

Estudos sôbre a bartonelose

I. A bartonelose dos ratos esplenectomizados e a Penicilina (*)

por

F. Ubatuba e Gessy Vieira

(Com 8 figuras no texto)

O problema da bartonelose, embora pudesse interessar originariamente aos microbiologistas, suscita também a atenção dos endocrinologistas, devido às relações estreitas entre essa doença e um órgão de fisiologia ainda em muitos pontos obscura: o baço. A circunstância curiosa de que a retirada dêsse órgão produz o desencadeamento da infecção, coloca o problema no campo da fisiologia, tanto mais que há evidências favoráveis da existência de um mecanismo de proteção de natureza hormonal, como veremos em seguida.

Encarada sob êsse ponto de vista, foi-nos sugerida a questão pelo Dr. Thales Martins, uma vez que sendo pobre de efeitos o quadro da esplenectomia, seria a bartonelose um teste precioso para o estudo das funções do baço.

Como em todo teste torna-se necessário, antes mesmo da sua aplicação como tal, fazer um estudo acurado das alterações em si, para em seguida usá-las como padrão nas intervenções corretoras.

É êste então o objetivo dêste primeiro trabalho, tendo-se aproveitado o material para a verificação preliminar do efeito da penicilina na bartonelose do rato albino esplenectomizado.

Por muitos anos, passou despercebido que o rato, largamente usado como animal de experiência, era sede de um interessante caso de *imunidade de infecção* para um tipo de bactéria de posição sistemática ainda hoje mal definida e de comportamento biológico rico em fatos curiosos. Esta bactéria (genus *Bartonella*), que já foi mesmo aproximada aos protozoários, acha-se numa posição indefinida juntamente com os microorganismos dos gêneros *Grahamella*, *Eperithroozon* e *Toxoplasma*. Muitos autores aproximaram as bartonelas das *Rickettsiaceae*, entre nós CUNHA & MUNIZ (9). Só recentemente, por não se conhecer bem o comportamento das bartonelas em relação aos artrópodos hospedadores (insetos e iodídeos) e por

(*) Trabalho da Secção de Endocrinologia.

* Recebido para publicação a 1 de junho e dado à publicidade em agosto de 1944.

serem elas parasitos intra-celulares facultativos (formação de colônias extra-celulares em cultura de tecidos) (43) foram destacadas das riquetsias, tomando-se por base os pontos de vista de COWDRY (6). A possibilidade de vida extra-celular, indica maior complexidade enzimática e, portanto, menores requisitos nutritivos das bartonelas. De qualquer modo porém, elas se aproximam muito das riquetsias, vindo em apoio dêsse modo de pensar a necessidade de ácido ascórbico e de glutathione para o crescimento da *B. bacilliformis*, como observou recentemente GEIMAN (19). Seria interessante estudar o comportamento das bartonelas nos diferentes estádios de metabolismo celular, já que elas vivem na hematia e se reproduzem nas células do retículo-endotélio (11, 15, 51). Segundo ZINSSER & SCHOENBACH (55), há *virus* que se desenvolvem em células de elevado metabolismo; as riquetsias, conforme demonstraram PINKERTON & BESSEY (44), se reproduzem ativamente em células em que houve uma depressão na formação do pigmento respiratório de Warburg.

O rato comum de laboratório é portador de bartonelas. Uma vez infectado nas primeiras semanas de vida, estabelece-se o equilíbrio entre a bartonela e o organismo animal; êste equilíbrio é tão sólido e duradouro que o rato se comporta como perfeitamente normal. O fato se ajusta ao quadro da *premunição* de Sargent. Basta a diminuição da resistência do animal, por meio de intoxicações graves, infecções com protozoários, irradiação do baço com raios X, esplenectomia e mesmo bloqueios intensos do S. R. E. (4, 46), para ser rompido êste equilíbrio, estabelecer-se um estado de hipoergia e desencadear-se uma infecção grave com aparecimento de microorganismos no sangue circulante.

Imunològicamente, o mais importante é que aqui, como em outras parasitoses, não há super-infecção. O rato portador, adulto, com baço íntegro, não é infectado com sangue de rato anemiado; basta a esplenectomia para desenvolver-se a infecção (20). Segundo GOTTESMAN & PERLA, o rato é infectado pela injeção de sangue de adulto anemiado só até três semanas de vida e a esplenectomia antes dessa idade não desencadeia a anemia. Conclusões importantes surgem daí: a imunidade congênita não existe para a bartonela; a infecção se dá no início da vida extra-uterina até a terceira semana (20) ou entre a quarta e a quinta (27); uma vez infectado, o rato se torna portador; o comportamento do baço é então diferente no animal jovem e no adulto.

Corroborando a proteção por parte do baço, já então suspeitada e tendo MARINE & MANLEY (34) obtido sucesso no transplante de baço, PERLA & GOTTESMAN obtiveram uma proteção de mais de 50% com transplantes feitos sete semanas antes da esplenectomia (21). É interessante notar-se que nos animais protegidos o transplante funciona como enxêrto, isto é, há

regeneração e mesmo hiperplasia dos elementos da pólpa esplênica transplantada, o que se não dá quando não há proteção: os elementos se atrofiam, entram em degeneração e são absorvidos. Também a esplenectomia parcial mostrou que $\frac{1}{4}$ do baço "*in situ*" protege os animais contra a bartonelose (39). No rato adulto, anemiado experimentalmente pela injeção de sangue infectante ou culturas (raças isentas de bartonela) e no rato infantil, notam-se lesões da pólpa esplênica (20). É interessante notar-se que os ratos Wistar, criados em condições especiais, não são portadores de bartonela mas altamente sensíveis à bartonelose (18).

O funcionamento de fragmentos de baço transplantados exclui não só a possibilidade de uma influência nervosa no mecanismo de proteção, como também a necessidade da ligação vascular direta com o fígado. Todavia, os extratos alcoólicos e aquosos de baço de boi e de porco não protegem os ratos esplenectomizados (21), mas PERLA & GOTTESMAN (39), apoiados nas experiências de LAUDA & FLAUM (30), insistem em que a proteção se dê por intermédio de uma substância de natureza hormonal, secretada pelas células da pólpa esplênica. LAUDA & FLAUM verificaram que a retirada do baço de um parabionte não desencadeiava a infecção no par, mas que a esplenectomia do outro animal dava origem à bartonelose em ambos. Posteriormente, PERLA & GOTTESMAN (41) evidenciam uma proteção de 37% dos machos de 6 a 8 semanas e de 66% dos machos de 3 a 5 meses, com um extrato lipóidico de baço aplicado intra-peritonalmente na dose diária de 1 cm³ (correspondente a 100 grs. de baço) até um mês após a esplenectomia. O resultado, como se pode notar, em relação a uma proteção, não é dos mais brilhantes. Além disso, a técnica usada pelos referidos autores na preparação do extrato talvez não seja adequada. Devemos acentuar que apesar da bartonelose ser um teste cômodo para o estudo de um órgão ainda pouco analisado e de *sequellae* de extirpação reduzidas, não tem havido grandes pesquisas neste sentido; mas as experiências acima citadas de parabiose, de efeitos muito precoces, mesmo antes de se estabelecerem ligações vasculares amplas, falam a favor de uma ação de tipo humoral. Acharam os mesmos autores (42) que o cobre e o ferro também dão alguma proteção ao rato esplenectomizado mas que a super-dosagem sensibiliza o animal (depósito metálico nas células do S. R. E.). Há aí uma correlação interessante com o trabalho de FELDT & SCHOTT (16) que notaram a impedência da ação específica do salvarsan na febre recorrente experimental após bloqueio do sistema retículo-endotelial.

A imunidade na bartonelose se aproxima então do tipo tissular, na dependência direta das células do S. R. E. Devemos notar desde já que o baço do rato representa, diferentemente do que se observa no coelho e na

cobáia (52), a grande massa de células retículo-endoteliais (em pêsso, o baço do rato representa de 0.9 — 1.0% da massa corpórea). Segundo MACMILLAN (32), só são encontrados quatro nódulos hemo-linfáticos no rato. Se bem que ainda reste dúvida a respeito de serem êstes nódulos tecido esplênico acessório, pelo menos no carneiro, WARTHIN (53) demonstra a hipertrofia dêsses nódulos após a esplenectomia, mas aponta não haver evidência de eritropoiese nos mesmos. Não é de todo impossível admitir-se então uma ação de suplência dêsses grupos celulares nos animais esplenectomizados, a qual seria inconstante ou insuficiente no rato.

Quanto à etiologia, não há dúvida de que a bartonela seja a responsável pela anemia do rato albino. Em 1932, GOTTESMAN & PERLA (23) demonstram claramente o papel dessa bactéria no desenvolvimento da anemia. Do sangue de rato anêmico esplenectomizado isolaram êsses pesquisadores a bartonela em cultura pura no meio de Noguchi para leptospira. É interessante notar-se que já tinham LWOFF & VAUCEL (31) isolado de camondongo infectado com sangue de cão com tripanosomiase experimental (*S. cruzi*) uma bartonela semelhante à *B. bacilliformis*, crescendo bem em meio de Noguchi e em meio N.N.N. GOTTESMAN & PERLA, no trabalho apontado, fecharam o ciclo de Pasteur com o germen isolado do rato anêmico: a cultura inicial produziu anemia severa em ratos jovens e do sangue dêsses animais foi re-isolada a bartonela, além de ser possível a passagem em série em animais jovens dessa espécie; em coelhos de 3 semanas (os adultos são resistentes à infecção), a mesma cultura produziu anemia e ao 5.º dia foi re-isolada a bartonela; os mesmos resultados foram obtidos em cobaias jovens e em camondongos; em ratos Wistar, sem bartonelas, a cultura produziu anemia, tendo também sido re-isolada a bartonela dêsses animais.

Um fato importante sob o ponto de vista imunológico deve ser apontado. FORD & ELIOT (17) não conseguiram demonstrar a existência de anticorpos fixadores do complemento em ratos com bartonelose e nem conseguiram proteção com o sôro dêsses animais, em trabalho subsequente (18).

Em relação ao tipo de anemia e à sua regeneração na hemobartonelose, há fatos bem interessantes que pretendemos estudar posteriormente. Conforme o trabalho de CRUZ & ROBBINS (7), o baço influencia a regeneração sanguínea, mas não podem os autores explicar de que modo se processa essa influência. Trabalharam êles em cães esplenectomizados e anemiados por sangrias ou pela fenil-hidrazina. Êste último tipo de anemia, que apresenta regeneração mais intensa, aproxima-se muito da anemia por bartonelose. Aparecem nas hemátias granulações químicas de natureza não hemoglobínica, (corpusculos de HEINZ) pois o valor globular não se altera,

e a contagem desses elementos com grãos, dos normoblastos (eritroblastos ortocromáticos de Ferrata) e dos reticulocitos, mostra claramente que há uma invasão inicial de tôdas as hemáticas circulantes. Aumentando o número de reticulocitos, o de normoblastos e o de hemáticas jovens, sem grãos, vão as hemáticas primitivamente lesadas desaparecendo. (8) As hemáticas "velhas" vão sendo paulatinamente fagocitadas e destruídas pelas células do reticulo-endotélio (as células de KUPFFER mostram-se altamente ativas nos cães esplenectomizados e anemiados pela fenilhidrazina). Uma vez estabelecidos métodos hematológicos que permitam um trabalho diário, com espoliação desprezível e bom limite de erro, será o rato o animal de escolha para o estudo da regeneração desse tipo de anemia.

Na bartonelose do rato, uma vez passada a crise anêmica, a regeneração é brutal e se acompanha por uma verdadeira limpeza das hemáticas parasitadas circulantes, por parte das células histiocitárias. Temos de levar em conta que as hemáticas parasitadas possam infectar as jovens, diferentemente do que se passa com a fenilhidrazina mas a regeneração é tão intensa e rápida que a comparação talvez possa ser feita. Por outro lado, fato interessante, a não ser logo de início, os reticulocitos (policromatófilos ao Giemsa) e os normoblastos, células da cadeia de evolução da hemática, geralmente não apresentam bartonelas, como verificamos, confirmando trabalhos anteriores (50, 54).

As primeiras referências a uma doença humana caracterizada por sintomas gerais de infecção com erupção cutânea verrucosa, remontam aos tempos de Pizarro. Só em 1870, durante a construção da estrada de ferro Lima-Oroya, quando houve 7.000 vítimas, é que ficou plenamente confirmada a existência da nova entidade nosológica. Daí por diante houve confusão entre Febre de Oroya e Verruga peruana, mesmo após o sacrifício heroico de Daniele Carrion, estudante de medicina em Lima. Em 1885, Carrion auto-inoculou-se com material de verruga, morrendo semanas após com quadro típico de Febre de Oroya. A Expedição do Instituto Harvard, chefiada por Strong (51), baseada em dados epidemiológicos, na impossibilidade de produzir verruga ou mesmo infecção em animais com sangue de paciente de Febre de Oroya e na transmissão do "virus" da verruga a animais, sem aparecimento de bartonelas no sangue circulante ou nas lesões, resultou num relatório que separa as duas entidades mórbidas. Não tardou porém em aparecer a sanção definitiva da identidade etiológica, com os trabalhos de vários pesquisadores, especialmente BATTISTINI (3), NOGUCHI (37, 38), MAYER & KIKUTH (36). Admite-se atualmente que os dois síndromes são aspectos diferentes de uma mesma infecção, a Doença de CARRION, como querem os pesquisadores peruanos. Caracteriza-se a infecção por uma

triade de sintomas: febre — anemia — dermatite verrucosa; logicamente, na evolução da doença, a reação histiocitária deve ser posterior à fase sanguínea e não anterior, como aventam GOTTESMAN & PERLA (20). Aliás há referência a casos clínicos que assim se comportaram e o próprio STRONG (51) cita observações em que aparece verruga posteriormente ao período febril, mas as rotula como casos de Febre de Oroya “complicados” com verruga.

Entre 1901 e 1909, BARTON anuncia e insiste na existência de elementos bacilares no sangue de doentes de febre de Oroya. Em 1913 STRONG descreve e classifica o germen, dando-lhe o nome de *Bartonia*, imediatamente mudado para *Bartonella*. (*B. bacilliformis*). Entre 1925 e 1928, NOGUCHI estuda detalhadamente o parasito. Para maiores detalhes, remetemos o leitor ao trabalho de SORGE (50). Recomendamos também o estudo de HURTADO (26) sobre a anemia da doença de CARRION.

Em 1941, WEISS (54) conclui que, sob o ponto de vista patológico, há uma unidade de conjunto bem clara nas bartoneloses, evidenciada pela presença de germens em indivíduos imunizados e pela descoberta de portadores sãos; uma vez passada a crise anêmica nos animais infectados, as formas crônicas (frequentemente acompanhadas de recorrências) se assemelham às do homem e, pelo seu caráter alergizante, podem ser comparadas à sífilis ou à tuberculose.

Todavia, ainda restam pontos importantes a serem esclarecidos. A distribuição geográfica da bartonelose humana é perfeitamente delimitada. Nas bartoneloses animais nunca foram verificadas lesões proliferativas nem sequer equivalentes ao botão verrucoso do homem ou de antropoides experimentalmente infectados com *B. bacilliformis*, como o chimpanzé (*Pan leucoprymnus*) e o orangotango (*Pongo pygmaeus*) (38), o *Pseudocebus* sp. (10) e o *M. rhesus* (51). As bartonelas animais não são cultiváveis ou o são dificilmente, caso contrário se dando com a humana. A *B. bacilliformis* não é sensível aos agentes terapêuticos conhecidos, ao passo que as bartonelas animais cedem com relativa facilidade aos arsenicais (neosalvarsan, atoxil) e ao Bayer S. D. T.

Várias espécies de bartonelas parasitas de animais foram descritas até hoje. Assim sejam: *Bartonella muris* (CARINI, 1915), (*) parasita do rato comum (*Mus norvegicus*); *Bartonella canis* KIKUTH, 1928 (28), parasita

(*) A maioria dos autores menciona *Bartonella muris rattii* Mayer, 1921 (35) mas, de acordo com os trabalhos de Faria & Pinto (14) e de Faria & Cruz (15), fica bem evidente a prioridade de *Bartonella muris* (Carini, 1915) (5), pelo que adotamos essa designação para a bartonela do rato.

do cachorro (*Canis familiaris*); *Bartonella rocha-limai* FARIA & PINTO, 1926 (14), parasita de um morcego (*Hemiderma brevicauda*); *Bartonella ranarum* CUNHA & MUNIZ, 1926) (9), parasita da rã brasileira (*Leptodactylus ocellatus*); *Bartonella opossum* REGENDANZ & KIKUTH, 1928 (45), parasito do gambá brasileiro (*Didelphys aurita*) e do *Metachirus opossum*; *Bartonella muris musculi* SCHILLING, 1929 (49), parasito do camondongo (*Mus musculi*).

Tendo em vista a importância do rato como animal de laboratório, as relações da bartonelose animal com a doença humana, para a qual ainda não há terapêutica eficaz, a ação da penicilina na sífilis (33), principalmente nas lesões cutâneas do tipo condilomatoso (resultado obtido no Hospital Evandro Chagas) e a ação dessa droga na febre recorrente experimental (2), além da ação dos arsenicais nessas infecções e na bartonelose animal, justifica-se o aproveitamento de nosso material para esta indagação. Logo após iniciarmos o nosso trabalho, surgiu mais uma publicação relativa à ação benéfica da penicilina em doença correlata ao problema — a doença de WEIL experimental (24).

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados em nossas experiências, altamente sensíveis à bartonelose post.-esplenectômica, provieram do biotério geral do Instituto. Usamos ao todo 80 ratos, divididos em quatro lotes, com os quais trabalhamos sucessivamente. No biotério geral são estes animais mantidos sob uma dieta de pão branco, leite fervido, sais, óleo de germe e óleo de cação; em algumas séries foram substituídos uns tantos animais por outros do biotério da Seção, em melhores condições gerais. Conforme já tinha sido observado por um de nós, estes animais desenvolvem a bartonelose em alta porcentagem após a retirada cirúrgica do baço (trabalho não publicado sobre a ineficácia do vanádio como protetor, nessa infecção).

Nunca usamos mais de 15 ratos em gaiolas espaçosas; os controles ficaram sempre em gaiolas idênticas ao lado das dos injetados. Durante todo o período experimental, os animais receberam ração de alimento e água "ad libitum" diariamente. O alimento constou sempre de pão branco embebido em leite pasteurizado.

A esplenectomia foi praticada de modo usual: anestesia pelo eter comum (Sublime ou Piquete), ligadura em massa do pedículo com sêda n.º 0, tendo-se o cuidado de não incluir excesso de meso no laço, pois com o animal

em jejum é possível a inclusão do pâncreas ou interferência na sua vascularização; sutura em dois planos, muscular e cutâneo.

A fim de controlar mais uma vez a especificidade do baço, fez-se a hepatectomia parcial em seis animais, bem sucedida em cinco. Foram retirados os lobos mediano e esquerdo (cêrca de 2/3 do órgão); após ligadura em massa com categut n.º 1, dando-se ao fío uma tensão que a prática logo ensina, foram seccionados os dois lobos, praticamente sem hemorragia. O animal que morreu revelou, à necrópsia, uma ligadura perfeita do coto gecoral e intensa hemorragia da parede abdominal.

O contrôle das modificações hematológicas foi feito por punção de uma das veias da cauda; usamos de início uma agulha de secção circular, mas logo notamos maior facilidade na obtenção da gota de sangue com o uso de uma agulha de secção triangular que fere a veia longitudinalmente. Observamos que é preferível puncionar uma cauda suja, mas sêca, do que limpá-la na hora, seja com água, álcool ou éter; a gordura natural do pêlo facilita a formação de uma gota bem delimitada, que não se espalha e que permite a introdução da ponta da pipeta hematológica em seu interior. Tivemos o cuidado de tirar apenas a quantidade justa e necessária de sangue, para evitar qualquer ação expoliativa mais intensa; o rato de 120-150 gr. suporta perfeitamente bem uma sangria, mesmo diária, de 50 mm³.

Os esfregaços, uma vez secos, foram fixados com metanol e corados pelo Giemsa de modo usual (10-15 minutos; 1 gota por cm³ de água destilada).

Para a dosagem da hemoglobina empregamos o método da Heilmeyer & Sundermann (25) modificado por W. Cruz. O método consiste em se fazer a leitura da côr, no fotômetro gradual de Pulfrich, do líquido resultante da hemólise do sangue em água amoniacal a 0.4%. W. Cruz modificou a técnica empregando o filtro S-57, com a mesma cuba do método original (5mm) e 20 mm³ de sangue lacado em 1.98 cm³ de água amoniacal; o produto de E (-log T) por 25 nos dá diretamente a hemoglobina %. Segundo Cruz o método foi controlado pela dosagem do ferro e duplamente testado em colorímetros fotoelétricos diferentes, com resultados perfeitamente comparáveis.

Uma vez colocado o líquido hemolizante numa bateria de tubos, iamos procedendo à retirada das amostras de sangue; o uso de duas pipetas e de uma bateria de três frascos com água destilada, álcool e éter, facilitou-nos imenso o trabalho, permitindo trabalharmos sempre com pipetas limpas e sêcas, sem interrupção. Inicialmente, as medidas no Pulfrich foram feitas no mesmo dia, mas logo tornamos mais cômodo o trabalho. Uma vez que

a permanência do sangue hemolizado por 24 horas ao ambiente não altera os valores lidos ao fotoelétrico, extendemos essa prática ao fotômetro gradual. Na realidade, não sabemos se há qualquer diferença quando se faz a leitura a olho e não em fotocélula. Ao ambiente, há uma diferença de tonalidade menos marcada após aeração do líquido, mas bem sensível em alguns casos; essa mudança de tonalidade não corresponde, todavia, a uma mudança do espectro da hemoglobina, como verificamos ao espectroscópico. Por prudência, entretanto, apesar de só nos interessarmos pela variação da hemoglobina na evolução da anemia, conservamos os tubos na geladeira durante a noite. Notamos que a mudança de tom foi muito menos nítida e mesmo não se processou em alguns tubos.

O exame microscópico dos esfregaços foi facilitado do seguinte modo: corremos integralmente seis lâminas, três de sangue normal de rato e três de sangue com bartonela. O exame de 6-10 campos mostra-se suficiente para concluir sobre a presença ou ausência dos germes, pois os nossos esfregaços, quando mostram bartonelas, elas existem em quantidade impressionante. Usamos objetiva de imersão, prisma binocular x 1.5 e oculares 5; só em casos de dúvida ou de esfregaços defeituosos, lançamos mão de maior aumento.

Os animais foram observados diariamente quanto à palidês das orelhas e olhos, eriçamento do pêlo, movimentação voluntária e aparecimento de hemoglobinúria.

Os animais que receberam tratamento, foram injetados sempre por via sub-cutânea, no dorso, tendo-se o cuidado de espalhar bem o líquido por expressão e massagem após pinçar o orifício cutâneo com uma pinça de Pean. Dêste modo, obtivemos sempre certeza no rigôr da dosagem. As empolas de penicilina já vieram ao laboratório em garrafa térmica com gelo picado e daí retiradas somente o tempo necessário para a injeção; as ampolas com mais de 0.5 cm³ foram fechadas à lampada para a dose seguinte. Usamos a penicilina bária, do Instituto Oswaldo Cruz.

Na primeira série, usamos duas injeções diárias de 0,25 cm³ perfazendo 20 U.O. diárias para cada animal. Para a segunda série, a dose foi de 24 U.O. repartida em 3 frações de 0.20 cm³. Os ratos da 3.^a série tomaram 40 U. O. diárias, em 5 doses distribuídas uniformemente nas 24 horas (8, 13, 18, 23 e 4 horas) durante cinco dias seguidos. A medicação foi suspensa no fim de nove dias para a 1.^a série e ao fim de 10 dias para a 2.^a série.

RESULTADOS

Os resultados representados nos gráficos e tabelas anexos, foram obtidos segundo os protocolos de experiência dos quais damos um como exemplo elucidativo (Prot. 1). Os gráficos e tabelas são bem explicativos e dispensam maiores comentários. Podemos observar que, de um modo geral, atendendo não só ao limite de erro do método de dosagem da hemoglobina, como também às variações sensíveis dessa taxa hematológica, que não houve qualquer proteção evidente. Como se pode ver nas figuras 1, 2, 3, 5, 6 e 7 o máximo de anemia, considerado pela hemoglobina, se processa violentamente até o 5.^o dia após a esplenectomia. Daí por diante, começa a regeneração nos animais que vão sobreviver à crise, sendo que a mortalidade atingida aos

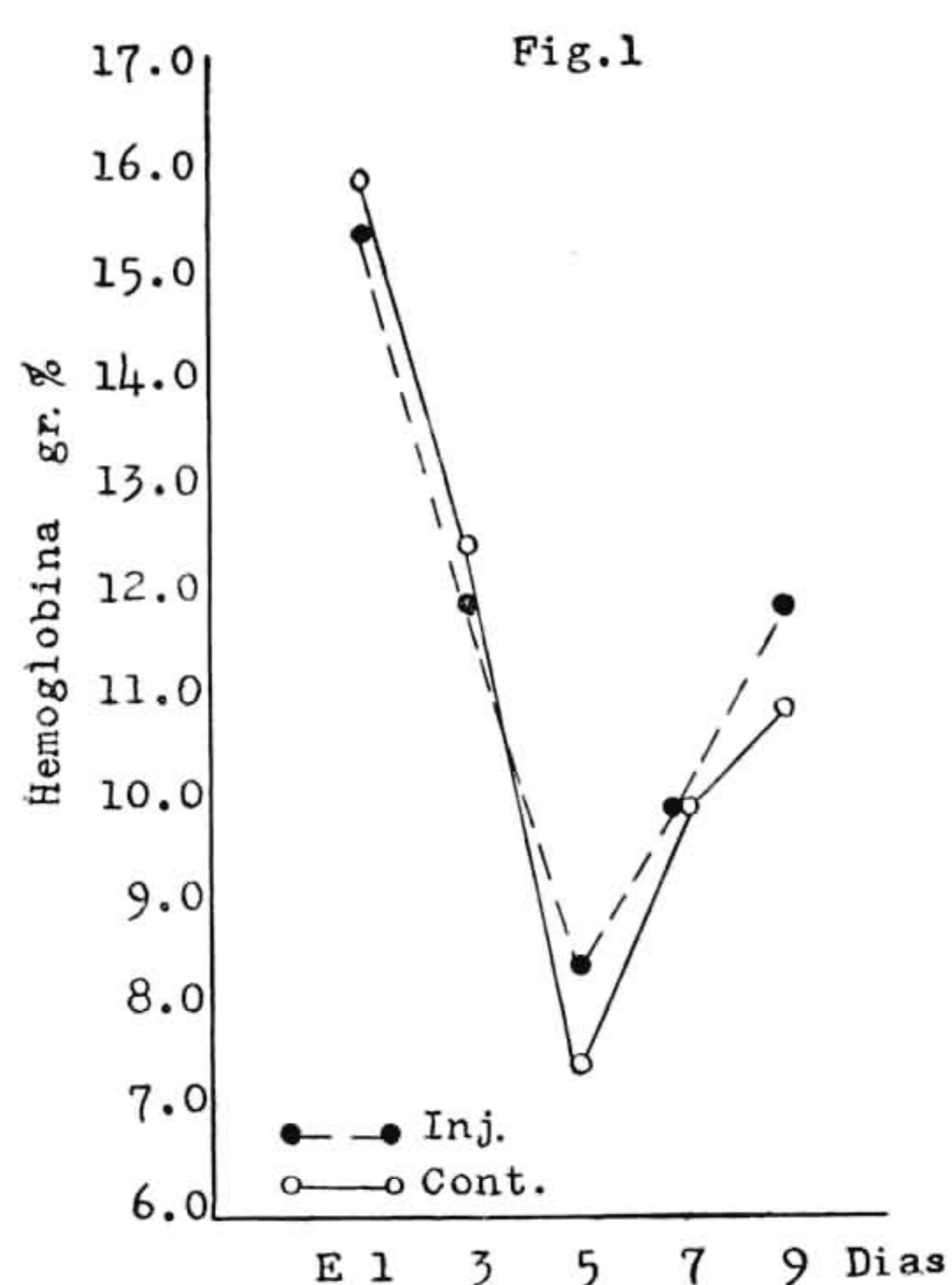


Fig. 1

1.^a Série. Evidência da concórdância da variação da hemoglobina nos 2 lotes. 15 ratos injetados e 12 controles.

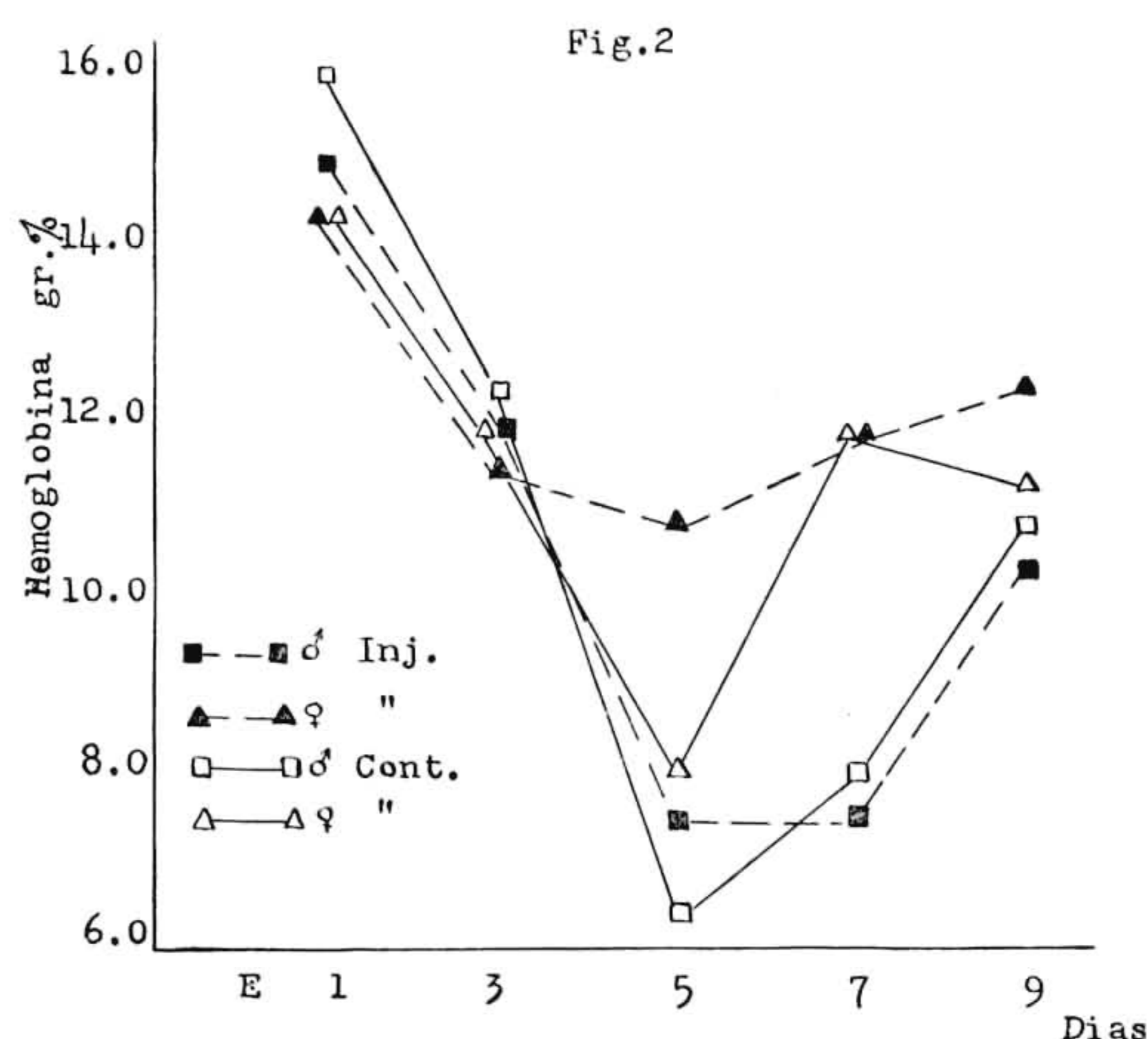


Fig. 2

1.^a Série. A queda da hemoglobina é mais acentuada nos machos. 15 ratos injetados (8 machos e 7 fêmeas) e 12 controles (5 machos e 7 fêmeas).

sete dias da operação oscila em torno de 50%, com um máximo de 60% para os machos (figuras 4 e 8). As fêmeas são ligeiramente mais resistentes e a anemia é, de um modo geral, menos severa. Também a mortalidade entre as fêmeas é ligeiramente menor do que entre os machos. A fig. 8 mostra-nos uma aparente redução da mortalidade nas fêmeas injetadas, mas temos de levar em conta o reduzido número de animais desse sexo em relação ao total; o contraste é evidente, si observarmos a fig. 4 e a tabela III. Pelo protocolo 3 e demais, o aparecimento da hemoglobinúria é de mau prognóstico, pois ela costuma aparecer, no rato esplenectomizado, 24 a 48 horas antes da morte.

PROTOCOLO 1
PENICILINA E BARTONELOSE EXPERIMENTAL

N.º	PESO GR.	SEXO	DATA ESPLENECTOMIA	0,2 cm ³ 3 VEZES AO DIA DURANTE 10 DIAS	HEMOGLOBINA Gr. %						ESFREGAÇOS					OBSERVAÇÕES
					16-3	18-3	20-3	22-3	24-3	4-4	17-3	21-3	23-3	25-3	4-4	
1	110	F	17-3	3×02cc.	13,50	12,75	12,25	9,50	6,25	10,50	N	P	P	P	N	
2	120	F	17-3	3×02cc.	10,25	12,75	12,50	5,50	4,50	10,00	N	P	P	P	N	
3	110	M	17-3	3×02cc.	13,00	14,25	11,00	—	—	—	N	P	—	—	—	+ 22-3
4	125	F	17-3	3×02cc.	12,50	12,00	9,00	5,00	5,75	8,25	N	P	P	P	N	
5	110	M	17-3	3×02cc.	12,50	14,00	13,50	9,00	4,25	6,25	N	P	P	P	N	
6	110	M	17-3	3×02cc.	12,50	14,00	13,50	5,00	3,50	8,50	N	P	P	P	N	
7	100	M	17-3	3×02cc.	11,50	13,00	11,00	3,00	—	—	N	P	—	—	—	Hem. 21-3. + 22-3
8	115	M	17-3	3×02cc.	11,50	13,50	13,50	2,75	—	—	N	P	—	—	—	Hem. 22-3. + 23-3
9	110	M	17-3	3×02cc.	12,50	13,00	5,50	—	—	—	N	—	—	—	—	Hem. 20-3. + 21-3
10	130	F	17-3	3×02cc.	11,50	14,50	13,50	11,50	5,25	—	N	N	P	—	—	+ 22-3
11	110	M	17-3	3×02cc.	14,00	13,25	12,25	—	—	—	N	P	—	—	—	Hem. 21-3.
12	100	M	17-3	3×02cc.	11,50	12,50	13,50	3,50	4,00	10,75	N	P	P	P	P	
13	115	M	17-3	3×02cc.	10,50	11,50	10,50	2,50	3,50	9,50	N	P	P	P	N	Hem. 21-3
14	95	M	17-3	3×02cc.	16,40	13,50	13,50	4,50	4,50	8,75	N	P	P	P	N	
15	100	F	17-3	3×02cc.	13,00	13,00	14,00	5,00	6,75	8,00	N	P	P	P	P	
1	115	M	17-3		12,50	13,00	16,50	—	—	—	N	—	—	—	—	+ 21-3
2	105	F	17-3		11,00	12,50	12,50	4,50	6,00	12,50	N	N?	P	P	N	
3	95	M	17-3		12,50	13,25	12,50	1,75	4,00	10,25	N	P	P	P	N	Hem. 21-3
4	130	F	17-3		12,50	13,75	12,50	2,50	5,25	11,00	N	P	P	P	N	
5	120	M	17-3	Controles	12,50	14,25	15,50	6,75	5,75	9,00	N	P	P	P	N	
6	115	F	17-3		12,50	13,25	14,50	—	—	—	N	P	—	—	—	+ 22-3
7	105	F	17-3		17,00	13,00	15,00	4,25	7,50	12,50	N	P	P	P	N	
8	120	F	17-3		13,50	13,75	13,00	2,00	—	—	N	P	—	—	—	+ 22-3
9	100	M	17-3		11,25	16,00	15,00	—	—	—	N	P	—	—	—	Hem. 21-3. +22-3
10	100	M	17-3		12,75	16,25	12,50	—	—	—	N	P	—	—	—	+ 22-3
11	130	F	17-3		14,00	16,25	16,00	3,75	6,50	13,00	N	P	P	P	N	
12	115	F	17-3		16,50	15,50	14,25	—	—	—	N	—	—	—	—	+ 21-3

N = Ausência de bartonelas nos esfregaços.
Hem. = Hemoglobinúria

P = Presença de bartonelas nos esfregaços
+ = Morte do animal

Nos esfregaços, as bartonelas se apresentam com o aspecto típico, já inúmeras vezes descrito pelos diferentes autores que trabalharam no assunto. Queremos apenas acentuar que as formas em bastonete são raras em nossos preparados, predominando os cocos em cadeias, às vezes de vários elementos. O depósito de corante, muito fino, às vezes encontrado em certas lâminas, permite-nos uma focalização que nos faz pensar que as bartonelas são endoglobulares, na realidade e que as formas esparsas entre os glóbulos, provenham de hemátias fragmentadas, o que é muito comum quando a anemia é muito intensa. Logo de início, aparecem finos grãos nas hemátias. Estes grãos vão aumentando não só de volume como de número com o desenvolvimento da anemia. Em alguns preparados podem contar-se mais de

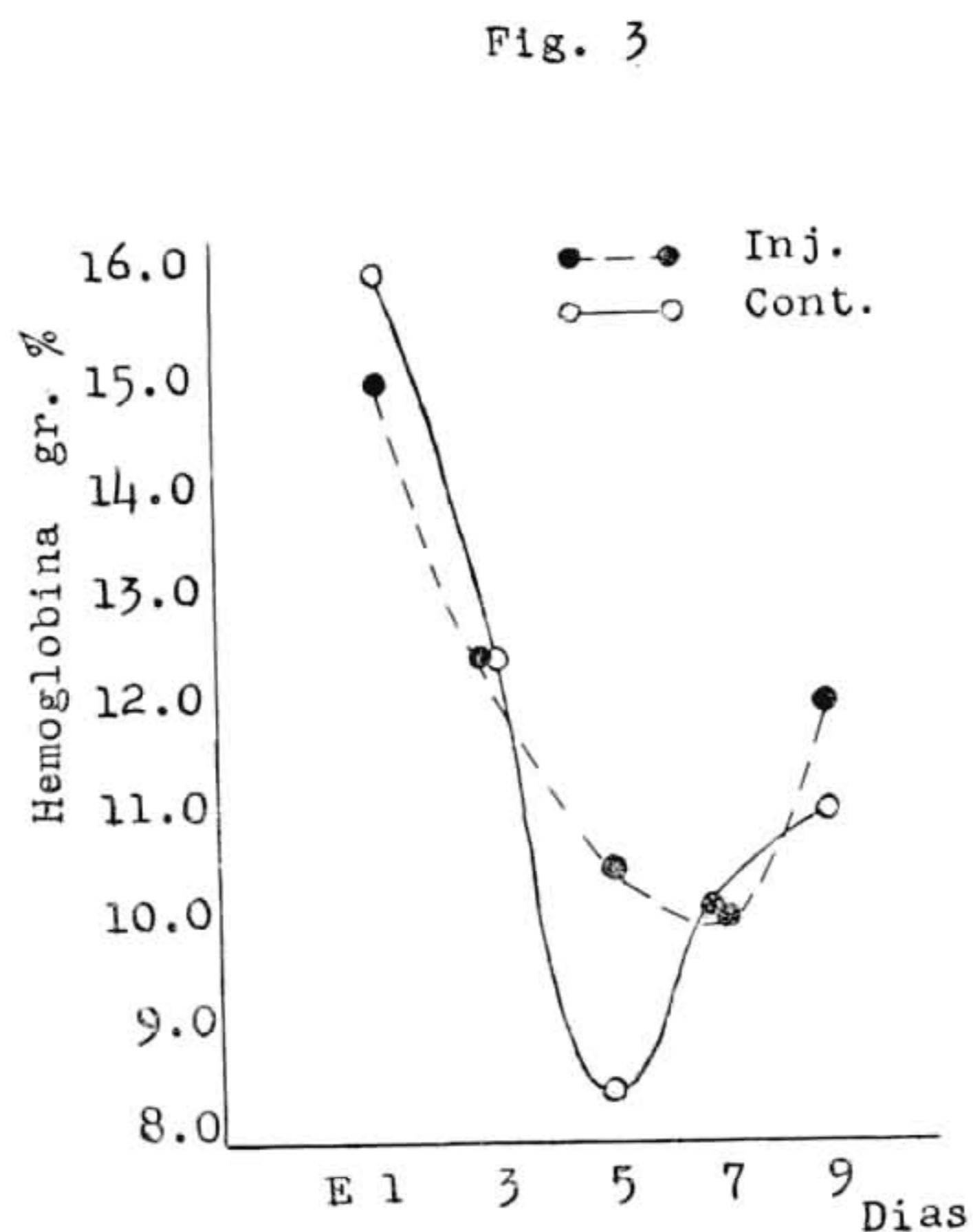


Fig. 3

1.^a Série. Gráfico obtido com os valores médios dos sobreviventes após 9 dias (8 animais para cada lote)

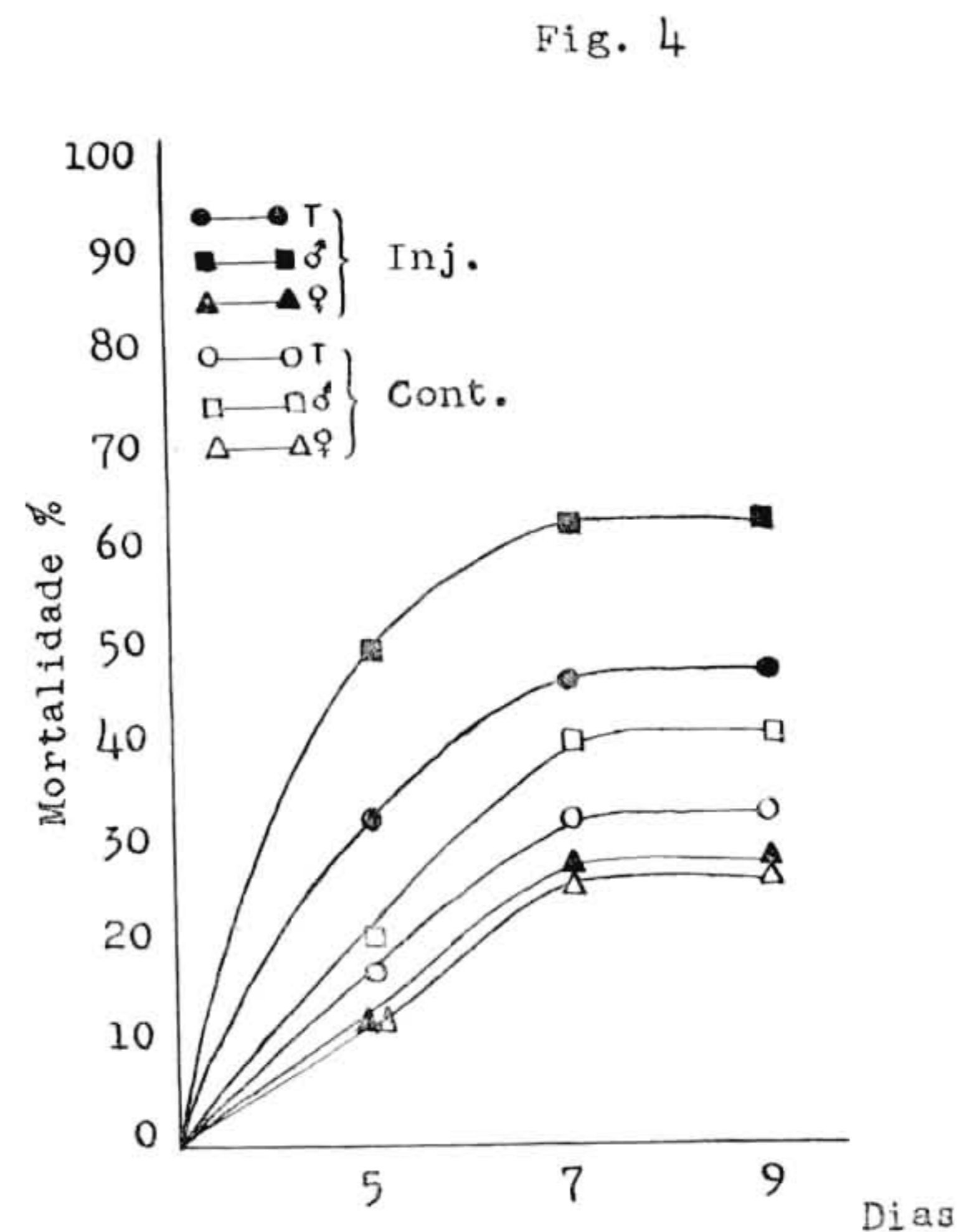


Fig. 4

1.^a Série. A maior mortalidade dos machos elevou a mortalidade média de cada lote. 15 ratos injetados (8 machos e 7 fêmeas) e 12 controles (5 machos e 7 fêmeas).

40 elementos numa só hemátia e as hemátias parasitadas com vários elementos é a regra. As lâminas feitas em plena anemia, mostram apenas hemátias parasitadas, sendo que os policromatófilos não apresentam parasitos. O exame porém, de lâminas feitas logo no início, mostra que eles também são atingidos. Baseando-nos no fato de que a série vermelha do rato normalmente já se apresenta em quadro típico de intensa regeneração, acreditamos que a invasão das hemátias se dá bruscamente e atinge um máximo logo de início; nêsse período os policromatófilos também são atingidos. A presença desses elementos sem bartonela nos dias seguintes deve correr a conta, seja da sua rápida evolução para hemátia, seja pela sua destruição,

uma vez que trazem em si o elemento estimulante da fagocitose por parte das células de retículo-endotélio. O processo parece realizar-se do mesmo modo que para a anemia pela fenilhidrazina (pirodina).

Ao fim de 3-4 dias de infecção e anemia, o quadro sanguíneo é tipicamente regenerativo, caracterizado por anisocitose com macrocitose, intensa policromatofilia, presença de normoblastos e de corpos de Jolly.

De todos os animais, apenas quatro não apresentaram queda evidente da hemoglobina, o que coincidiu com a presença de poucas bartonelas em algumas hematias ao fim de 4-6 dias após a esplenectomia ou mesmo ausência completa do parasito.

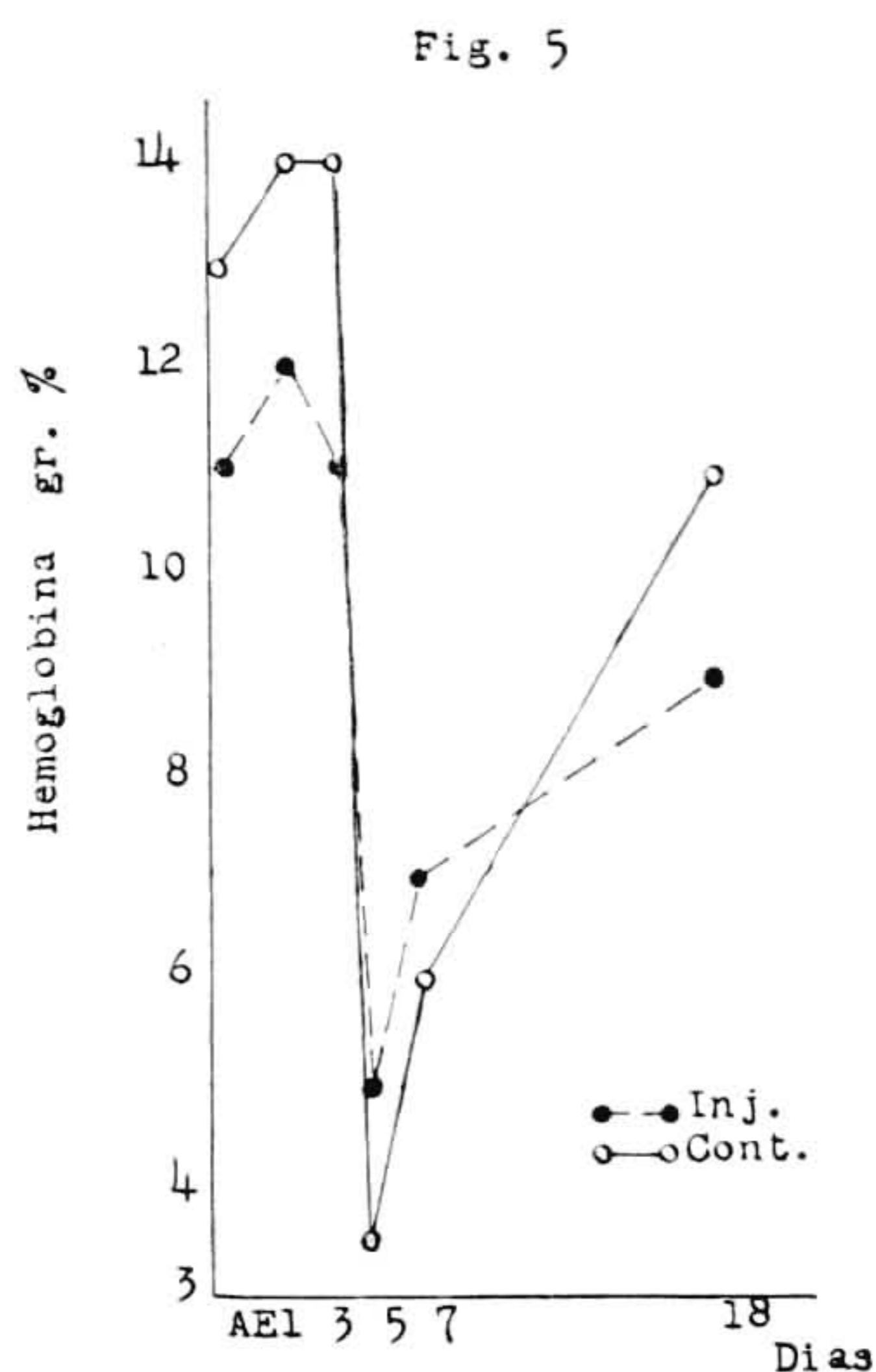


Fig. 5

2.^a Série. Concordância com a fig. 1. 15 ratos injetados e 12 controles.

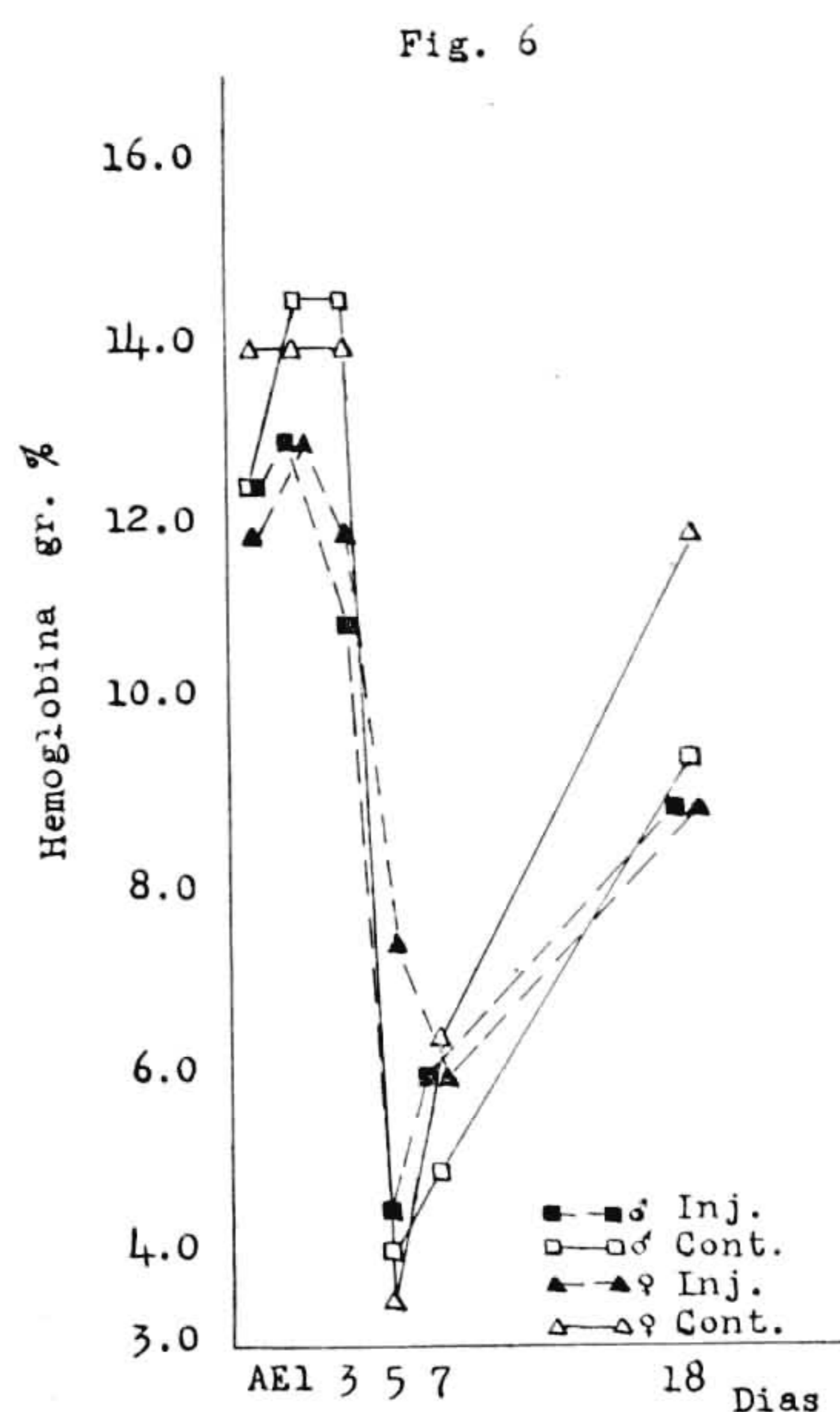


Fig. 6

2.^a Série. Nota-se também aqui maior resistência das fêmeas. 15 ratos injetados (10 machos e 5 fêmeas) e 12 controles (5 machos e 7 fêmeas).

Nos ratos em que praticamos a hepatectomia parcial, retirando cerca de 2/3 do órgão, não conseguimos reproduzir o quadro da bartonelose. Deve-se apontar, porém, que o número de animais foi muito pequeno para se tirar conclusões definitivas. Notamos, porém, uma série de fatos interessantes quanto à influência desta hepatectomia parcial sobre a função sexual das fêmeas, o que nos despertou a atenção para investigações posteriores. Visando exclusivamente observar o aparecimento da bartonela no sangue cir-

culante e por não notarmos sinais de anemia, tão berrantes na bartonelose, limitamo-nos, somente, a fazer esfregaços de sangue. No entanto, eliminando-se qualquer causa de erro devida ao método de coloração, observamos uma progressiva diminuição da afinidade cromática das hematias para o Giemsa. O campo microscópico apresenta policromatófilos, plaquetas e leucocitos perfeitamente corados, ao passo que os eritrócitos apresentam-se pálidos, difíceis de ver. O fato é interessante, uma vez sabido que a fixação do Giemsa se processa sobre a própria hemoglobina da hematia, mas merece estudo mais detalhado.

Fig. 7

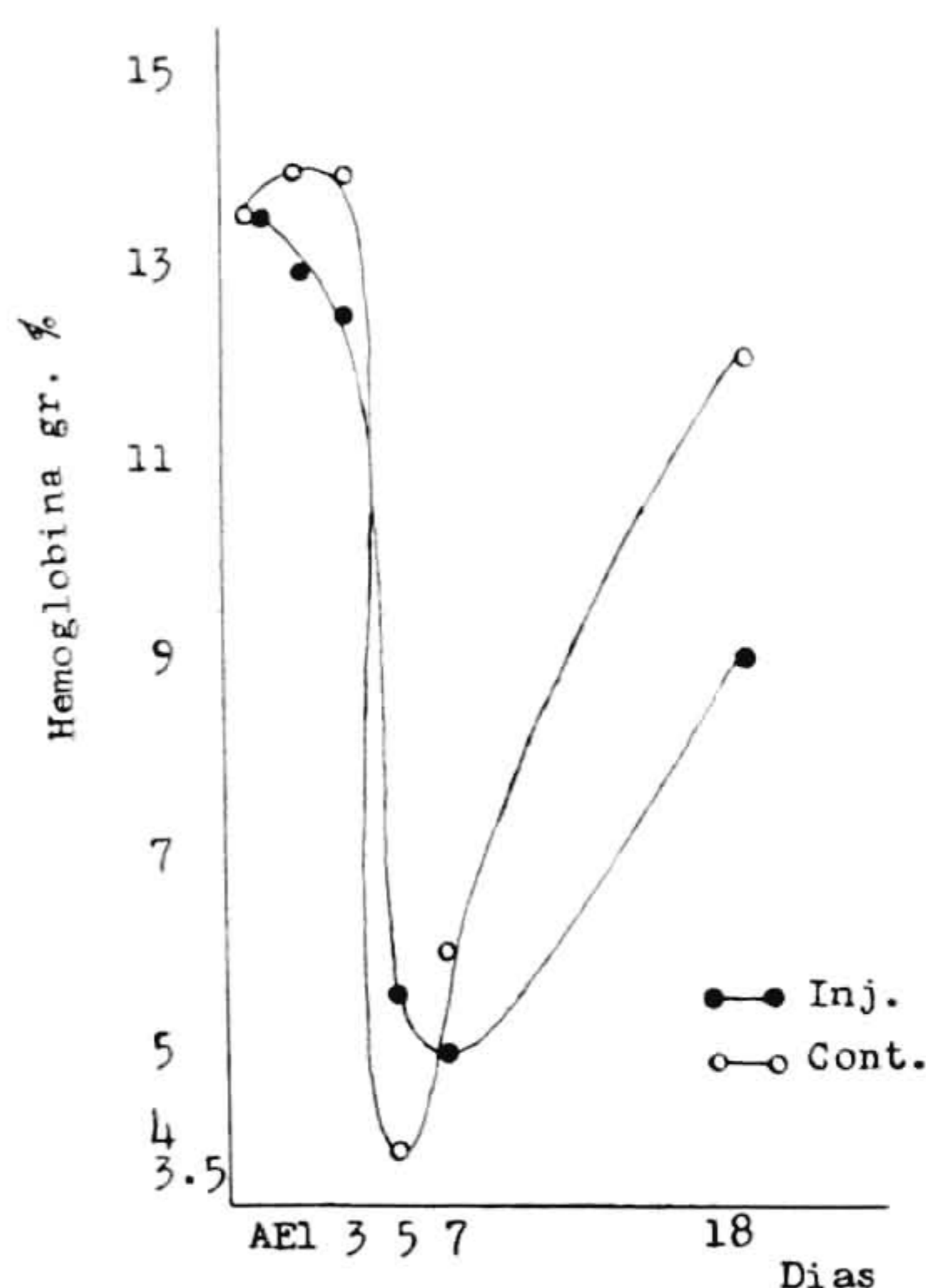


Fig. 7

2.^a Série. Notar a semelhança com a fig. 3 e a curva característica, semelhante à da anemia por fenilhidrazina. 15 ratos injetados e 12 contrôles.

Fig. 8

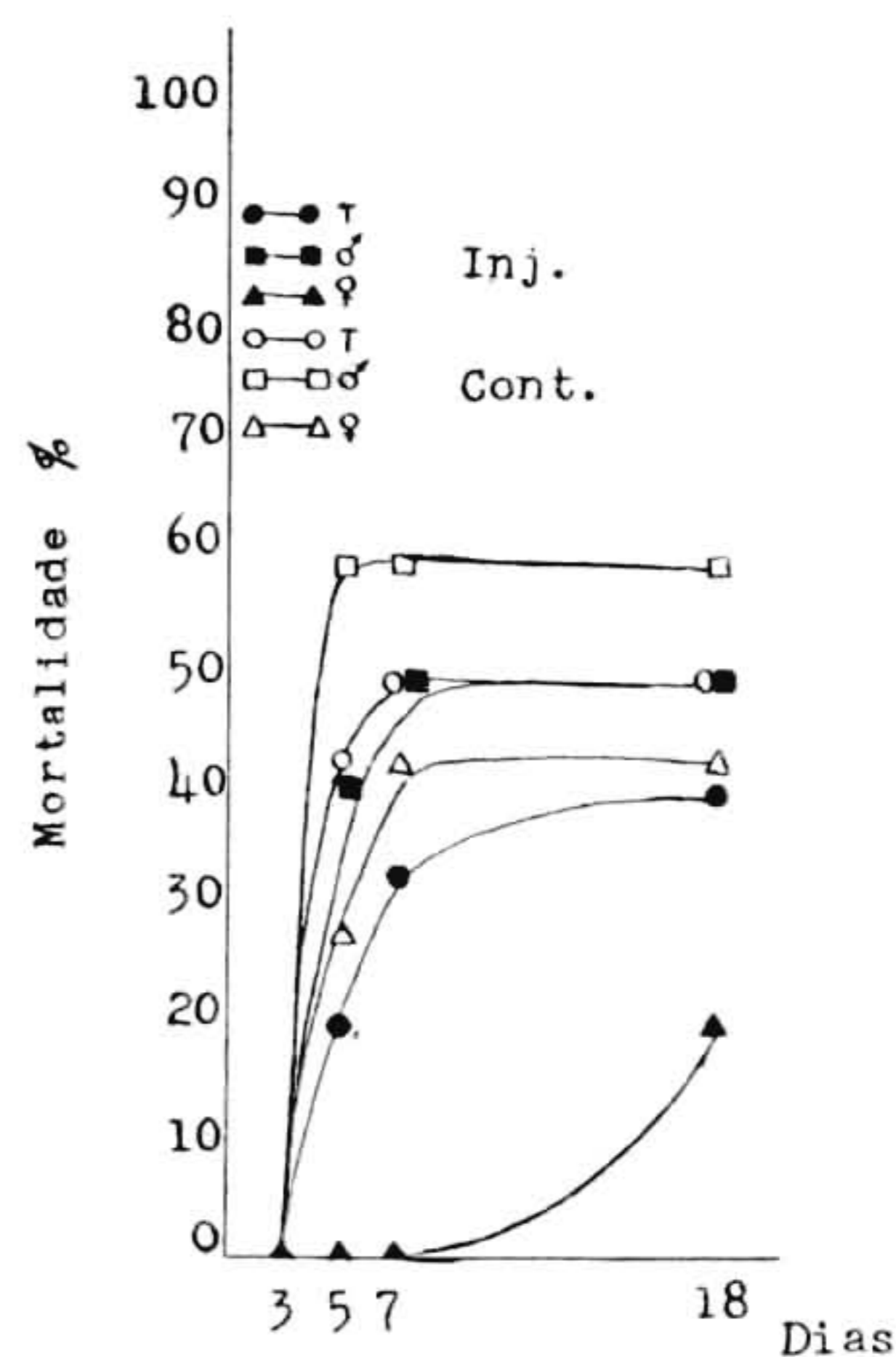


Fig. 8

2.^a Série. Evidencia-se também uma maior mortalidade entre os machos. 15 ratos injetados (10 machos e 5 fêmeas) e 12 contrôles (5 machos e 7 fêmeas).

Estas experiências de hepatectomia foram feitas no sentido de eliminar-se qualquer ação inespecífica da esplenectomia como fator de traumatismo e também pelas relações vasculares fígado-baço. A influência do traumatismo foi apontada por SAUERBRUCH (48). Acha este autor que a mortalidade verificada em experiências comuns de parabióse decorra como uma consequência da bartonelose que se desenvolveria no par. Ora, nessas experiências de parabióse o par é constituído por animais com baços íntegros e, segundo SAUERBRUCH o traumatismo, inespecífico no caso, seria o responsável pela bartonelose. A explicação de SAUERBRUCH estaria então em desacôrdo com a experiência já citada de LAUDA; nessa experiência há proteção no caso dos pares constituídos por um animal com baço íntegro e outro esplenectomiza-

do. Ora, se um só baço pode proteger dois animais, como admitir-se que nos pares onde há dois baços essa proteção não se verifique? Aliás, em experiências não publicadas, Thales Martins pôde confirmar a experiência de LAUDA & FLAUM.

DISCUSSÃO

No correr de nosso trabalho, cuja parte experimental visa o estudo das condições em que se processa a bartonelose no rato esplenectomizado e as suas características e a procura de uma ação impediente da penicilina sobre a bartonelose nestas condições, surgiram vários fatos que merecem ser apontados.

De um modo geral, consideramos a queda da hemoglobina e a sua regeneração em função do tempo de infecção, tanto para o conjunto dos lotes de animais, como para os dois sexos em cada lote, pela média dos valores correspondentes aos animais vivos, durante todo o período. Aproximamos sempre os valores a 0.5 gr %, pois o método não permite maior exatidão. Estudamos também a influência do sexo, não só na mortalidade, como na evolução da infecção e sua gravidade, avaliados pelo número de hematias parasitadas e pelo grau da anemia.

Encontramos divergências entre os autores que trabalharam no assunto, no tocante ao tipo de anemia. Acreditamos que elas resultem não só por diferenças terminológicas como por ser feito o estudo em diferentes períodos da crise anêmica. Segundo SAN MARTIN (47) a queda da hemoglobina se processa mais rapidamente do que a das hematias, do mesmo modo que a sua regeneração é mais ativa e rápida. Evidentemente, no período regenerativo, que se estabelece rapidamente, eleva-se o valor globular e o quadro será de uma anemia hiperocrômica, macrocítica, já que o reticulocito é normalmente uma célula volumosa. Evidentemente não se pode conferir o termo de anemia perniciosa, neste caso, como querem alguns autores latinos; o quadro resulta da ativa regeneração da série vermelha. Não podemos concluir pessoalmente sobre o assunto baseados em fatos experimentais, por termos tomado somente a queda da hemoglobina como índice que nos permitiu estudar a sua evolução em relação à bartonela presente ou não nas hematias do sangue circulante.

As nossas duas primeiras séries, confirmando a experiência anteriormente adquirida no laboratório por um de nós, mostram objetivamente que a bartonelose do rato esplenectomizado se desencadeia antes do 6.º dia e

TABELA I

DIAS APOS ESPLENEC- TOMIA	FREQUENCIA DE BARTONELAS					
	Injetados			Contrôles		
	T	♂	♀	T	♂	♀
Antes.....	0/15	0/8	0/7	0/12	0/5	0/7
1.....	0/15	0/8	0/7	4/12	2/5	2/7
4.....	12/15	8/8	4/7	10/12	4/5	6/7
6.....	6/9	2/3	4/6	4/7	1/2	3/5
8.....	1/8	1/3	0/5	2/8	1/3	2/5

1ª. Série O denominador indica o número de animais vivos e o numerador o de animais com bartonelas.

TABELA II

DIAS APOS ESPLENEC- TOMIA	FREQUENCIA DE BARTONELAS					
	Injetados			Contrôles		
	T	♂	♀	T	♂	♀
Antes.....	0/15	0/10	0/5	0/12	0/5	0/7
4.....	13/14	9/9	4/5	9/11	4/4	6/7
6.....	10/10	5/5	5/5	6/6	2/2	4/4
8.....	9/9	5/5	4/4	6/6	2/2	4/4
18.....	2/9	1/5	1/4	0/6	0/2	0/4

2.ª Série. O denominador indica o número de animais vivos e o numerador o de animais com bartonelas

já aos 8-9 dias morreu a maioria dos animais infectados. A mortalidade máxima oscila em torno de 50%, diferentemente do que observaram PERLA & GOTTESMAN (20). Apontam estes autores uma maior mortalidade no verão (22), não admitindo uma variação da virulência da bartonela, como quer ADLER (1), mas uma influência climática, baseados nos dados de KIRSCHNER & TIMMERMAN (29). Segundo PERLA, verificaram estes autores uma mortalidade de 96% em Jerusalém, 30% em Hamburgo e 70% em Sumatra. Todavia, consultando o trabalho apontado, somente encontramos os dados referentes à bartonelose experimental do rato albino e do rato doméstico em Bandoeng, Java (40% para o rato doméstico e 75% para o rato albino).

A nossa observação de que a coloração vermelha da urina decorre de hemoglobinúria (ausência de hemátias) concorda com a de PERLA & GOTTESMAN (40). A diminuição da resistência globular e a intensa hemocaterese acompanhada de lesão da célula hepática, explicam, não só a icterícia como a capacidade infectante da urina dos ratos anemiados. Também a maior sensibilidade dos machos já tinha sido verificada (12). Evidentemente, não podemos deixar de apontar que as doses de penicilina utilizadas por nós talvez sejam insuficientes. Todavia, não só se encontram na literatura citações de efeitos variados da penicilina, mesmo em doses elevadíssimas, como o comportamento estranho da bartonelose e de outras doenças sensíveis aos mesmos agentes terapêuticos. Assim, AUGUSTINE, em 1944, obtém ótimos resultados com a penicilina na febre recorrente experimental e falência absoluta da droga na tripanosomiase (*T. lewisi*) e na toxoplas-

TABELA III (3.^a série)

LOTES	NUMERO INICIAL DE RATOS ESPLENECTOMIZADOS	SOBREVIVENTES APOS 6 DIAS	TRATAMENTO	ANIMAIS COM BARTONELA		HEMOGLOBINA GR% MÉDIA DOS SOBREVIVENTES	
				Antes da esplenectomia	6 dias após	Antes da esplenectomia	6 dias após
♂	4	3	Penicilina	0	2	13,0	11,5
	5	3	—	0	3	13,0	12,5
♀	6	5	Penicilina	0	1	12,0	13,0
	5	5	—	0	2	13,0	11,5
TOTAL.....	10	8	Penicilina	0	3	11,5	12,5
	10	8	—	0	5	13,0	10,5

mose (2). No entanto, HEILMAN & HERRELL (24) obtêm resultados favoráveis na leptospirose icterohemorrágica experimental de cobaios de 250-300 gr, com doses de 100-200-500 e 1.000 U. O. Por outro lado, EMERY (13) observou a ineficácia da sulfamida na bartonelose do rato na dose de 500 mgr. por quilo de pêso. Parece-nos que 400 U. O. por quilo de rato deveriam influir, se tomarmos por base as doses usadas no homem; assim, se a penicilina agir na bartonelose do rato, certamente serão necessárias doses muito maiores, como pretendemos verificar posteriormente.

Somos muito gratos ao Dr. Thales Martins pela orientação segura e apoio em todo momento que nos dispensou e ao Dr. Walter O. Cruz pelo inestimável auxílio que nos prestou quanto à parte hematológica do nosso trabalho.

CONCLUSÕES

1. Os ratos albinos do Instituto Oswaldo Cruz, uma vez esplenectomizados, desenvolvem praticamente 95% de bartonelose.
2. O início da queda da hemoglobina, na anemia por bartonelose do rato esplenectomizado, coincide perfeitamente com o aparecimento das bartonelas nos esfregaços de sangue circulante.
3. Em nosso meio, o desencadeamento da anemia, no rato albino esplenectomizado, caracteriza-se por um aparecimento mais precoce (3.^o dia) e por uma evolução severa e rápida, em relação aos resultados publicados em outros países.

4. A mortalidade observada, que é mais elevada nos machos, orça em 50%.
5. A hemoglobinúria, atestando a amplitude da lesão orgânica, é um índice prognóstico desfavorável.
6. Em seis animais com hepatectomia parcial não se manifestou a bartonelose em presença de baço íntegro. Embora reduzido o número de experiências, elas sugerem que mesmo um grande traumatismo pode ser insuficiente para desencadear a anemia.
7. Na dose de 400 U.O. por quilo de rato, a penicilina bária fabricada no Instituto Oswaldo Cruz não influencia a mortalidade, o grau de anemia e a intensidade da infecção, nem confere qualquer outra espécie de proteção contra a bartonelose do rato albino esplenectomizado. Assim, se a droga tem algum efeito, só o exercerá em doses muito maiores.

RESUMO

Os A. A., visando aplicar a bartonelose do rato albino esplenectomizado como teste para o estudo das funções do baço, uma vez que há evidência de um mecanismo de proteção de natureza hormonal, estudam a evolução da anemia nesse animal após a esplenectomia.

Discutem os principais aspectos e trabalhos sobre o assunto. Comparam a anemia da bartonelose à da fenilhidrazina e discutem a influência dos traumatismos inespecíficos sobre o desencadeamento dessa infecção. Aproveitam o material para a verificação do efeito terapêutico da penicilina bária, fabricada no Instituto Oswaldo Cruz, na bartonelose experimental do rato albino. Descrevem os métodos e concluem sobre a extrema sensibilidade dos animais utilizados e da ineficácia da penicilina, pelo menos na dose empregada.

SUMMARY

The A. A. intending to use *Bartonellosis* of splenectomized rats as a test of spleen functions, since there is evidence of an hormonal protective mechanism, study the evolution of anemia in this animal after splenectomy. They discuss the principal aspects and papers about the subject. They compare the *Bartonella muris* anemia to the phenylhydrazine anemia and the influence of inespecific trauma as regard the appearance of this infection. They profit the material for the verification of the therapeutics effect of ba-

rium penicillin produced at the Instituto Oswaldo Cruz, over the experimental *Bartonella muris* anemia of splenectomized albino rats. They describe the methods and give the results in respect of the extreme sensibility of the animals employed and the ineffectiveness of penicillin at least in the dosage used.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ADLER, S.
1930. The results of splenectomy in white mice as indicated by their reactions to *Bartonella muris*.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 24 : 75-82.
- 2) AUGUSTINE, D. L.
1944. Rapid and sterilizing effect of penicillin sodium in experimental relapsing fever infections and its ineffectiveness in the treatment of trypanosomiasis (*T. lewisi*) and toxoplasmosis.
Science, 99 : 19 (Jan. 7.)
- 3) BATTISTINI, T.
1925. Contribución al estudio de la Verruga peruana.
An. Fac. Med. Lima. N.º Ext. Octubre 1.º.
- 4) CANNON, P. R. — McCLELLAND, P. H.
1929. The reticulo-endothelial system in the infectious anemia of albino rats.
Arch. Path., 7 : 787-800.
- 5) CARINI, A.
1915. Corps de Graham-Smith dans les hématies du *Mus decumanus*.
Bull. Soc. Pathol. Exot., 8(3) : 103-104.
- 6) COWDRY, E. V.
1926. Rickettsiae and disease. General Review.
Arch. Path. Lab. Med., 2 : 59-90.
- 7) CRUZ, W. O. — ROBBINS, R. F. S.
1942. Relationship between the spleen and the morphologic picture of blood regeneration.
Am. J. Med. Sc., 203 : 28-34.
- 8) CRUZ, W. O.
1941. Acetylphenylhydrazine Anemia. 1. The Mechanism of Erythrocyte Destruction and Regeneration.
Am. J. Med. Sc., 202 : 781-798.

- 9) CUNHA, A. M. — MUNIZ, J.
1926. Sobre uma nova espécie de Bartonella parasita do sangue e órgãos do Leptodactylus ocellatus.
Boletim Biológico, 2 : 25.
- 10) CUNHA, A. M. — MUNIZ, J.
1927. Pesquisas sobre Verruga peruana experimental.
Boletim Biológico, 9 : 135.
- 11) CUNHA, A. M. — MUNIZ, J.
1928. Considerações a respeito da Verruga peruana.
Scienza Medica, 6 : 293.
- 12) EDERLE, W. — KRIECH, H.
1931. Über die Wirkung des injizierbaren Leberextrakts nach Gäusslen im Tierversuch.
Klin. Woch., 10 : 25-26.
- 13) EMERY, F. E.
1940. Treatment of Bartonella muris infection with sulfanilamide.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44 : 56-57.
- 14) FARIA, J. G. — PINTO, C.
1926. Sur une nouvelle Bartonella (Bartonella rochalimai) parasite de Hemidermabrevicauda, Wied.
C. r. soc. biol., 95 : 1500-1501.
- 15) FARIA, J. G. — CRUZ F.º, O.
1927. Sur les localisations viscérales de Bartonella muris (Carini)
C.r.soc.biol., 96 : 489-91.
- 16) FELDT, A. — SCHOTT, A.
1931. Die Rolle des Retikuloendothels beim chemotherapeutischen Heilungsvorgange.
Z. Hyg. u. Infektionskrankh., 107 : 453-471.
- 17) FORD, W. W. — ELIOT, C. P. (*)
1928. Rat anemia and Bartonella muris ratti.
Tr. A. Am. Physicians, 43 : 95-102.
- 18) FORD, W. W. — ELIOT, C. P.
1930. Immunity and the mechanism of splenic control in Bartonella anemia of rats.
Am. J. Hyg., 12 : 669-676.
- 19) GEIMAN, Q. M.
1941. New media for the growth of Bartonella Bacilliformis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47 : 329-332.

-
- 20) GOTTESMAN, J. M. — PERLA, D.
1930. Studies on Bartonella muris anemia of albino rat. Trypanosoma lewisi infection in normal albino rats associated with bartonella muris anemia. Latent infection in normal adult rats.
J. Exp. Med., 52 : 121-129.
- 21) GOTTESMAN, J. M. — PERLA, D.
1931. Studies on Bartonella muris anemia. Compensatory phenomena following splenectomy in the adult albino rat.
J. Exp. Med., 53 : 877-884.
- 22) GOTTESMAN, J. M. — PERLA, D.
1932. The effect of bilateral suprarenalectomy in adult albino rats on the natural and acquired resistance to bartonella muris anemia.
J. Exp. Med., 55 : 109-110.
- 23) GOTTESMAN, J. M. — PERLA, D.
1932. The etiology of bartonella muris anemia of the albino rat. The isolation of Bartonella muris.
J. Exp. Med., 56 : 763-776.
- 24) HEILMAN, F. R. — HERREL, W. E.
1944. Penicillin in the treatment of experimental leptospirosis icterohaemorrhagica (Weil's disease).
Proc. of the Staff meetings of the Mayo Clinic, 19 : 89 (Feb.)
- 25) HEILMEYER, L. — SUNDERMANN, A.
1936. Dtsch. Arch. Klin. Med., 178 : 397 ("in" La Colorimetrie Clinique a l'aide du Photomètre de Pulfrich " Zeiss-Jena pg. 47).
- 26) HURTADO, A.
1938. La anemia en la Enfermedad de Carrion (Verruga peruana).
An. Fac. Cien. Med. Lima. (1) : 25-224.
- 27) JAFFE, R. H. — WILLIS, D.
1928. Bartonella infections in local rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 25 : 242.
- 28) KIKUTH, W.
1928. Über einen neuen Anämieerreger, Bartonella canis nov. spec.
Klin. Woch., 7 : 1729-1730.
- 29) KIRSCHNER, L. — TIMMERMAN, W. A.
1930. Onderzoekingen over Infectie met Bartonellae bij Ratten in Nederlandsch-Indië.
Geneesk. Tijdschr. Nederland. — Indie, 70 : 235-240.

- 30) LAUDA, E. — FLAUM, E.
1930. Studien über die Beziehungen der Milz zur Resistenz der ratten gegen die infektiöse Anämie.
Z. ges. exp. Med., 73 : 293-314.
- 31) LWOFF, A. — VAUCCEL, M.
1931. Bartonelloses et infections mixtes.
Ann. Inst. Pasteur, 46 : 258-276.
- 32) MACMILLAN, R. E.
1928. The so-called hemal nodes of the white rat, guinea-pig, and sheep. A study of their occurrence, structure, and significance.
Anat. Rec., 39 : 155-176.
- 33) MAHONEY, J. F. et al.
1943. Penicillin treatment of early syphilis. A preliminary report.
Am. J. Pub. Health, 33 : 1387 (Dec.).
- 34) MARINE, D. — MANLEY, C. T.
1920. Homeotransplantation and autotransplantation of the spleen in rabbits. Further data on growth, permanence, effect of age, and partial or complete removal of the spleen.
J. Exp. Med., 32 : 113-133.
- 35) MEYER, M.
1921. Über einige bakterienähnliche Parasiten der Erythrozyten bei Menschen und Tieren.
Arch. f. Schiffs. u. Tropen.-Krankh., 25 : 150-152.
- 36) MAYER, M. — KIKUTH, W.
1927. Zur Aetiologie und Einheit der Verruga peruviana und des Oroyafiebers.
Festschrift Bernhard Nocht 70. Geburtstag. 319-327.
- 37) NOGUCHI, H.
1926. Etiology of Oroya Fever. The behavior of Bartonella bacilliformis in Macacus rhesus.
J. Exp. Med., 44 : 697-714.
- 38) NOGUCHI, H.
1926. Etiology of Oroya Fever. The effect of inoculations of anthropoid apes with Bartonella bacilliformis.
J. Exp. Med., 44 : 715-728.
- 39) PERLA, D. — GOTTESMAN, J. M.
1930. Studies on bartonella muris anemia. The protective effect of autoplasmic splenic transplants on the bartonella muris anemia of splenectomized rats.
J. Exp. Med., 52 : 131-144.

-
- 40) PERLA, D. — GOTTESMAN, J. M.
1931. Studies on bartonella muris anemia. Pathological changes during the acute anemia.
J. Exp. Med. 53 : 869-876.
- 41) PERLA, D. — GOTTESMAN, J. M.
1932. Studies on bartonella muris anemia. A lipoid extract of spleen that prevents bartonella muris anemia in splenectomized albino rats.
J. Exp. Med., 56 : 777-782.
- 42) PERLA, D. — GOTTESMAN, J. M.
1932. Studies on bartonella muris anemia. The protective action of copper and iron against bartonella muris anemia.
J. Exp. Med., 56 : 783-792.
- 43) PINKERTON, H. — WEINMAN, D.
1937. Carrion's disease. Behavior of the etiological agent within cells growing or surviving "in vitro".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 2 : 59-90.
- 44) PINKERTON, H. — BESSEY, O. A.
1939. The loss of resistance to murine typhus infection resulting from riboflavin deficiency in rats.
Science, 89 : 368-370.
- 45) REGENDANZ, P. — KIKUTH, W.
1928. Über Aktivierung labiler Infektionen durch Entmilzung (*Piroplasma canis*, *Nuttalia brasiliensis*, *Bartonella opossum*, *Spirochaeta didelphydis*).
Arch. f. Schiffs. U. Tropenhyg., 32 : 587-593.
- 46) ROSENTHAL, L. — ZOHMANN, B. L.
1931. Bartonella anemia in non-splenectomized rats.
Arch. Path., 12 : 405-412.
- 47) San MARTIN, A.
1930. Das Blutbild der splenectomierten weissen Ratten und ihre Bartonella-Einschlüsse in den roten Blutkörperchen. Inaug. Dissert.
- 48) SAUERBRUCH, F. — KNAKE, E.
1936. Über die Bedeutung der Milz bei Parabiosetieren.
Klin. Woch., 15 : 884-886.
- 49) SCHILLING, V.
1929. Weitere beiträge zur Bartonella muris ratti, ihre Übertragung auf weisse Mäuse und eine eigene Bartonella muris musculi n. sp. bei splenektomierten weissen Mäusen.
Klin. Woch., 8 : 55-58.

- 50) SORGE, G.
1929. Le infezioni da "Bartonella" dell'uomo e degli animali.
Biologie Medical n.º 10.
- 51) STRONG, R. P. et al.
1915. Report of First Expedition to South America (Harvard School of Tropical
Medicine).
Cambridge. Harvard University Press.
- 52) TALIAFERRO, W. H.
1929. The immunology of parasitic infections.
The Century Co. New York.
- 53) WARTHIN, A. S.
1902. The changes produced in the hemolymph glands of the sheep and goat by
splenectomy, hemolytic poisons, and hemorrhage.
J. Med. Res., 7(2, New Ser.) : 435-463.
- 54) WEISS, P.
1941. Sôbre inmunidad en la Verruga peruana. Contribución al estudio com-
parado de las Bartonellas.
Rimac. Lima-Perú.
- 55) ZINSSER, H. — SCHOENBACH, E. B.
1937. Studies on the physiological conditions prevailing in tissue cultures.
J. Exp. Med., 66 : 207-227.

(*) Este trabalho não foi consultado no original.