se observa nas passagens de camondongo a camondongo.

Tomamos cobaias de 350 a 400 grs. de peso, fazendo nelas três inoculações intraperitoneais, com intervalo de 13 dias. As doses foram de meio cérebro, um cérebro, e a última também de um cérebro.

As sangrias foram feitas 30 dias após a última injeção. Nenhuma ficou doente no correr da imunização.

## II — Provas de imunização cruzada.

Em uma primeira série de experiências tomamos 11 camondongos imunizados com o virus neurotrópico da febre amarela clássica F 654 e 18 camondongos normais, estes servindo de testemunhas e sendo da mesma idade (pouco mais ou menos três meses) dos imunizados. A mesma diluição do virus D 12 a 1/2000 foi inoculada nas duas séries de camondongos, inoculação intracerebral de 0,03 cc. — prova n.º 1. A prova n.º 2 é uma repetição da n.º 1, feita com

### QUADRO N.º 1

#### Provas em camondongos imunizados com o Virus Neurotrópico da Febre Amarela F 654.

N.º DAS PROVAS	PROVAS COM:	VIRUS		NÚMERO DE CAMONDONGOS	RESULTADOS		
		AMOSTRAS INOCULADAS	DILUIÇÕES DOS VIRUS INOCULADOS		N.º DE CAMONDONGOS MORTOS C/ENCEFALITE	N.º DE CAMONDONGOS SOBREVIVENTES	PERCENTAGEM DE SOBREVIVENTES
<b>RESISTENCIA AO VIRUS INOCULADO NO CÉREBRO *</b>							
1	CAMONDONGOS IMUNIZADOS c/ F 654	D 12	$\frac{1}{2000}$	11	0	11	100
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	D 12	$\frac{1}{2000}$	18	15	2	13
2	CAMONDONGOS IMUNIZADOS c/ F 654	D 12	$\frac{1}{2000}$	12	0	12	100
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	D 12	$\frac{1}{2000}$	12	11	1	8
3	CAMONDONGOS IMUNIZADOS c/ F 654	D 2	$\frac{1}{2000}$	10	2	8	80
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	D 2	$\frac{1}{2000}$	10	10	0	0
<b>RESISTENCIA AO VIRUS INOCULADO NO PERITONIO E GOMA NO CÉREBRO **</b>							
4	CAMONDONGOS IMUNIZADOS c/ F 654	D 12	15 %	7	0	7	100
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	D 12	15 %	6	6	0	0

\* Quantidade inoculada: 0,03 cc.  
 \*\* Inoculação intracerebral de 0,03 cc. de sol de goma a 2% e intraperitoneal de 0,4 cc de VIRUS a 15 %

12 camondongos imunizados e 12 normais. Ainda nesta primeira série de experiências fizemos a prova n.º 3 em que os camondongos imunizados com o virus F 654 são inoculados com o virus da fonte D 2 (10 camondongos imunizados e 10 testemunhas).

Como se vê no quadro n.º 1, em que resumimos essas provas, não morreu nenhum dos camondongos imunizados com o virus F 654 e inoculados com dose seguramente mortal do virus da fonte D 12, dose que matou, praticamente, 90% dos testemunhas.

Tambem os camondongos imunizados com o virus F 654 resistiram (80%) à inoculação do virus da fonte D 2, que matou todos os testemunhas. É o que se vê na prova n.º 3 do quadro 1.

Nestas primeiras provas verificamos a resistência de camondongos imunizados à inoculação intracerebral de virus, resultando que camondongos vacinados com o virus neurotrópico da febre amarela clássica ficam imunes às duas fontes D 12 e D 2 de virus isolado de dois doentes de febre amarela silvestre.

Na segunda parte do quadro 1 vemos o resumo de uma prova feita de maneira diferente: em 7 camondongos imunizados com o virus F 654 e 6 normais, inoculamos 0,03 cc. de uma sol. de amido a 2% no cérebro, e no peritônio 0,4 cc. do virus da fonte D 12 (suspensão a 15%), como se faz na prova de proteção intraperitonial (detalhes que podem ser vistos em nosso trabalho anterior, já citado). Nesta prova sobreviveram os camondongos vacinados tendo morrido todos os testemunhas com encefalo-mielite.

Do exposto e apresentado no quadro 1, podemos concluir: camondongos imunizados com o virus neurotrópico da febre amarela clássica F 654 ficam imunes às duas fontes D 12 e D 2 de virus isolado de doentes de febre amarela silvestre.

## QUADRO N.º 2

Provas <sup>em</sup> camondongos imunizados com a Fonte de Virus D 12 isolada de um caso de Febre Amarela Silvestre.

N.º DAS PROVAS	PROVAS COM:	VIRUS			RESULTADOS		
		AMOSTRA INOCULADA	DILUIÇÕES DOS VIRUS INOCULADOS	NÚMERO DE CAMONDONGOS INOCULADOS	N.º DE CAMONDONGOS MORTOS/ENCEFALITE	N.º DE CAMONDONGOS SOBREVIVENTES	PERCENTAGEM DE SOBREVIVENTES
<b>RESISTENCIA AO VIRUS INOCULADO NO CEREBRO</b>							
1	CAMONDONGOS IMUNIZADOS COM A FONTE D 12	F 654	$\frac{1}{5000}$	8	1	7	80
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	F 654	$\frac{1}{5000}$	8	8	0	0
<b>RESISTENCIA AO VIRUS INOCULADO NO PERITONIO E GOMA NO CEREBRO</b>							
2	CAMONDONGOS IMUNIZADOS COM A FONTE D 12	F 654	15 %	16	0	16	100
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	F 654	15 %	10	9	1	10

No quadro 2 são apresentadas outras experiências em que procuramos averiguar se haveria imunização cruzada entre esses virus.

Foram tomados camundongos imunizados com a fonte D 12 da febre amarela silvestre e verificamos a sua resistência à inoculação por via cerebral e peritonial do virus neurotrópico da febre amarela F 654, fazendo o inverso da experiência anterior.

Os resultados, como se vê no quadro 2, são claros: os camundongos imunizados com o virus F 654 resistiram à inoculação do virus da fonte D 12, tanto na prova intracerebral como na intraperitonial a que não resistem, em igualdade de condições, camundongos normais.

Podemos concluir haver imunização cruzada entre o virus neurotrópico da febre amarela clássica e a fonte de virus D 12 isolada de um doente de febre amarela silvestre.

Um terceiro grupo de provas foram feitas em camundongos imunizados com outra fonte de virus, também isolado de outro caso de febre amarela silvestre, a D 2, que acima vimos não ser capaz de infectar camundongos vacinados com F 654. . . Neles inoculamos, unicamente por via cerebral, em um grupo de camundongos, virus da fonte D 12, isolado de outro doente de febre amarela silvestre e, em outro grupo, o virus F 654.

O resumo dessas experiências, apresentado no quadro 3, nos mostra que camundongos vacinados com a fonte D 2 resistem à infecção das fontes D 12 e F 654 quando inoculados diretamente no cérebro, nas condições do nosso protocolo.

Portanto, pode-se concluir serem positivas as provas de imunização cruzada entre duas fontes de virus isoladas de dois casos de febre amarela silvestre e o virus neurotrópico da febre amarela clássica.

### III — Provas de neutralização cruzada.

As provas de neutralização foram feitas com soros de coelhos e cobaias imunizados, como vimos *ubi supra*. Verifica-se a ação viricida ou neutralizante de um soro imune misturado virus + soro e inoculando a mistura em animal sensível ao virus, o que se denomina prova de proteção. O soro protegerá ou não o animal inoculado com a mistura soro + virus, sendo indispensável prova testemunha feita com mistura de idêntica quantidade de virus e soro normal.

As provas de proteção com virus da febre amarela foram feitas a princípio no macaco, mas, depois que THEILER descobriu a sensibilidade dos camundongos a esse virus quando inoculado no cérebro, as provas passaram a ser feitas nestes animais.

Essas provas podem ser — intracerebrais ou intraperitoniais.

A prova intracerebral foi apresentada por THEILER (1930-31-33) (9-10-11) e a intraperitonial por SAWYER e LLOYD (1931) (12).

A prova intraperitonial é mais sensível e a ela demos preferência quando fizemos os estudos epidemiológicos da epidemia de febre amarela silvestre ocorrida em São Paulo, em 1937, estudos já publicados (loc. cit.).

As experiências deste trabalho foram feitas com provas intracerebrais, cujos detalhes da técnica estão descritos e comentados em estudos por nós feitos e publicado em 1938 (loc. cit.).

Para a execução das nossas atuais provas fizemos muitos ensaios com o fim de fixar a quantidade de virus a misturar com soro. É a parte mais difícil da prova de proteção intracerebral. Nesta prova o volume de soro + virus

## QUADRO N.º 3

Provas em camundongos imunizados com a Fonte de Virus D 2 isolada de um caso de Febre Amarela Silvestre.

(Resistência ao virus inoculado no cérebro)

N.º DAS PROVAS	PROVAS COM:	VIRUS		NÚMERO DE CAMONDONGOS INOCULADOS	RESULTADOS		
		AMOSTRAS INOCULADAS NO CEREBRO	DILUIÇÕES DOS VIRUS INOCULADOS		N.º DE CAMONDONGOS MORTOS C/ENCEFALITE	N.º DE CAMONDONGOS SOBREVIVENTES	PERCENTAGEM DE SOBREVIVENTES
1	CAMONDONGOS IMUNIZADOS COM A FONTE D 2	D 12	$\frac{1}{5000}$	10	0	10	100
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	D 12	$\frac{1}{5000}$	6	6	0	0
2	CAMONDONGOS IMUNIZADOS COM A FONTE D 2	D 12	$\frac{1}{5000}$	6	0	6	100
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	D 12	$\frac{1}{5000}$	6	6	0	0
3	CAMONDONGOS IMUNIZADOS COM A FONTE D 2	F 654	$\frac{1}{10000}$	17	2	15	88
	CAMONDONGOS NORMAIS PROVA TESTEMUNHA	F 654	$\frac{1}{10000}$	10	10	0	0

## QUADRO N.º 4

## PROVA DE PROTEÇÃO INTRACEREBRAL

Neutralização da Fonte D 2 do Virus de um doente de Febre Amarela Silvestre, pelos soros dos coelhos imunizados com o mesmo Virus, com a Fonte D 12 e com o Virus Neurotrópico da Febre Amarela Clássica F 654.

VIRUS 0,015 cc.	SÔROS 0,015 cc.	OBSERVAÇÃO DURANTE 14 DIAS														RESULTADO DAS PROVAS
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
FONTE D 2 A 1 1000	SÔRO NORMAL COELHO 147	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{0}{5}$							$\frac{0}{5}$ ★
	SÔRO COELHO 147 IMUNIZADO C/D 2	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{4}{5}$
	SÔRO COELHO 150 IMUNIZADO C/D 12	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$
	SÔRO COELHO 1 IMUNIZADO C/F 654	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$
	SÔRO COELHO 128 CONTROLE, INOCULADO C/ CEREBRO NORMAL DE CAMONDONGO	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{0}{5}$								$\frac{0}{5}$

O numerador indica o número de camundongos sobreviventes e o denominador o de camundongos inoculados na prova.

a injetar no cérebro dos camundongos é de 0,03 cc., isto é. 0,015 cc. de soro e 0,015 cc. da diluição do virus. É muito pequena a quantidade de soro para neutralizar um virus como o da febre amarela que, além de ser altamente neurotrópico para o camundongo, vai ser injetada diretamente no cérebro.

A nossa fonte de virus neurotrópico da febre amarela F 654 — que recebemos da Fundação Rockefeller — na ocasião em que fizemos este trabalho tinha a dose mínima mortal igual a 1/10.000.000, para camundongos. As fontes D 2 e D 12 apresentavam a D. M. M. igual a 1/1.000.000. As dosagens foram feitas inoculando-se no cérebro 0,03 cc. de diluições decimais do virus, cada diluição em uma série de cinco camundongos e considerando D. M. M. a maior diluição que matava mais da metade dos camundongos inoculados.

O primeiro grupo de provas de neutralização foi feito com a fonte do virus D 2, isolada de um caso de febre amarela silvestre, com os seguintes soros: a) soros normais obtidos por sangria dos mesmos coelhos antes de serem imunizados; b) soros de coelhos após imunização com as fontes D 2 e D 12 — isolados de doentes de febre amarela silvestre — e com F 654, fonte neurotrópica da febre amarela; c) com o soro de um coelho imunizado com cérebros de camundongos normais.

No quadro n.º 4 vê-se o resumo das provas.

Os camundongos são observados durante 14 dias. Geralmente os inoculados com virus amarílico morrem de encefalite do 4.º ao 10.º dia. Em nossos trabalhos sempre usamos cinco camundongos em cada prova. No quadro apresentamos o resumo das fichas de provas. O denominador indica o número de camundongos inoculados e o numerador o dos camundongos sobreviventes durante os dias de observação. Vê-se que a prova com o virus D 2 a 1/1000 + soro normal do coelho 147 começa com 5 camundongos (5/5) e que assim permanece até o quinto dia (5/5), no sexto, tendo morrido 1, ficando 4 (4/5), no sétimo, apenas dois vivos (2/5) e no oitavo dia encontram-se todos mortos (0/5). Portanto, o soro normal do coelho 1 antes de ser imunizado não tem ação neutralizante sobre o virus da fonte D 2.

O soro desse coelho após imunização com a fonte D 2 apresenta anticorpos viricidas, tendo neutralizado o virus da mesma fonte, protegendo todos os camundongos inoculados (5/5). Essas duas provas são controles indispensáveis nas provas de proteção.

Também o soro preparado com a fonte D 12, de outro caso de febre amarela silvestre, neutralizou igualmente o virus da fonte D 2. De maneira idêntica procedeu o soro do coelho 1, imunizado com o virus neurotrópico da febre amarela clássica F 654.

Como última prova, foram inoculados camundongos sempre com o mesmo virus D 2 a 1/1000 e o soro de um coelho imunizado apenas com cérebro de camundongo normal, visto terem sido inoculados com cérebro de camundongos com encefalite os que foram imunizados com as fontes de virus. Nessa prova o soro procedeu com o soro normal, tendo morrido todos os ~~camundongos~~ camundongos.

Deste primeiro grupo de provas de neutralização podemos concluir que o virus da fonte D 2, isolado de um doente de febre amarela silvestre, foi neutralizado igualmente por um soro preparado com a mesma fonte, por outro de coelho imunizado com a fonte D 12, isolada de caso idêntico de febre amarela silvestre e também pelo soro de um coelho imunizado com o virus neurotrópico da febre amarela clássica F 654, tendo as provas de controle funcionado bem.

## QUADRO N.º 5

## PROVA DE PROTEÇÃO INTRACEREBRAL

Neutralização da Fonte D 12 do Virus isolado de um doente de Febre Amarela Silvestre pelos soros dos coelhos imunizados com a mesma fonte, com a fonte D 2 e com o Virus Neurotrópico da Febre Amarela Clássica  
F 654.

VIRUS 0,015 cc.	S Ô R O S 0,015 cc.	OBSERVAÇÃO DURANTE 14 DIAS														RESULTADO DAS PROVAS
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
FONTE D 12 A 1 1000	SÔRO NORMAL COELHO 150	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{0}{5}$						$\frac{0}{5}$
	SÔRO COELHO 150 IMUNIZADO COM VIRUS D 12	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$
	SÔRO COELHO 147 IMUNIZADO COM VIRUS D 2	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{4}{5}$
	SÔRO COELHO 1 IMUNIZADO COM F 654	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{4}{5}$
	SÔRO - COELHO 128 CONTROLE, INOCULADO COM CEREBRO NORMAL DE CAMONDONGO	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{0}{5}$						$\frac{0}{5}$

## QUADRO N.º 6

Neutralização do Virus Neurotrópico da Febre Amarela Clássica F 654 pelos soros dos coelhos imunizados com o mesmo Virus e com as duas fontes de Virus D 2 e D 12 isoladas de doentes de Febre Amarela Silvestre.

VIRUS 0,015 cc.	S Ô R O S 0,015 cc.	OBSERVAÇÃO DURANTE 14 DIAS														RESULTADO DAS PROVAS
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
FONTE F 654 A 1 5000	SÔRO NORMAL COELHO 1	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{4}{5}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{0}{5}$						$\frac{0}{5}$
	SÔRO COELHO 1 IMUNIZADO COM F 654	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$
	SÔRO COELHO 70 IMUNIZADO COM D 2	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$
	SÔRO COELHO 147 IMUNIZADO COM D 12	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$
	SÔRO COELHO 128 CONTROLE, INOCULADO COM CEREBRO NORMAL DE CAMONDONGO	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{0}{5}$								$\frac{0}{5}$

O segundo grupo de provas que se pode ver no quadro 5, foi feito com o virus da fonte D 12, tambem isolado de outro caso de febre amarela silvestre, da mesma epidemia de 1937.

Além dos soros controles, como na prova anterior, foram feitas provas de neutralização desse virus por soros imunes preeparados com as seguintes fontes: D 12, D 2 e F 654.

Como se vê no quadro 5, o vírus da fonte D 12 foi neutralizado pelos soros imunes preparados com as fontes D 12, D 2 e F 654, procedendo, em relação a estes soros, da mesma maneira que a fonte D 2, como era de esperar.

Com essas séries de experiências resumidas nos quadros 4 e 5, já se constata a identidade imunológica das fontes D 2 e D 12 pelas provas de neutralização cruzada; e que um soro imune preparado com a raça neurotrópica da febre amarela clássica F 654, também neutraliza essas fontes.

Em um último grupo de experiências, foram feitas provas de proteção — sempre intracerebrais — com o fim de virificar se o vírus da febre amarela clássica seria neutralizado pelos soros imunes obtidos pela imunização de coelhos com as duas fontes de vírus isoladas de doentes de febre amarela silvestre.

Há no quadro 6, uma prova feita com o soro do coelho 1 antes de imunizado (soro normal) e a seguir outra com o soro do mesmo coelho após imunização com o vírus F 654, provas que funcionam como controles de grupo de provas feito com esses vírus. Vêm depois as duas provas com soros imunes preparados com as fontes D 2 e D 12, e a última, mais um controle com soro de coelho imunizado com cérebro de camundongo sem vírus.

Tratando-se da neutralização de um vírus amarílico altamente neurotrópico, como é a fonte F 654, cuja D. M. M. é muito maior que a das fontes D 2 e D 12 (estas com poucas passagens no cérebro de camundongos), a prova foi feita com o vírus diluído a 1/50000.

Como resultado, vemos: a) que os soros normal e de um coelho imunizado com cérebro sem vírus não foram capazes de proteger nenhum camundongo (0/5); que o soro imune F 654 protegeu os camundongos inoculados com o mesmo vírus (5/5) (demonstrando que os camundongos da prova do item "a" morreram pela ação do vírus amarílico e não por qualquer contaminação); c) que os soros imunes preparados com as fontes D 2 e D 12 neutralizaram o vírus da febre amarela, protegendo todos os camundongos inoculados (5/5).

Provas idênticas foram feitas com soros de cobaias imunizadas ou vacinadas com o vírus neurotrópico da febre amarela F 654 e com a nossa fonte D 12.

O resultado das provas de proteção foram idênticas às realizadas com soros imunes de coelhos, confirmando as provas anteriores de neutralização cruzada entre essas fontes de vírus.

Dos resultados das provas de proteção que foram feitas e que estão resumidas nos quadros 4, 5, e 6, podemos concluir:

1 — As fontes do vírus D 2 e D 12 isoladas de dois doentes de febre amarela silvestre mostraram-se imunologicamente iguais nas provas de neutralização cruzada;

2 — Essas fontes de vírus e o vírus neurotrópico da febre amarela clássica também apresentam neutralização cruzada.

## DISCUSSÃO

As provas de imunidade têm sido empregadas como sendo das mais importantes na identificação de um vírus, principalmente entre mólestias que muito se aproximam e em que o seu modo de transmissão é diferente. Assim, por exemplo, os vírus dos tifos transmitidos pelo piolho, pulga dos ratos e pelo carrapato, formam tipos diferentes de tifo exantemático; mas as provas de imunidade cruzada nos mostram relações imunitárias interessantes, diferentes para uns e semelhantes para outros.

Ainda na família infecciosa das febres exantemáticas, vemos nos Estados Unidos da América que a febre maculosa das Montanhas Rochosas apresenta duas formas: a) uma nos Estados do oeste; b) outra nos Estados do este. As moléstias são idênticas nos sintomas e nas alterações patológicas, mas a do oeste é grave, com mortalidade de 82%; a outra, denigna, com mortalidade apenas de 22%. A moléstia natural, na forma benigna, observa-se principalmente entre as populações rurais, sendo transmitida pelo carrapato do cão, *Dermaacentor variabilis*; a forma grave é uma moléstia sazonal, sobrevivendo no verão entre os lenhadores, caçadores e os habitantes de certos vales das Montanhas Rochosas, sendo o seu transmissor o carrapato *Dermaacentor andersoni*, encontrado nas matas americanas. Mas essas formas são ambas devidas ao mesmo vírus, com identidade imunológica — como ficou demonstrado pelas provas de imunidade cruzada.

Ainda no estudo das relações das febres exantemáticas do grupo americano entre si, as provas de unidade cruzada — feitas principalmente por LEMOS MONTEIRO, DYER, PARKER e DAVIS e DAVIS e PARKER — estabeleceram que o vírus do tifo de São Paulo é imunologicamente semelhante ao vírus da febre maculosa das Montanhas Rochosas.

Os processos mórbidos encefalitogênicos no homem são múltiplos, apresentando os seus vírus diversidade etiológica. Não há uma encefalite epidêmica, mas sim múltiplas encefalites infecciosas e contagiosas. De fato, os seus três principais tipos: a encefalite letárgica tipo von Economo, a encefalite japonesa e a americana (São Luiz), embora pertencendo à mesma família, são diferentes sob o ponto de vista etiológico — não há entre elas imunidade cruzada.

Na etiologia da influenza humana os últimos estudos demonstraram a existência de diversos vírus ou variedades de vírus, sendo denominado agora Virus A o agente descoberto em 1933 por SMITH, ANDREWES e LAIDLAW na Inglaterra, e Virus B o estudado em 1940 por MAGILI e por FRANCIS, um produzindo a influenza A, outro a influenza B, doenças clinicamente indistinguíveis. Esses vírus são agentes da forma epidêmica da influenza e não vacinam um contra o outro, não havendo imunidade cruzada tanto na doença natural como na experimental. Há mais: nem todos os doentes de influenza epidêmica são infectados por um ou outros desses dois vírus, sendo possível que outros agentes, ainda desconhecidos, sejam capazes de produzir a influenza humana. Esta, quando não tem por causa o Virus A nem o Virus B foi denominada influenza Y — que também é clinicamente indistinguível das outras duas. Essas três variedades de influenza podem ser encontradas na mesma epidemia.

Também a etiologia da forma endêmica da gripe ou influenza humana é ainda desconhecida — ela não é produzida pelos vírus A ou B. Estes novos conhecimentos sobre a etiologia da influenza humana têm sido orientados pelas provas imunitárias.

Interessa-nos, também, o conhecimento da existência de um grupo de moléstias produzidas por vírus filtráveis e que se observam nos climas tropicais e sub-tropicais como a febre amarela; são elas: Rift Valley fever, Dengue e Sand-Fly fever.

Com respeito à transmissão, é universalmente aceito ser a febre denominada Dengue transmitida pelo *Aedes aegypti*, como a febre amarela clássica; e LEVADITI e LEPINE (13) dizem: “La fièvre jaune peut prêter à confusion dans les seules régions où les deux maladies coexistent: le cas s’est produit en 1905, à La Havane, où, pendant quelque temps, les deux maladies ont été confondues”.

ROOYEN e RHODES (14) em recente tratado sobre virus, discutindo a etiologia da Dengue, assim se expressam: "It should be mentioned, however, that the accurate clinical diagnosis of dengue fever is by no means always an easy matter. For example, sporadic atypical cases of dengues may sometimes present clinical signs and symptoms simulating a variety of other febrile illnesses met with in the tropics, such as Papatic fever, malaria and mild yellow fever".

Embora na febre dengue apresentem os doentes eritema, a erupção pôde ser fugaz e, neste caso, difficilmente visível, principalmente nas raças de côr. O virus desenvolve-se no sangue dos doentes nos primeiros dias que seguem o começo de febre e os *Negomyias* tambem só se infectam nesse período — como na febre amarela.

Existem, às vezes, semelhanças clínicas; como tambem idêntico modo de transmissão entre febre amarela e dengue — mas as provas de imunidade cruzada as separam, embora DINGER E SMYDERS (1931) tenham constatado ligeiras relações imunológicas entre elas.

O virus da Rift Valley fever (hepatite enzootica dos carneiros) tambem apresenta notaveis semelhanças com o virus da febre amarela, além de poder ser transmitido pelos mosquitos *Aedines*. Contudo, se o virus da febre amarela geralmente não produz doença quando inoculado no peritonio de camondongos, o da Rift Valley fever, nas mesmas condições, mata rapidamente esses animais na proporção de 100%, além de ser patogênico para outros animais que se mostram refratários ao virus amarelíco. Mas, de maneira idêntica ao da febre amarela, pode-se obter fonte neurotrópica desse virus, como o fizeram MA-KENZIE e FINDLAY (1933) por passagens intracerebrais em camondongos. Obtiveram assim, fonte neurotrópica com afinidade para o tecido nervoso, fonte que injetada no cérebro do camundongo, produz encefalite sem necrose hepática, como o virus amarelíco. Mas a infecção extraneural de animais de laboratório pelo virus da Rift Valley fever produz necrose hepática semelhante à apresentada pelo homem na febre amarela.

As mesmas espécies de macacos que apresentam reação febril ao virus da febre amarela, reagem ao virus da Rift Valley fever.

No homem, os sintomas clínicos da Rift Valley fever e da forma benigna da febre amarela são muito semelhantes e ambas lhe conferem imunidade duradoura.

Fato importante é não existirem relações imunitárias entre esses virus: *in vivo*, macacos vacinados, ou que tiveram infecção experimental pelo virus da Rift Valley fever, são suscetíveis ao virus da febre amarela e vice-versa. Há o caso de um assistente de laboratório que contraíu a febre amarela e 3 anos depois a Rift Valley fever, sendo os virus isolados do sangue em ambos os casos.

Não há, portanto, imunidade cruzada entre essas duas infecções. Entre elas apenas se constata o fenômeno ultimamente descrito da interferência. Os dois virus sendo inoculados simultaneamente ou o virus da febre amarela pouco antes do virus da Rift Valley fever, a morte dos animais pode ser retardada, podendo mesmo sobreviverem alguns. Mas não se trata de imunidade adquirida que vá proteger esses animais. Como demonstraram os pesquisadores que estudaram o assunto, quando o virus da febre amarela é inoculado algumas semanas antes da injeção do virus da Rift Valley fever, os camondongos não são mais protegidos a-pesar-de neles se ter desenvolvido imunidade ao virus da febre amarela. Por consequência — não existem relações imunitárias entre esses dois virus.

O vírus da Sand-Fly fever, transmitido pelo *Phlebotomus papatassii*, ocasiona no homem doença benigna, raramente mortal, que é conhecida por diversas denominações: Febre de três dias, Febre papataci, Febre Phlebotomus etc.

Trata-se de vírus filtravel em Chamberland e Berkefeld N, cultivavel como o vírus da febre amarela e como este podendo ser conservado seco no vácuo; mas que não é patogênico para animais de laboratório. Alguns macacos são fracamente sensíveis, como o *Macacus cynomolgus* e o *Macacus rhesus*, apresentando apenas ligeira reação febril após inoculação de sangue ou soro filtrado de doentes. No período febril o sangue inoculado em outro animal da mesma espécie transmite a infecção; também foram positivas inoculações feitas em duas pessoas com 5 cc. de sangue de um macaco infectado.

A infecção produzida pelo vírus da Sand-Fly fever deixa imunidade passageira, e o soro dos convalescentes apresenta anticorpos protetores.

O diagnóstico diferencial é mais árduo entre Sand-Fly fever e Dengue por serem esses vírus fracamente patogênicos para animais de laboratórios, tornando-se difíceis as provas indispensáveis de neutralização dos vírus.

Nada encontramos que nos pudesse orientar sobre as relações imunitárias entre febre amarela e Sand-fly fever.

Existem icterícias epidêmicas cuja sintomatologia é muito semelhante a apresentada pela febre amarela. O conhecimento dessas icterícias infecciosas é importante quando se está discutindo o diagnóstico da febre amarela ou estudando o seu vírus.

A moléstia de Weil, por exemplo, apresenta o quadro clínico da febre amarela, não lhe faltando os seus principais sintomas, como a icterícia, a albuminúria e mesmo anúria, hemorragias e o vômito preto. Acresce, ainda, a semelhança das lesões anatómico e histo-patológicas e a presença do agente etiológico no sangue nos três primeiros dias, que, embora sendo uma leptospira — a *Leptospira icterohaemorrhagiae* — é filtravel em Berkelfeld V. N e W.

Sabe-se que, de 1918 a 1925, uma leptospira — a *Leptospira icteroides* — foi tida como o agente etiológico da febre amarela pelos estudos de NOGUCHI. Os trabalhos de SELLARDS e THEILLER e de SCHIFFNER (1937-1938), mostrando a identidade entre a *Leptospira icteroides* e a leptospira da moléstia de Weil, vieram provar que essas duas moléstias foram confundidas nessa ocasião por NOGUCHI.

Na moléstia de Weil as provas de laboratório para o seu diagnóstico são atulmente muito eficazes, lançado-se mão, principalmente, das seguintes: a) pesquisa direta dos espiroquetas no sangue e urina em campo escuro; b) inoculação em cobais; c) cultura em meio de Fletcher; d) aglutinação com leitura em campo escuro; e) verificação do poder protetor do soro (prova de poteção em cobaias); f) fenômeno de Pfeiffer (verificação da lise da *Leptospira icterohaemorrhagiae* no peritônio de cobaia).

Portanto, se é difícil o diagnóstico clínico diferencial entre moléstia de Weil e febre amarela, as provas de laboratório, com a não existência de parentesco imunológico entre elas — não permitem mais se estabeleça dúvida ou confusão entre essas duas doenças.

As provas apresentadas neste trabalho são mais uma contribuição ao estudo da febre amarela silvestre e vieram reforçar a impressão que tivemos quando na epidemia de 1936-1937 isolavamos sempre o mesmo vírus de doentes dessa moléstia, impressão de que se tratava do vírus da febre amarela, com o qual de início foi ele submetido a estudos comparativos.

Carece de importância não ter sido feito o nosso trabalho com o vírus natural da febre amarela — vírus pantrópico, e sim com vírus modificado — vírus ieurotrópico; pois, como já dissemos acima, os vírus pantrópico, viscerotrópico e neurotrópico da febre amarela produzem os mesmos anticorpos, que neutralizam indiferentemente qualquer um desses vírus.

### CONCLUSÕES

1. — Existe imunização cruzada entre as amostras ou fontes de vírus por nós isoladas de doentes de febre amarela silvestre.
2. — Entre essas amostras de vírus e o vírus neurotrópico da febre amarela clássica, também existe imunização cruzada.
3. — As provas de neutralização cruzada também foram positivas entre as amostras isoladas dos doentes de febre amarela silvestre.
4. — Há neutralização entre as fontes de vírus isoladas desses doentes e o vírus neurotrópico da febre amarela clássica.
5. — Portanto, há identidade imunológica entre o vírus por nós isolado de doentes de febre amarela silvestre — na epidemia ocorrida no Estado de São Paulo, em 1936-1937 — e o vírus de febre amarela clássica.

### CONCLUSIONS

- 1) A cross immunization exists between the samples of virus isolated by us from cases of jungle yellow fever.
- 2) There also exists a cross immunization between these samples of virus and the neurotropical virus of classical yellow fever.
- 3) Cross neutralization tests were also positive between the samples of virus isolated from cases of jungle yellow fever.
- 4) There is cross neutralization between the viruses isolated from cases of jungle yellow fever and the neurotropical virus of classical yellow fever.
- 5) Therefore, the virus isolated from cases of jungle yellow fever during the 1936-1937 epidemic in the State of São Paulo and the classical yellow fever virus are immunologically identical.

### BIBLIOGRAFIA

1. SOPER, F. L., PENNA, H., CARDOSO, E., SERAFIM, J., FROBISHER, M., and PINHEIRO, J. 1933 — Yellow fever without *Aedes aegypti*. Study of a Rural Epidemic in the Valle do Camaan, Espírito Santo. Brasil. A. Jour. Hyg. V. XVIII.
2. PESTANA, B. R. — 1937 — Considerações epidemiológicas a respeito da febre amarela e da febre amarela silvestre. Anais Paulistas de Med. e Cir. V. XXXIV. N. 5.
3. ARAGÃO, H. B. — 1939 — Particularidades da febre amarela urbana e da silvestre no Sul do Brasil — in "Livro de Homenagem" aos Professores Alvaro e Miguel Osório de Almeida. Rio de Janeiro, Brasil.
4. MONTENEGRO, J. — 1937 — Diagnóstico anato-patológico da febre amarela. Arquivos de Higiene e Saúde Pública. N. 3 — junho de 1937, pag. 109.

5. ASSUNÇÃO, L. — 1937 — O virus isolado dos doentes de febre amarela silvestre durante o último surto epidêmico verificado no Estado de S. Paulo. Boletim n.º 61 do Instituto de Higiene de São Paulo.
6. ASSUNÇÃO, L. — 1938 — Prova de proteção intracerebral em camundongo com o virus isolado em São Paulo de um caso de febre amarela silvestre. Boletim n.º 62 do Instituto de Higiene de São Paulo.
7. ASSUNÇÃO, L. — 1940 — Prova de proteção intraperitonal em camundongo no estudo epidemiológico da febre amarela silvestre. Boletim n.º 71 do Instituto de Higiene de São Paulo.
8. ANTUNES, P. C. A. — 1937 — Nota sobre o virus da febre silvestre isolado em São Paulo. (Lida na Secção de Higiene e Med. Tropical da Associação Paulista de Medicina, em 4-IX-1937.)
9. THEILER, M. — 1931 — Studies on the action of Yellow fever virus in mice. Ann. Trop. Med. and Parasit. V. XXIV.
10. THEILER, M. — 1931 — Neutralization test with immune yellow fever sera and a strain of yellow fever adapted to mice. Ann. Trop. Med. and Parasit. V. XXV.
11. THEILER, M. — 1933 — A yellow fever protection test in mice by intracerebral injection. Ann. Trop. Med. and Parasit. V. XXVII.
12. SAWYER, W. A. and Lloyd, W. — 1936 — The use of mice in test of immunity against yellow fever. The Journ. of Exp. Med. V. LIV.
13. LEVADITI, C. et LÉPINE, P. — 1938 — Les Ultravirus des maladies Humaines. Tome II, pag. 822.
14. ROOYN, C. E. and RHODES, A. J. — 1940 — Virus Diseases of Man. Pag. 421.