

MEMORIAS  
DO  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 34

Ano—1939

Fasciculo 2

Febre maculosa \*

Identidade imunologica dos virus de Minas Gerais,  
São Paulo e das Montanhas Rochosas

por

J. Travassos  
Instituto Butantan — São Paulo

e

Emmanuel Dias  
Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro

(Com 14 graficos no texto)

Indice	Pags.
Introdução.....	149
Material.....	150
Próvas de imunidade crusada.....	151
Próvas de vacinação.....	162
Próvas de reestimulação antigenica.....	171
Sumario e discussão.....	173
Conclusão.....	178
Bibliografia.....	178

INTRODUÇÃO

Em 1929 foi reconhecida a existencia, no Brasil, de uma modalidade de rickettsiose que, por sua sintomatologia e alta mortalidade, por seus agentes transmissores (Ixódidas), por seu aspéto epidemiológico e pelo comportamento experimental do virus, filia-se ao grupo da fêbre maculosa das Montanhas Rochosas. A doença foi até agora observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, sobretudo nas zonas rurais e semi-rurais

\* Recebido para publicação a 29 de Agosto de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

que circundam as cidades de São Paulo e Bélo Horizonte, tendo sido inicialmente conhecida pelas designações de « tifo exantematico de São Paulo » e « tifo exantematico de Minas Gerais ».

Si bem que pesquisas anteriores já tenham estabelecido a identidade imunológica entre o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas e o de São Paulo, não foi ainda realizado um estudo comparativo aprofundado do virus de Minas Gerais quér com o de São Paulo, quér com o das Montanhas Rochosas, nem o dos tres virus entre si.

Visando assentar definitivamente a relação imunologica entre os virus isolados no Brasil (virus São Paulo e virus Minas Gerais) e o do tipo Oéste das Montanhas Rochosas, procedemos a uma série de próvas cuja descrição e resultados constituem objéto do presente trabalho.

Foram as seguintes as próvas realizadas: 1) próvas de imunidade crusada; 2) próvas de vacinação; 3) próvas de reestimulação antigenica.

### MATERIAL

Utilisámo-nos nestas próvas das seguintes amostras de virus: Virus São Paulo — amostras isoladas por um de nós (J. T.) de caso humano de febre maculosa (virus S. P. h.) e de carrapatos naturalmente infectados, da espécie *Amblyomma striatum* (virus S. P. L. XI e S. P. L. II).

Virus Minas Gerais (M. G.) — Amostra de origem humana, isolada em Bélo Horizonte pelo Dr. Otavio de Magalhães; recebemo-la do Dr. R. R. Parker, dos Estados Unidos, em *Dermacentor andersoni* experimentalmente infectados.

Virus Rocky Mountain (R. M.) — Amostra do Oéste de Montana (Bitterroot Valley), recebida igualmente do Dr. Parker em *Dermacentor andersoni* gentilmente remetidos por via aérea.

Todas estas amostras foram conservadas em Butantan por passagens sucessivas em cobaias. Além de quadro anatomo-clinico semelhante, todas elas demonstraram grande virulencia para este animal, determinando elevada mortalidade. A que mais patogenica se mostrou foi a amostra de Minas Gerais.

A amostra S. P. h. já contava com mais de 300 passagens em co-baia quando dela nos servimos nestas experiencias, ao passo que as S. P. L. II e S. P. L. XI, originarias de carrapato, haviam sido recentemente isoladas e contavam com pequeno numero de passagens.

Uma amostra de virus Minas Gerais que trouxemos de Bélo Horizonte em cobaias inoculadas por O. Magalhães não pôde ser empregada

nestas experiencias, que já haviam sido iniciadas com a amostra procedente dos Estados Unidos.

Nossas pesquisas foram todas realizadas nos laboratorios da Seção de Virus e Virusterapia do Instituto Butantan.

### PROVAS DE IMUNIDADE CRUSADA

Estas provas consistiram na reinoculação, após praso suficiente, de cobaias que sobreviveram á infecção por um dos virus (S. P., M. G. e R. M.), com um dos outros dois ou com ambos, sucessivamente. Nessas condições observámos tres séries de animais, correspondentes á inoculação inicial por cada um dos virus. Aproveitando cobaias que resistiram ás provas de vacinação, acrescentámos mais duas séries de animais que, tendo sido vacinados e sobrevivido á inoculação de um dos tres virus, foram depois inoculados com outros.

Para facilidade de exposição enumeraremos préviamente as séries de cobaias experimentadas, subdividindo-as e indicando o numero dos graficos em que os protocólos das observações estão resumidos.

Série 1 — Cobaias sobreviventes ao virus São Paulo (S. P.).

(a) S. P. h.	{ + R. M. + M. G. + M. G. + R. M.	Grafico 1
(b) S. P. L. II.	{ + R. M. + M. G. + M. G. + R. M.	Grafico 2
(c) S. P. L. XI.	{ + R. M. + M. G. + M. G. + R. M.	Grafico 3

Série 2 — Cobaias sobreviventes ao virus Minas Gerais (M. G.).

M. G.	{ + R. M. + S. P. + S. P. + R. M.	Grafico 4
-------	--------------------------------------	-----------

Série 3 — Cobaias sobreviventes ao virus Rocky Mountain (R. M.).

R. M. + M. G. + S. P. Grafico 4

Série 4 — Cobaias vacinadas R. M. e sobreviventes ao virus R. M.

R. M. + M. G. + S. P. Grafico 5

Série 5 — Cobaias vacinadas R. M. e sobreviventes ao virus M. G.

M. G. + S. P.

M. G. + R. M. + S. P.

Grafico 6

## DESCRICÃO DAS PROVAS:

Série 1 (a) — Cobaias imunes ao virus S. P. h. (grafico 1):

Das 8 cobaias empregadas nesta série, as tres primeiras (3153, 5139, 5328) sofreram varias inoculações com o virus S. P. antes de serem usadas nas provas de imunidade crusada; as 5 outras foram inoculadas uma só vês com esta amostra e 34 dias após foram provadas com os outros dois virus. Em primeira inoculação heteróloga (segunda inoculação no grafico), 4 receberam o virus M. G. e 4 o virus R. M.

A não ser a cobaia 3153, que morreu 11 dias depois de reinoculada, todas as demais sobreviveram, das quais 6 sem terem apresentado nenhuma elevação térmica e 1 (5940) tendo sofrido alteração febril no 5.º e 9.º dias. Em terceira inoculação, 3 cobaias receberam o virus R. M. e 4 o virus M. G., crusadamente: todas elas sobreviveram a um periodo de observação de 20 dias, 6 sem terem tido a menor reação febril e apenas 1 (5932) tendo apresentado fébre prolongada em seguida á inoculação do virus M. G.

De uma série de cobaias normais usadas como testemunhas dos virus de reinoculação, 6 do virus M. G. e 1 do R. M. morreram de febre maculosa tipica, e 1 do virus R. M. (6255) teve reação febril prolongada e foi sacrificada com sinais tipicos de febre maculosa.

Série 1 (b) — Cobaias imunes ao virus S. P. L. II (grafico 2):

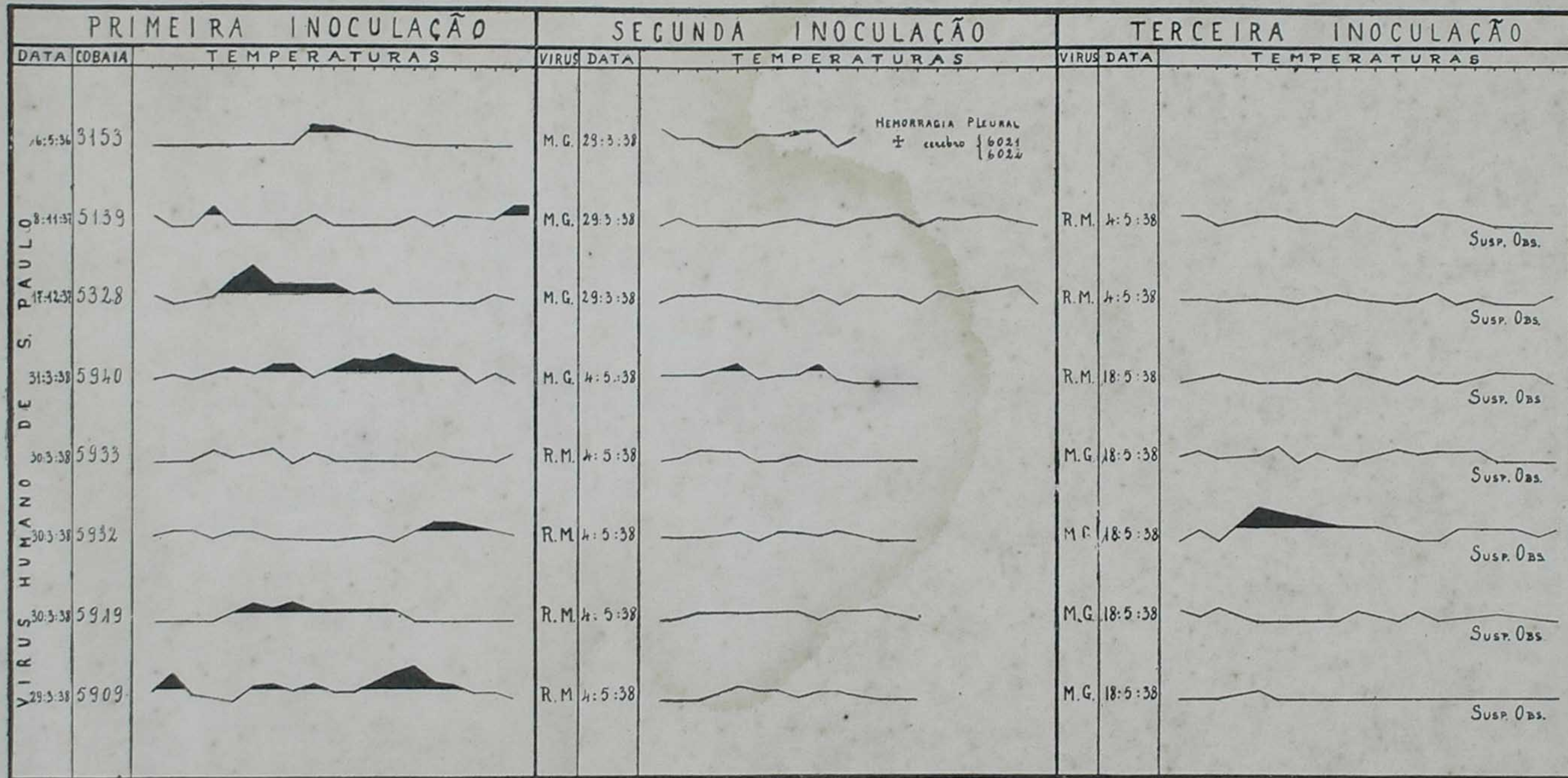
Das 8 cobaias desta série, 5 sofreram segunda inoculação com virus M. G. e 3 com virus R. M. Nenhuma reagiu tipicamente, sobrevivendo todas a 20 dias de observação. Duas cobaias (5298 e 5553) morreram de infecção secundaria após este praso, sem chegarem a ser reinjetadas. Os 6 animais restantes foram posteriormente reinoculados de modo crusado com os virus R. M. e M. G., nenhum deles havendo reagido e sobrevivendo ao periodo de observação de 20 dias.

De 8 cobaias testemunhas, 4 de M. G. e 4 de R. M., todas aparentaram tipica febre máculosa, havendo sobrevivido apenas 1 (6035).

Série 1 (c) — Cobaias imunes ao virus S. P. L. XI (grafico 3):

Oito cobaias imunes a este virus foram reinoculadas, 4 com M. G. e 4 com R. M.: duas delas (5450 e 5470) não mostraram qualquer alteração de temperatura, enquanto que 6 reagiram febrilmente de modo mais ou menos acen-tuado; afóra a 5381 que morreu de pneumonia intercorrente, as demais sobreviveram, tendo sido submetidas crusadamente á terceira inoculação virulenta. Em 4 delas a observação não pôde ser terminada, por morte devida a pneu-monia, mas 3 resistiram por mais de 20 dias sem que tivessem nunca apre-sentado temperatura acima de 39,6º (cobaias 5385, 5450 e 5473).

Como testemunhas, 3 de M. G. e 3 de R. M., todas tiveram infecção ca-racteristica, morrendo 5 e sobrevivendo 1 (6035) ao virus R. M.



HEMORRAGIA PLEURAL  
+ cerebro { 6021  
6022

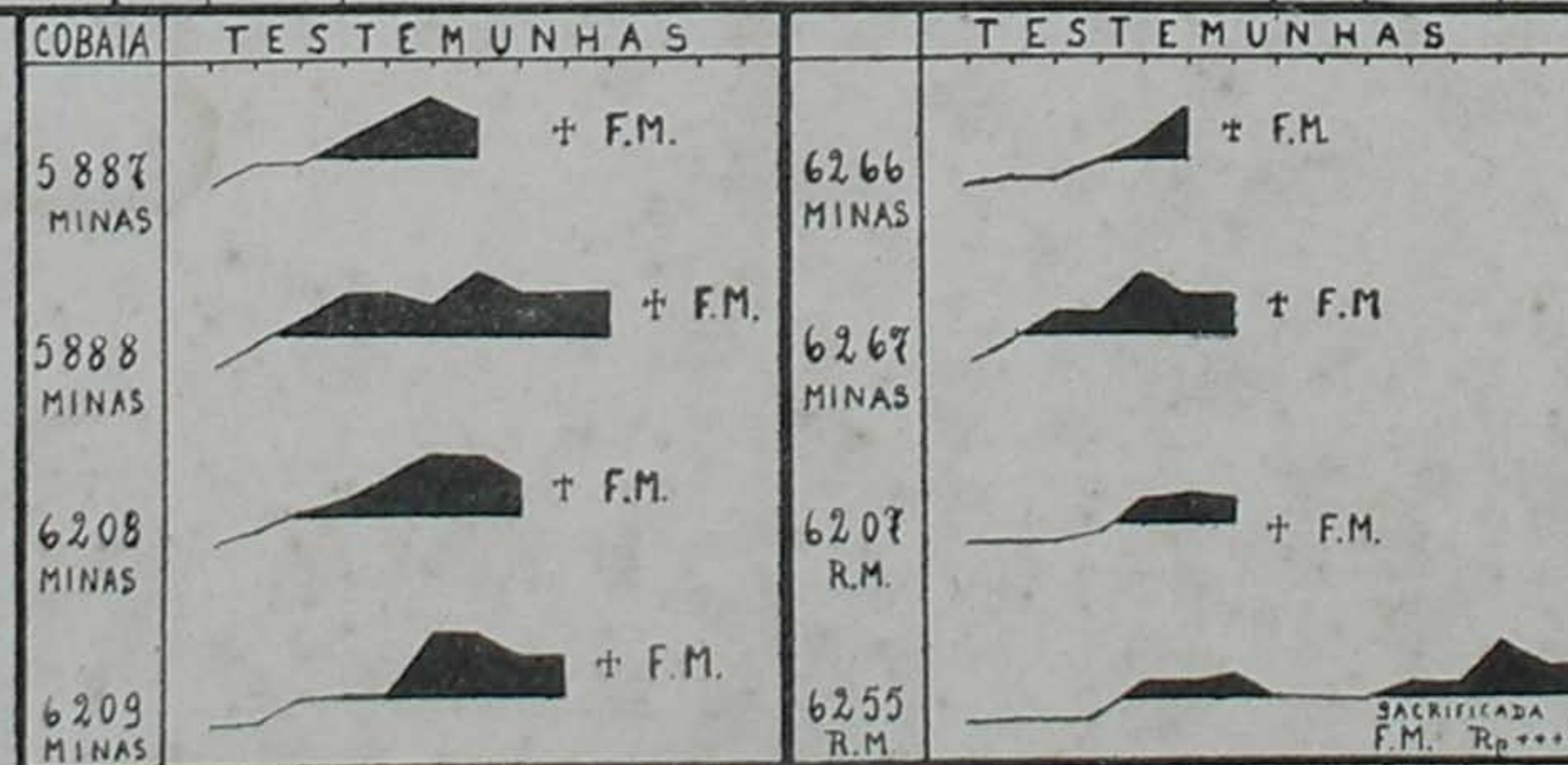


Grafico 1

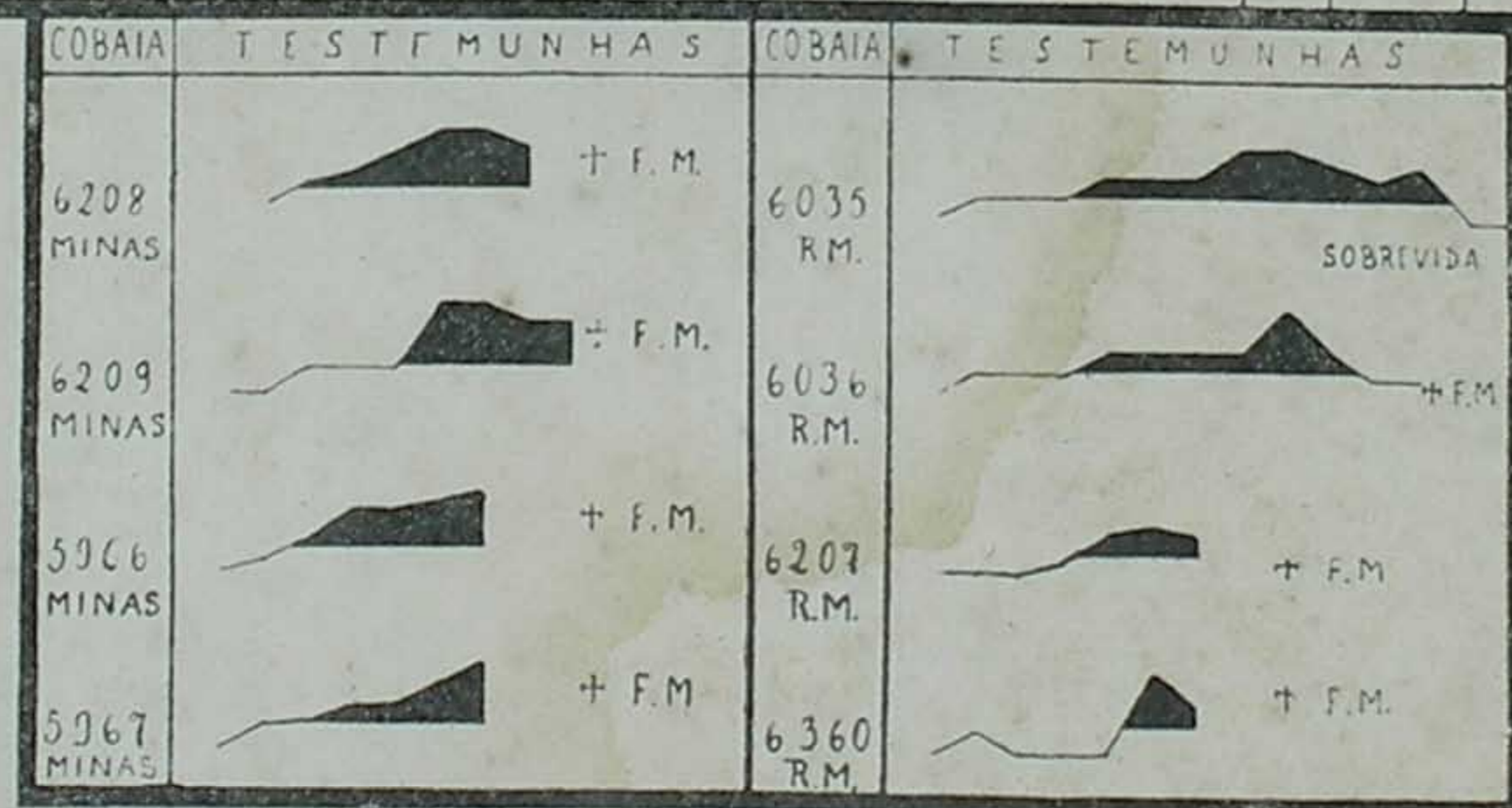
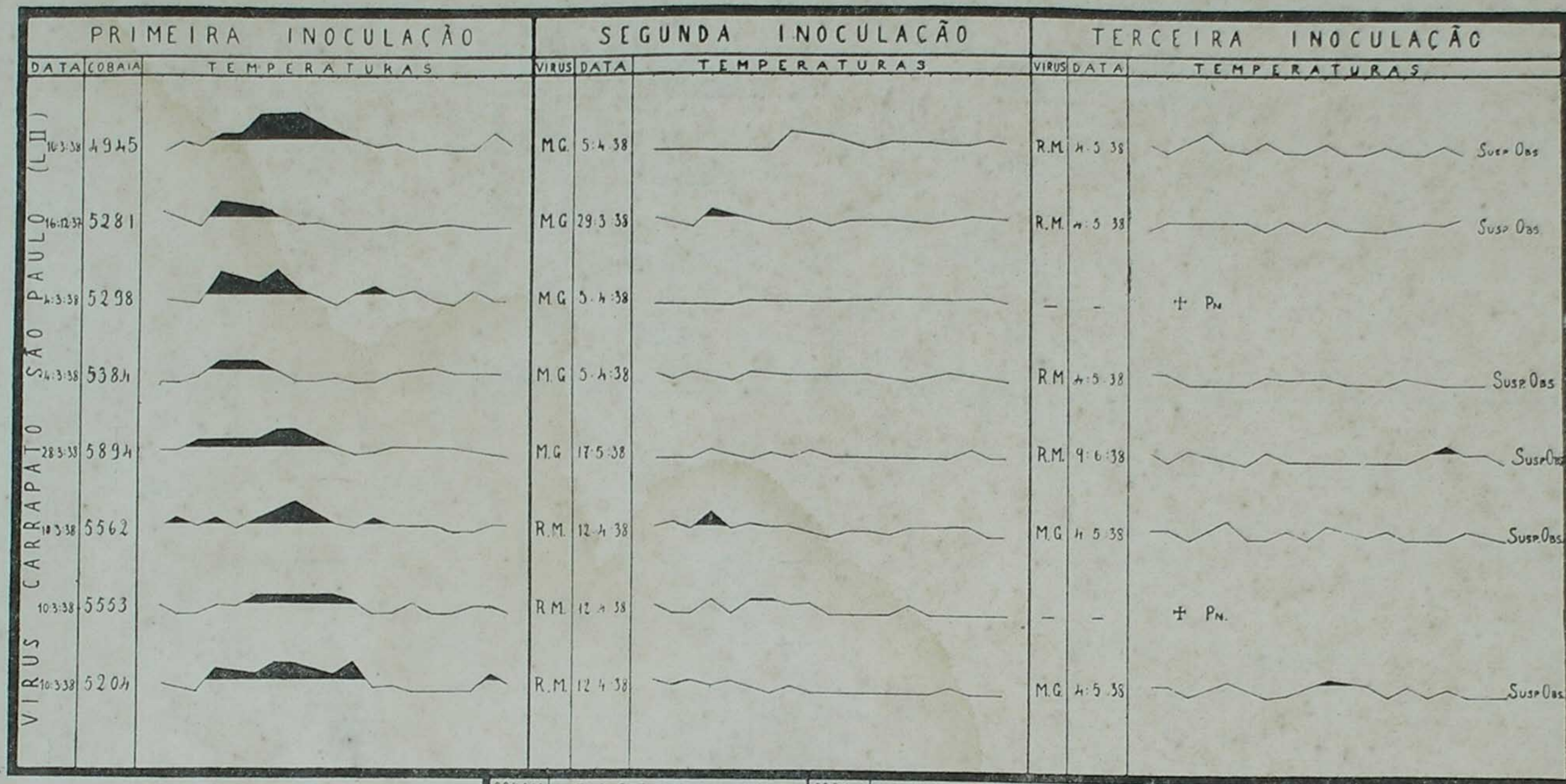


Gráfico 2

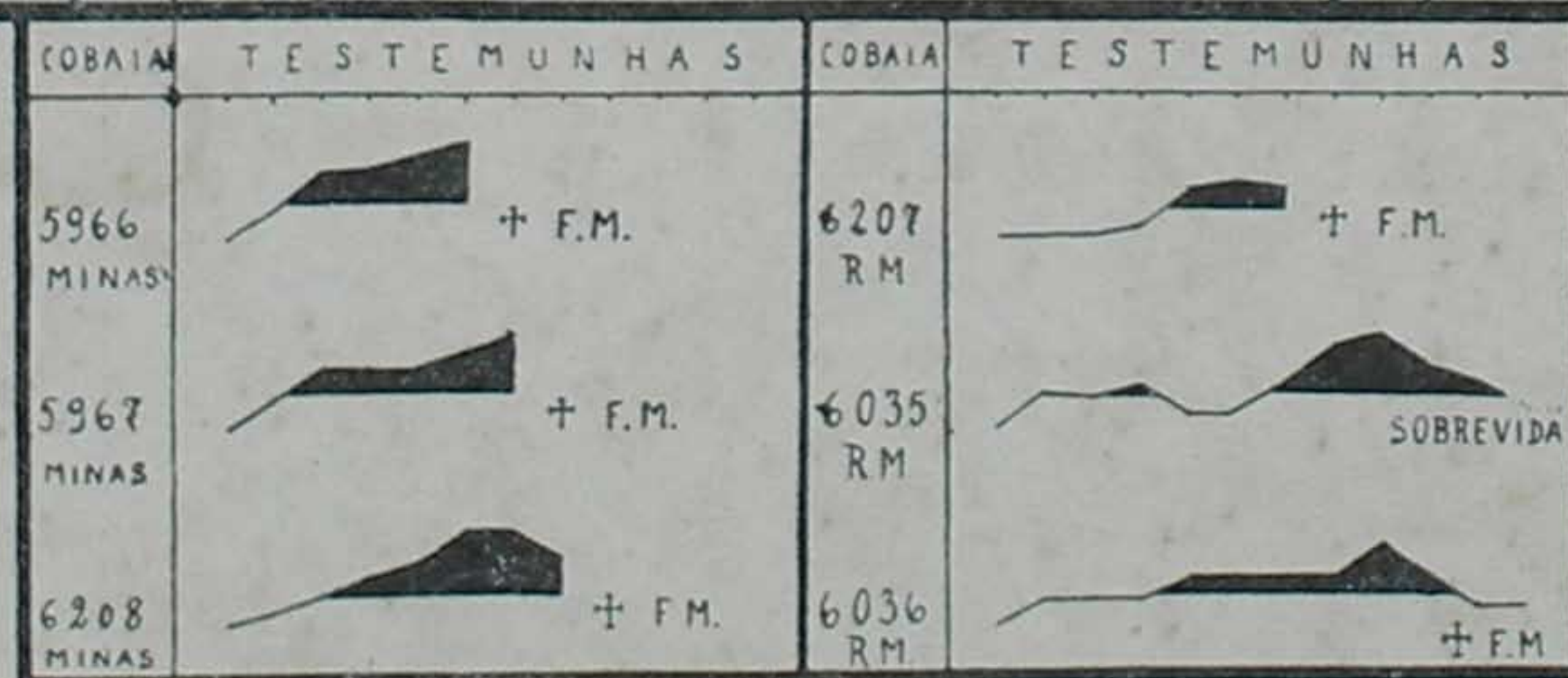
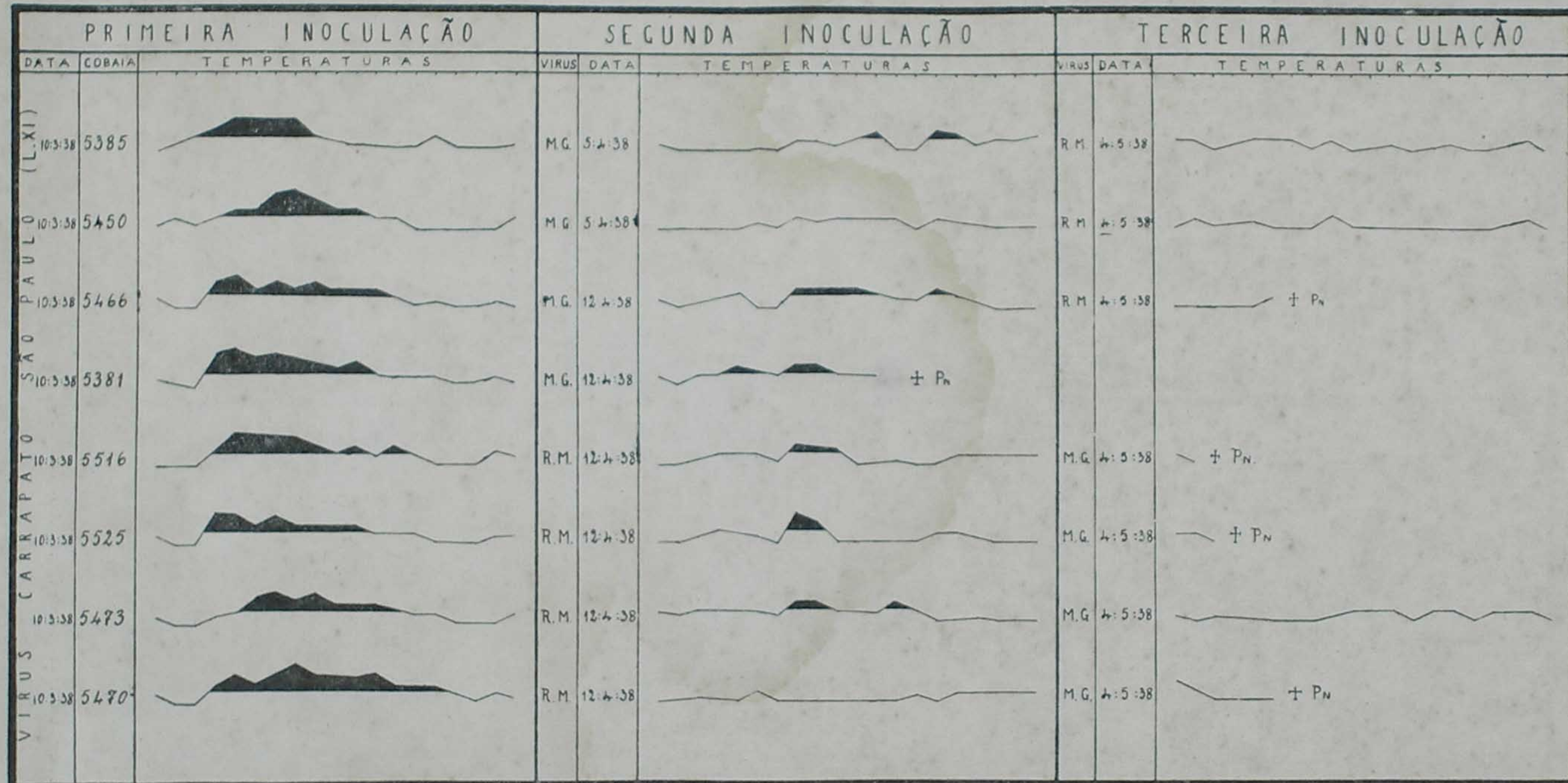


Grafico 3

Série 2 — Cobaias imunes ao virus M. G. (grafico 4):

Como o demonstra o grafico 4, seis foram as cobaias que, tendo sobrevivido á infecção pelo virus M. G., foram depois duas véses reinoculadas cruzadamente: as cobaias 6298, 6513, 6284, 6329 e 6354 foram reinoculadas primeiro com o virus S. P. e depois com o R. M., enquanto que a 6021 recebeu primeiro o virus R. M. e depois o S. P. Não só não houve reação febril prolongada em nenhuma das cobaias (apenas as 6298 e 5970 apresentaram ligeira reação durante dois dias seguidos), nem outros sintomas de febre maculosa após as reinoculações, como todas elas sobreviveram ás provas.

Quanto ás cobaias testemunhas (3 para cada virus), 6 morreram e 3 foram sacrificadas com infecção característica.

Série 3 — Cobaias imunes ao virus R. M. (grafico 4):

Duas cobaias (5970 e 6488), que haviam reagido ao virus R. M., foram mais tarde inoculadas com os virus M. G. e S. P., sem que nenhuma reagisse ao primeiro; após a inoculação do S. P., a cobaia 5970 apresentou ligeira febre durante 2 dias e a outra (6488) não reagiu, havendo ambas sobrevivido.

No mesmo grafico figuram 2 testemunhas do virus M. G., que tiveram típica reação, morrendo 1 e sendo sacrificada outra em agonia.

Série 4 — Cobaias vacinadas (R. M.) que resistiram ao virus R. M. (grafico 5):

As cobaias que compõem esta série foram todas reinoculadas com o virus M. G., tendo sido previamente submetidas á vacinação e á infecção pelo virus R. M. Nenhuma delas reagiu ao virus M. G., morrendo a n.º 6196 no 13.º dia, com infecção intercorrente. Duas cobaias (5759 e 5773) morreram em seguida ao periodo de observação. Das cinco restantes, novamente reinoculadas, desta vés com o virus S. P., nenhuma reagiu, havendo 4 sobrevivido e 1 (6193) morrido de pneumonia no 10.º dia.

As 9 cobaias testemunhas (5 do virus M. G. e 4 do S. P.) morreram de febre maculosa após reação característica.

Série 5 — Cobaias vacinadas (R. M.) que resistiram ao virus M. G. (grafico 6):

No grafico n.º 6 vêem-se os resultados das reinoculações, com virus S. P., de 11 cobaias imunizadas com a vacina Parker, que sobreviveram á prova de inoculação com o virus M. G. (v. grafico 8). Destas 11 cobaias sobreviveram 8 ao praso de observação de 16 dias; dentre as que sobreviveram, 4 não reagiram (5751 e 5754 sem a menor alteração; 5756 e 5761 com reação passageira no 12.º dia) e 4 (5750, 5753, 5756, 5760) apresentaram reação febril durante 2 ou mais dias seguidos. A cobaia 5762 morreu no 14.º dia sem ter sofrido febre, com sinais de pneumonia. As 2 cobaias restantes foram sacrificadas durante reação febril: a 5757 no 13.º dia apresentando discretas lesões de febre maculosa, e a 5764 no 10.º dia, sem sinais de febre maculosa e com passagens negativas para outras cobaias.



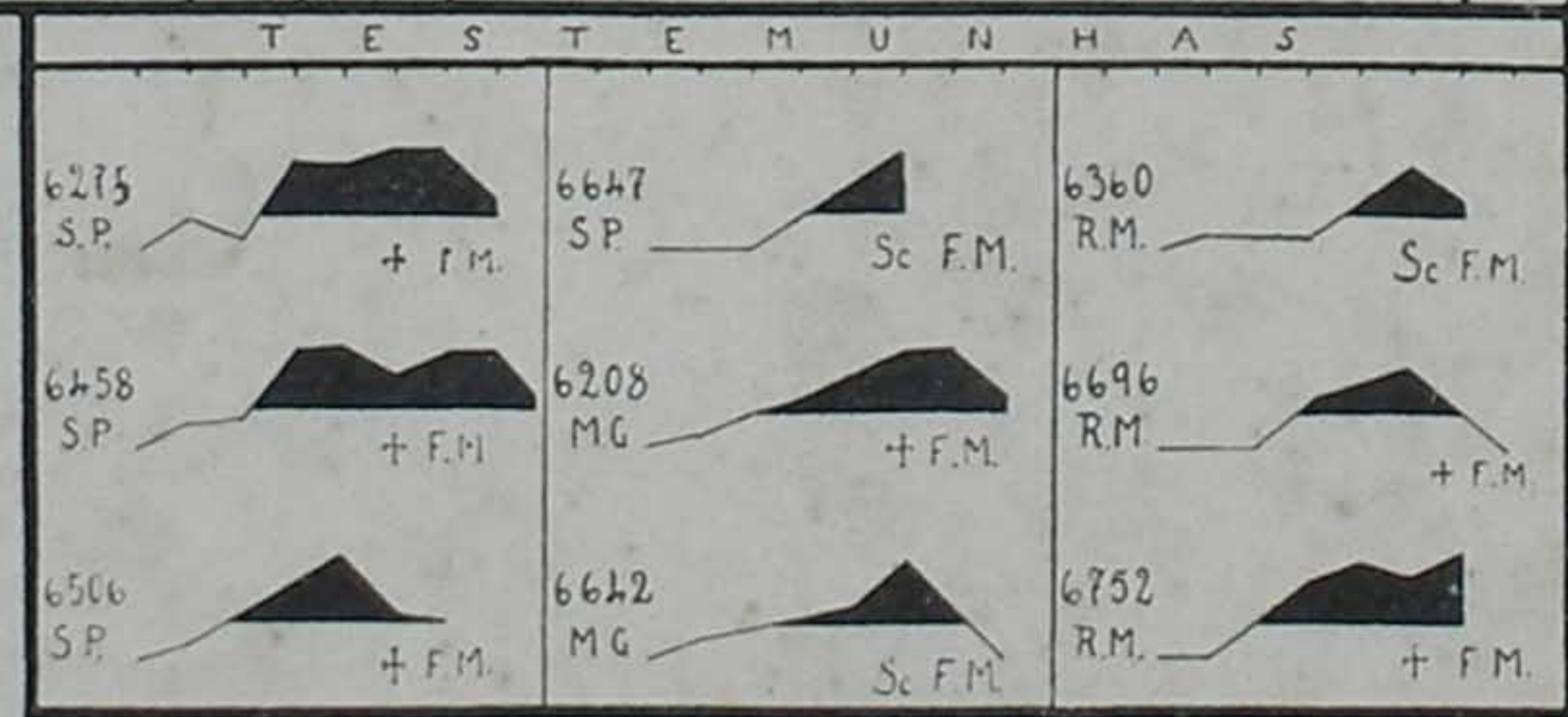
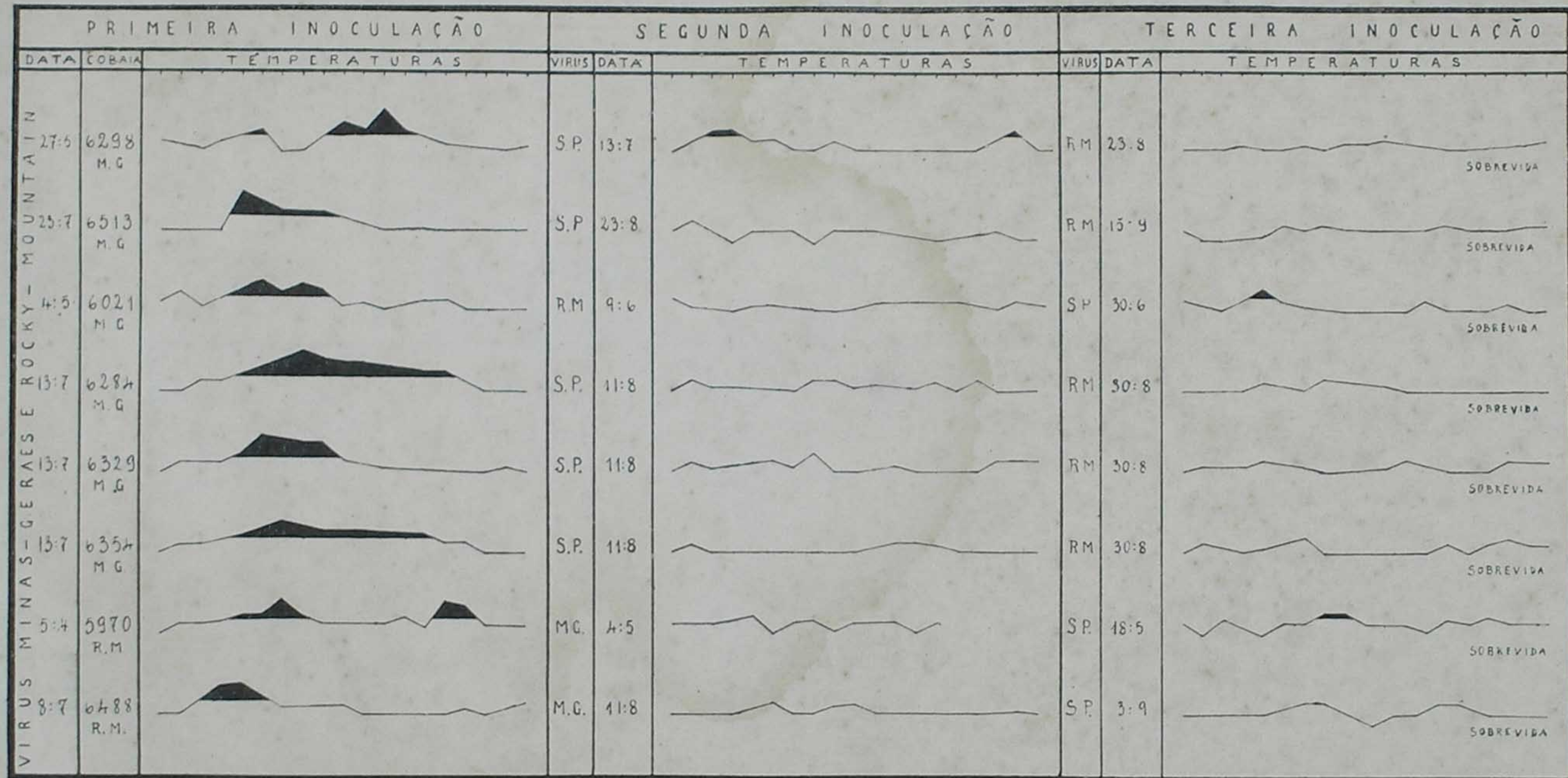


Grafico 4

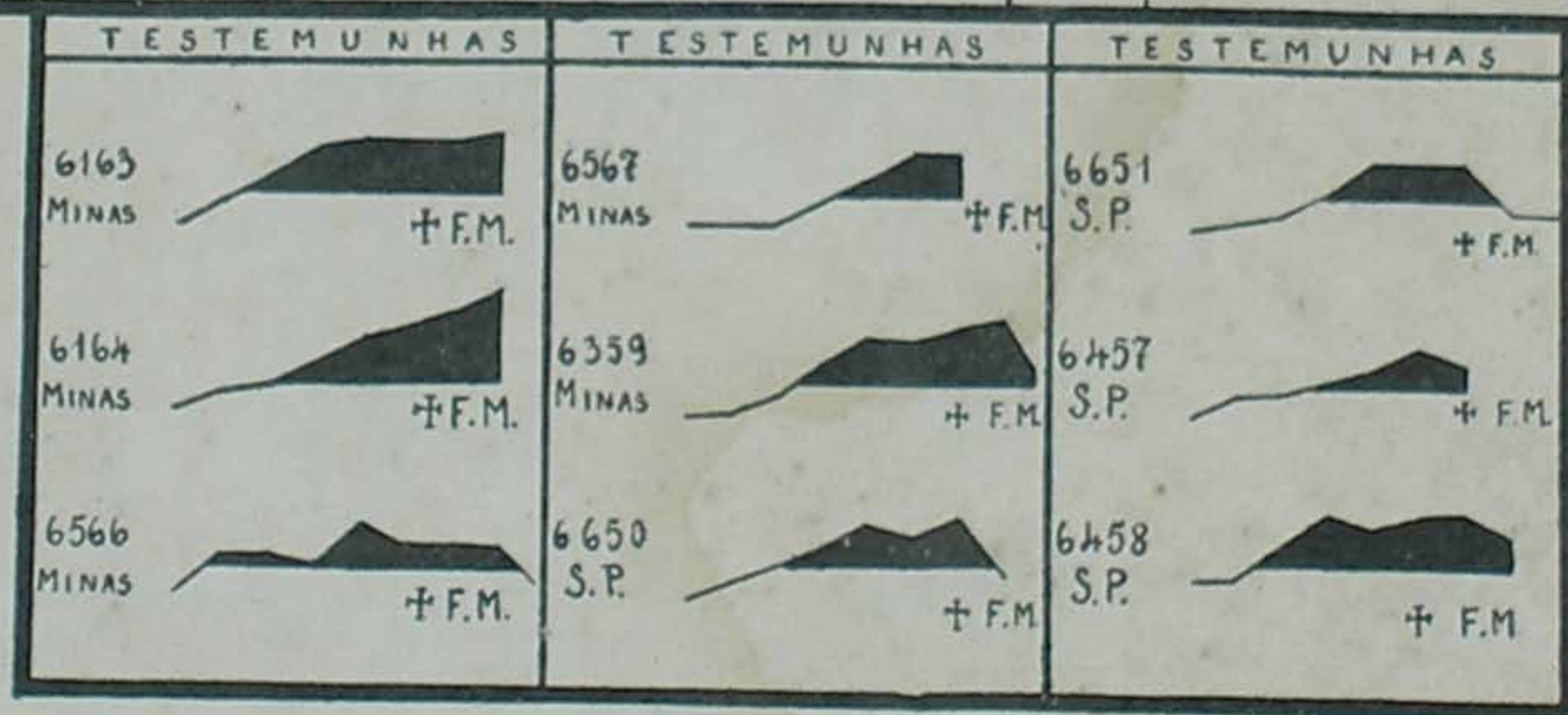
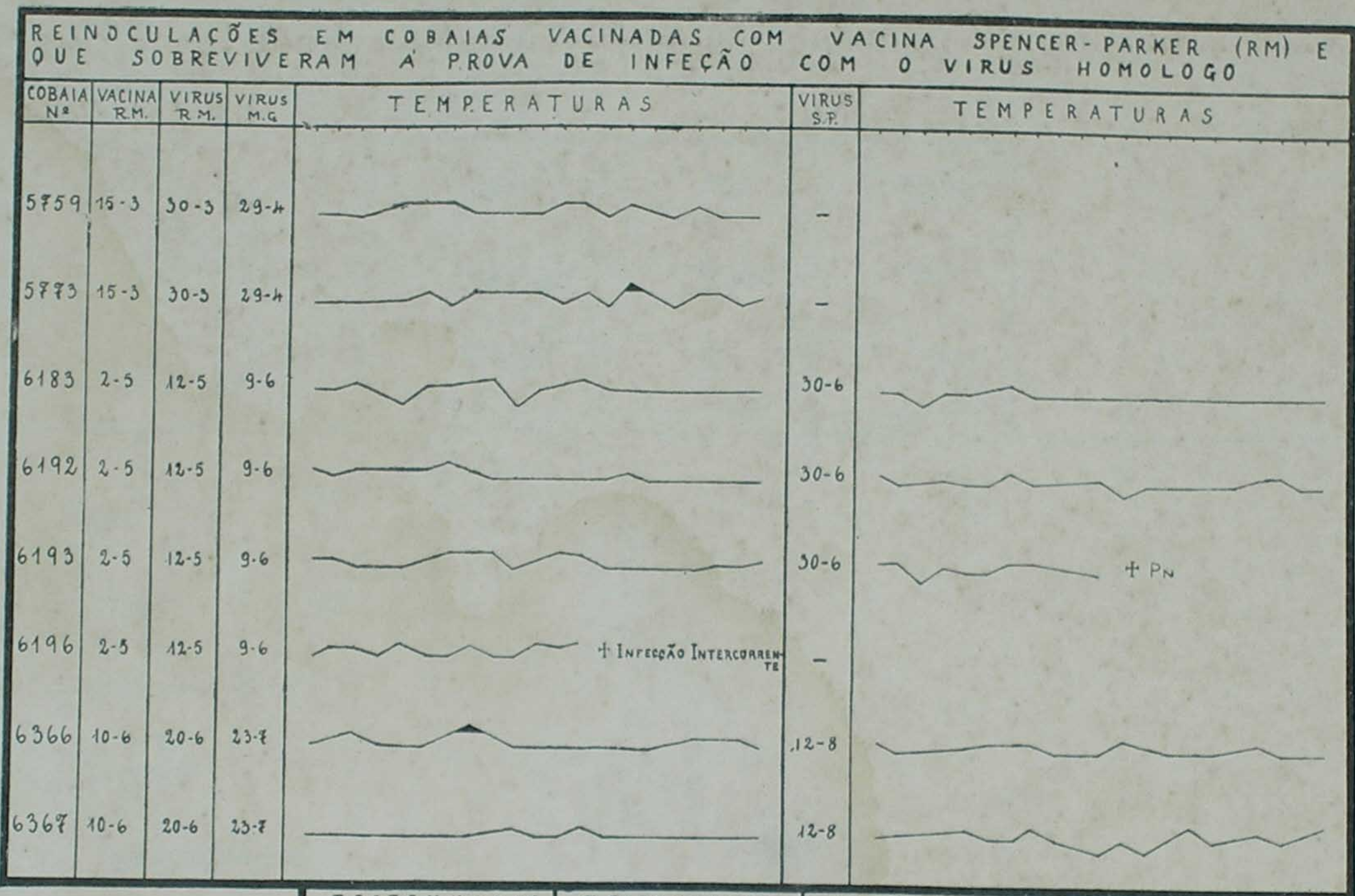


Grafico 5

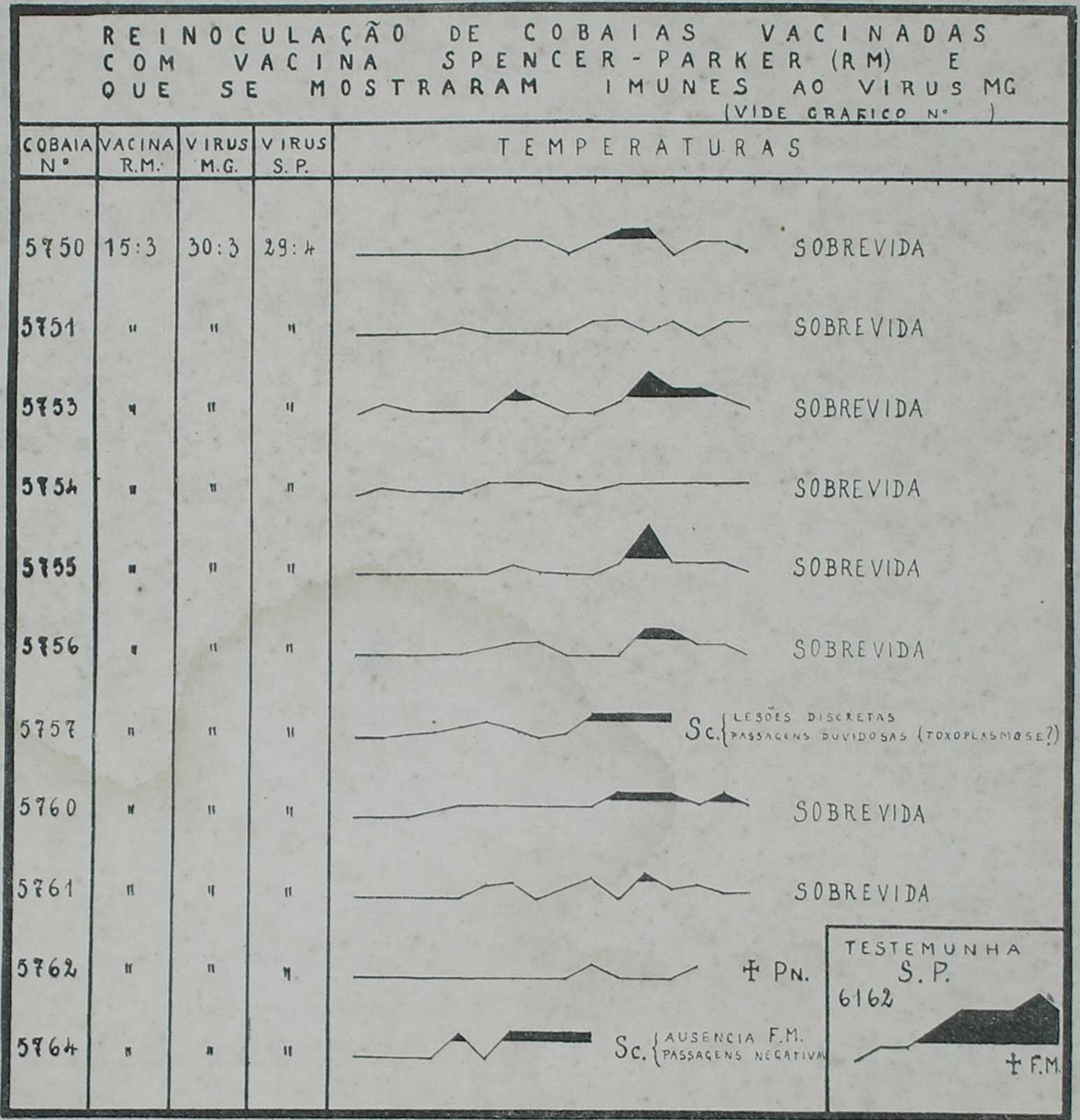
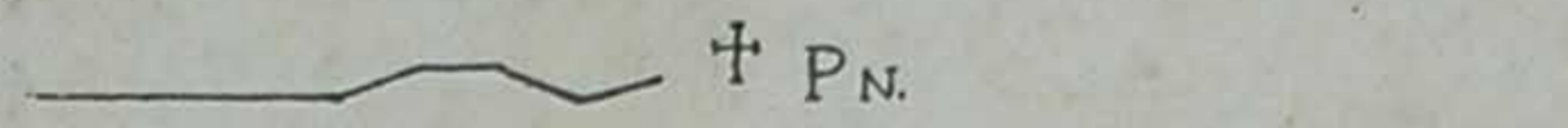


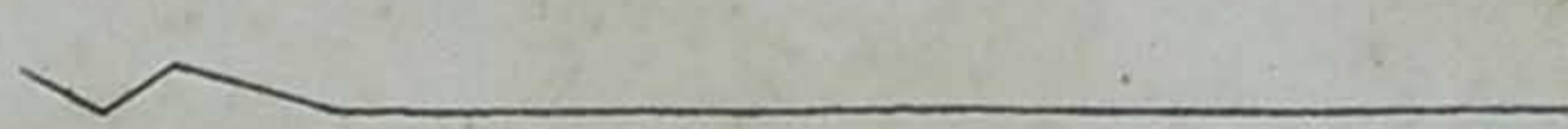







Grafico 6

O grafico 7 resume os protocolos de cobaias da mesma série que foram reinoculadas com virus R. M. primeiramente e depois com virus S. P. Das 5 cobaias, 4 suportaram sem nenhuma reação a inoculação do virus R. M., morrendo 1 de pneumonia; após inoculação do virus S. P. 2 morreram logo de pneumonia e 2 sobreviveram: a 6198 sofreu ligeira e descontinua reação febril e a 6199 não apresentou a menor alteração.

Duas testemunhas do virus S. P. e 1 do R. M. morreram de febre maculosa.

REINOCULAÇÕES EM COBAIAS VACINADAS COM VACINA SPENCER-PARKER (R.M.) E QUE RESISTIRAM AO VIRUS DE MINAS-GERAES						
COBAIA N°	VACINA R.M.	VIRUS M.G.	VIRUS R.M.	TEMPERATURAS	VIRUS S.P.	TEMPERATURAS
6187	2-5	12-5	9-6	 † P.N.		
6188	2-5	12-5	9-6		30-6	 † P.N.
6191	2-5	12-5	9-6		30-6	 † P.N.
6198	2-5	12-5	9-6		30-6	 Susp. Obs.
6199	2-5	12-5	9-6		30-6	 Susp. Obs.

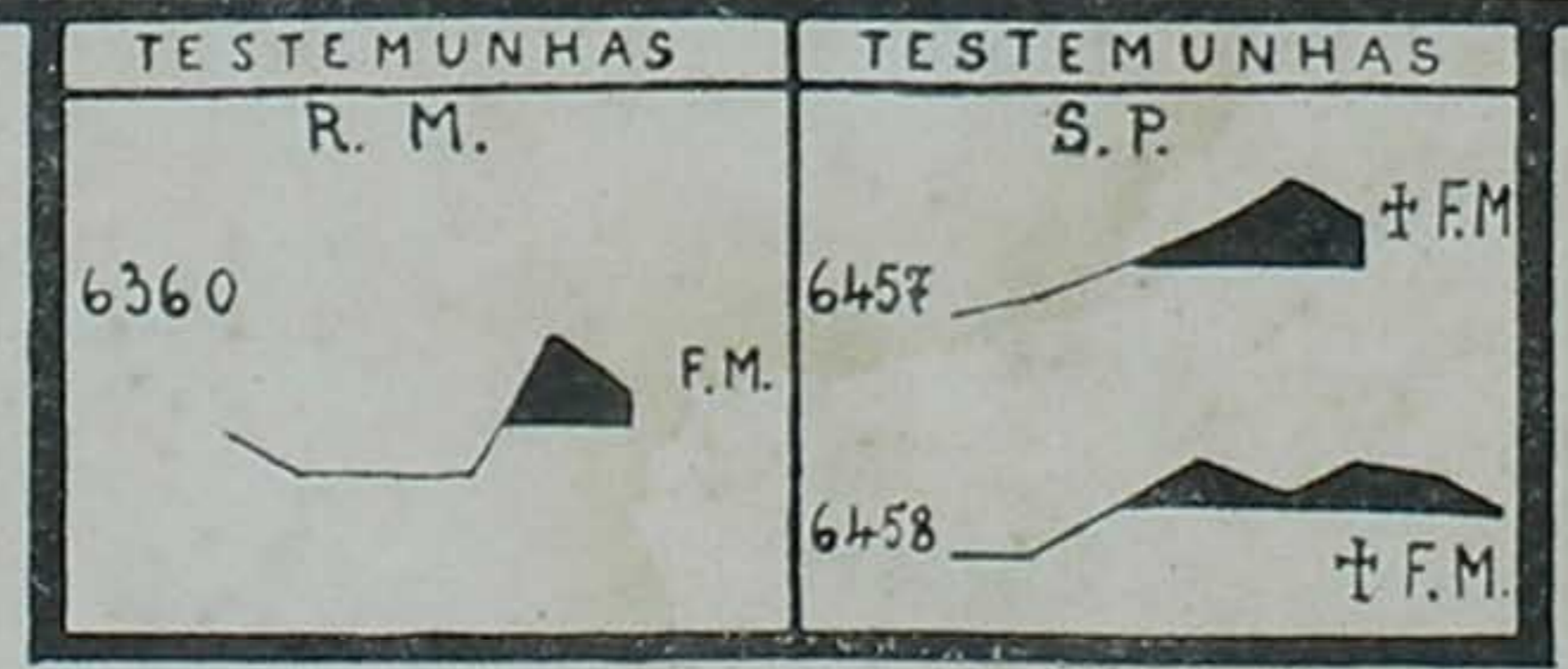


Grafico 7

## RESULTADOS DAS PROVAS DE IMUNIDADE CRUSADA

Na realização das próvas de imunidade crusada cingimo-nos a certas nórmas usualmente recomendadas e observámos condições que convem precisar antes de expôr os resultados.

Tratámos, em primeiro lugar, de empregar nelas o maior numero possível de animais; si as diversas séries foram apesar disto constituídas por poucos, é que com os virus em questão torna-se muito difficil a obtenção de cobaias em condições de próva, dada a infima percentagem das que sobrevivem a uma primeira infecção.

O intervalo entre as inoculações foi variavel. Conviria que na maioria das vêses se tivesse esperado mais alguns dias entre a primeira e segunda inoculação, afim de que medeiasse um intervalo maior entre esta ultima e o termo da defervencia; um gráo maior de imunidade poderia então provavelmente aparentar o organismo de cobaias ainda não totalmente refeitas.

As inoculações foram sempre praticadas com dóses adequadas e mencionadas de virus-sangue, por via peritoneal, observados sempre os preceitos elementares de assepsia.

A isenção da contaminação bacteriana dos virus foi sempre comprovada durante todo o correr das experiencias. Aliás este contrôle é observado na manutenção rotineira das amostras no nosso laboratorio, sendo realizado sistematicamente para cada passagem.

A observação dos animais de próva, inclusive pela tomada diaria da temperatura retal, prolongou-se quasi sempre pelo praso minimo de 20 dias, mais do que suficiente para semelhantes tests.

Na interpretação dos resultados consideramos sobretudo a análise da curva térmica e os dados de necrópsia. O exame de esfregaço peritoneal dos animais autopsiados foi sempre feito, tendo fornecido indicações variadas e algumas vêses de valôr, principalmente no despistamento de infecções intercorrentes por protozoarios (*Toxoplasma*) e bacterias, afóra a indicação de presença ou ausencia de rickettsias.

Considerámos « parcialmente imunes » as cobaias que sobreviveram á reinoculação de virus e que apresentaram elevação térmica superior a 39,6° C. por dois ou mais dias consecutivos durante o periodo de observação, e « totalmente imunes » aquelas que nenhuma reação febril sofreram ou que tiveram apenas uma alteração passageira.

No quadro 1 figuram os resultados da observação de cada uma das séries de animais e o de todas elas em conjunto. A análise e interpretação destes resultados é feita na *Discussão* do presente trabalho (pp. 174-176).

## Quadro 1

Resultado global das provas de imunidade cruzada.

Gráfico n.	Primeira inoc. virus	Segunda inoc. virus	N. cobaias	Imun. total	Imun. parcial	Morte		Terceira inoc. virus	N. cobaias	Imun. total	Imun. parcial	Morte		Testemunhas			
						F. M.	Não F. M.					F. M.	Não F. M.	N. cobaias	Virus S. P.	Virus M. G.	Virus R. M.
1	S. P. (h.)	M. G.	4	3	—	—	1	R. M.	3	3	—	—	—	8	—	6	2
		R. M.	4	4	—	—	—	M. G.	4	3	1	—	—				
2	S. P. (L. 2)	M. G.	5	5	—	—	—	R. M.	4	4	—	—	—	8	—	4	4
		R. M.	3	3	—	—	—	M. G.	2	2	—	—	—				
3	S. P. (L. 11)	M. G.	4	1	2	—	1	R. M.	3	2	—	—	1	6	—	3	3
		R. M.	4	1	3	—	—	M. G.	4	1	—	—	3				
4	M. G.	S. P.	5	4	1	—	—	R. M.	5	5	—	—	—	9	4	2	3
		R. M.	1	1	—	—	—	S. P.	1	1	—	—	—				
4	R. M.	M. G.	2	2	—	—	—	S. P.	2	1	1	—	—				
5	R. M.	M. G.	8	7	—	—	1	S. P.	5	4	—	—	1	9	4	5	—
6	M. G.	S. P.	11	4	5	1	1	—	—	—	—	—	—	1	1	—	—
		R. M.	5	4	—	—	1	S. P.	4	1	1	—	2				
Total			56	39	11	1	5		37	27	3		7	44	11	20	13

## PROVAS DE VACINAÇÃO

Nestes ensaios empregámos vacinas fenicadas feitas a partir de carrapatos infectados com cada um dos tres virus, preparadas de acôrdo com a técnica de Spencer e Parker (cf. Dias & Martins 1938). Da vacina R. M. usámos as partidas n.º 5119 e 5527 do Rocky Mountain Laboratory, que nos foram gentilmente enviadas pelo Dr. R. R. Parker; esta vacina é feita com *Dermacentor andersoni* adultos que se infectam durante as fases larvaria e ninfal.

As vacinas M. G. e S. P. foram preparadas por um de nós (J. T.) no Instituto Butantan, com *Amblyomma cajennense* adultos infectados desde larva com os virus respectivos.

Tres séries de animais, correspondentes á imunisação com cada vacina, foram observadas.

Série 1 — Cobaias vacinadas com a vacina Rocky Mountain:

Como o poder protetor desta vacina contra o vírus São Paulo já tivesse sido demonstrado (Monteiro 1933), resolvemos aproveitar as duas partidas disponíveis para verificar em bom numero de animais sua ação contra o vírus Minas Gerais, controlando com algumas cobaias a antigenicidade com respeito ao vírus homólogo.

(a) — Vacina R. M. + vírus M. G. (grafico 8):

Nesta série foram inoculadas ao todo 30 cobaias com a vacina, por via subcutanea: 10 cobaias receberam uma dose unica de 1 cc.; 4 cobaias tomaram duas doses de 1 cc.; 12 receberam dose unica de 2 cc. e 4 cobaias duas doses de 2 cc. Os animais que tomaram uma só dose do produto foram 10 e 15 dias mais tarde injetados com o vírus-sangue M. G.; os que foram imunizados com duas doses (com intervalo de 5 dias) receberam o vírus 10 dias depois da ultima dose. O vírus (= sangue desfibrinado de cobaia em periodo febril) foi inoculado por via peritoneal nas doses de 0,2 cc. e 0,5 cc., pouco depois de sangrado no coração o animal doador. A temperatura retal das cobaias foi tomada diariamente em seguida á inoculação de vírus.

O grafico n.º 8 resume as condições de experiencia e o resultado da observação dos animais. Do grupo de 10 cobaias vacinadas com uma vez 1 cc., sobreviveram 7, das quais 3 não apresentaram elevação de temperatura acima de 39,6º C. por mais de 2 dias seguidos, e 4 tiveram temperatura superior a esta durante mais de 2 dias consecutivos. Tres cobaias morreram de infecção intercorrente no 9.º (6182) e 15.º dia (5752, 6200), após reação febril, sem mostrarem sinais de febre maculosa.

Das 4 cobaias que receberam duas doses de 1 cc., duas (5750 e 5751) não reagiram febrilmente ao vírus (a 5750 teve febre não significativa durante os dois dias imediatos á inoculação) e duas (5754 e 5755) reagiram entre o 5.º e 10.º dia — mas todas 4 escaparam á ação mortal do vírus mineiro. Dentre as 12 cobaias que foram vacinadas com 1 dose de 2 cc., 7 sobreviveram, das quais sómente 2 apresentaram febre entre o 12.º e 17.º dia (n.º 5762 e 5763), não tendo as outras 5 sofrido reação (6185, 6197, 6190, 6191, 6202); a cobaia 6189 foi sacrificada no 19.º dia, em reação febril tardia, apresentando ligeira esplenomegalia mas resultando negativas as passagens de sangue para cobais normais; a cobaia 6203 morreu no 20.º dia de observação, tendo tido febre do 12.º ao 17.º dia, mostrando á autópsia baço ligeiramente aumentado; 3 animais (6201, 5766, 5767) morreram de infecção intercorrente e sem sinais de febre maculosa. Finalmente, das 4 cobaias injetadas com 2 doses de 2 cc., sobreviveram tres: a 5760 não teve a menor reação, a 5761 teve uma reação prolongada e a 5764 uma reação irregular; a quarta cobaia (5765) sofreu elevada reação febril tardia, vindo a morrer no 17.º dia com um quadro de autopsia tipico de pneumonia.

Testemunhas — 8 cobaias normais serviram para controle do vírus M. G., tendo sido todas inoculadas por via peritoneal, 4 com 0,2 cc. e 4 com 0,5 cc. do vírus-sangue utilizado nas provas. Sete morreram entre o 6.º e 10.º dia e uma (5924) foi sacrificada em agonia, tendo todas sofrido intensa reação febril (40-41º) após periodo de incubação médio de 3 dias, apresentando á necrópsia tipicos sinais de febre maculosa.

VACINA R.M. VIRUS COBATA					TEMPERATURA	OBSERVAÇÕES	VACINA R.M. VIRUS COBATA					TEMPERATURA	OBSERVAÇÕES
PARTIDA Nº	C.C.	DOSES	DOSE VIRUS	Nº			PARTIDA Nº	C.C.	DOSES	DOSE VIRUS	Nº		
5119	1cc	1	0.2cc	5752		INF. INTERCORRENTE	5119	2cc	1	0.5cc	5766		PNEUMONIA
"	"	"	"	5753		SOBREVIDA	"	"	"	"	5767		PNEUMONIA
"	"	"	"	6182		PERITONITE	"	"	"	"	6190		SOBREVIDA
5527	"	"	"	6198		SOBREVIDA	"	"	"	"	6191		SOBREVIDA
5119	"	"	0.5cc	5756		SOBREVIDA	5527	"	"	"	6202		SOBREVIDA
"	"	"	"	5757		SOBREVIDA	"	"	"	"	6203		?
"	"	"	"	6187		SOBREVIDA	5119	"	2	0.2cc	5760		SOBREVIDA
"	"	"	"	6188		SOBREVIDA	"	"	"	"	5761		SOBREVIDA
5527	"	"	"	6199		SOBREVIDA	"	"	"	0.5cc	5764		SOBREVIDA
"	"	"	"	6200		PERITONITE	"	"	"	"	5765		PNEUMONIA
5119	"	2	0.2cc	5750		SOBREVIDA	TESTE MUNHAS						
"	"	"	"	5751		SOBREVIDA							
"	"	"	0.5cc	5754		SOBREVIDA			0.2cc		5924		F.M.
"	"	"	"	5755		SOBREVIDA			"		5925		F.M.
"	2cc	1	0.2cc	5762		SOBREVIDA			"		6251		F.M.
"	"	"	"	5763		SOBREVIDA			"		6252		F.M.
"	"	"	"	6185		SOBREVIDA			0.5cc		5926		F.M.
"	"	"	"	6189		PASSAGENS NEGATIVAS			"		5927		F.M.
5527	"	"	"	6197		SOBREVIDA			"		6253		F.M.
"	"	"	"	6201		PNEUMONIA			"		6254		F.M.

Grafico 8



(b) — Vacina R. M. + virus R. M. (grafico 9):

Nesta série empregámos 8 cobaias, cuja observação foi muito prejudicada pela ocorrência de infecção secundaria fatal (pneumonia) em 5 delas. E' verdade que dentre estas ultimas, tres (5758, 5769, 5772) resistiram a mais de 12 dias de observação, sendo este o praso de regra adotado no Laboratorio das Montanhas Rochosas para a dosagem das partidas de vacina. As cobaias 5759 e 5773 sobreviveram — a primeira havendo reagido e a segunda não. Finalmente, a cobaia 5771 morreu no 11.º dia, mostrando á autópsia sinais de febre maculosa.

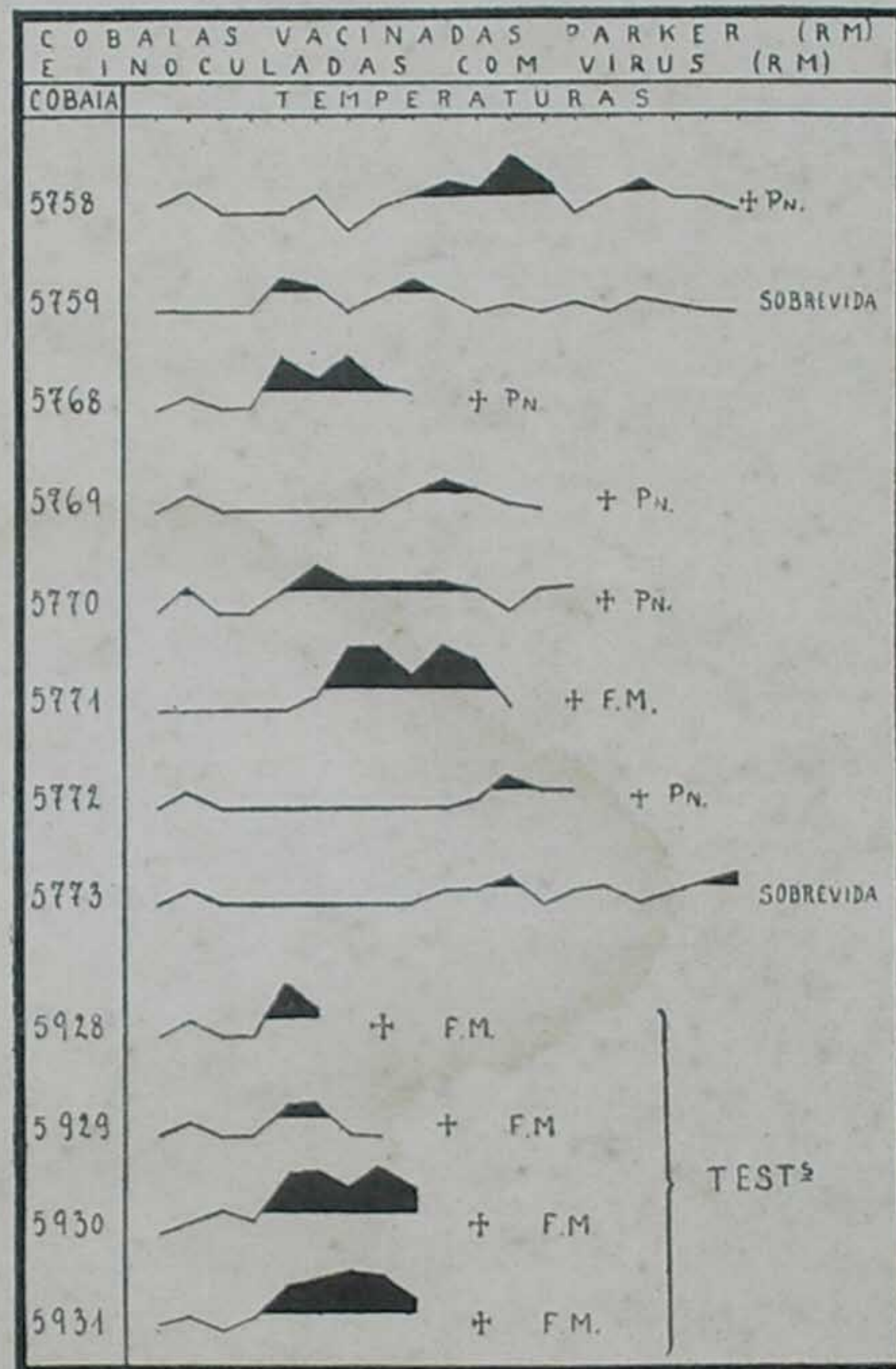


Gráfico 9

As 4 cobaias testemunhas desta série morreram em poucos dias, de febre maculosa, em seguida á inoculação do vírus R. M.

Série 2 — Cobaias vacinadas com a vacina Minas Gerais (grafico 10):

Com a partida n.º 5 de vacina M. G. injetámos 3 lótes de cobaias com 1 dóse de 1 cc., inoculando 10 e 12 dias depois, por via peritoneal, cada um dos virus.

(a) — Vacina M. G. + virus M. G. (grafico 10):

Da observação de 6 cobaias inoculadas com 0,3 cc. de virus-sangue resultou: 4 sobreviveram (2 reagiram e 2 não reagiram — 6764, 6765, 6767 e

6768); 2 morreram de pneumonia, 13 e 14 dias depois de receberem o virus (6766, 6763).

Tres testemunhas do virus morreram tendo apresentado quadro caracteristico de febre maculosa.

(b) — Vacina M. G. + virus S. P. (grafico 10):

Da série de 6 cobaias resultou: 4 sobreviveram, das quais 2 reagiram e 2 não; 1 (6864) morreu no 10.º dia mostrando á autópsia sinais de pneumonia e de febre maculosa; 1 (6863) morreu de pneumonia ao cabo dos 16 dias de observação, tendo tido varios dias de reacção febril.

As duas testemunhas do virus S. P. (0,3 cc.) foram tipicas.

(c) — Vacina M. G. + virus R. M. (grafico 10):

Compoz-se este lote de 9 cobaias (6 inoculadas com 0,3 cc. de virus e 3 com 0,5). Das 9, sobreviveram 5, das quais 4 sem reagir e 1 tendo reagido fortemente (6760). Uma (6759) morreu logo no inicio, de pneumonia, uma (6758) morreu de febre maculosa, uma (6687) morreu com pneumonia e febre maculosa e a restante (6762) foi sacrificada após intensa reacção com sinais de febre maculosa.

Das 5 testemunhas 4 morreram de febre maculosa e 1 foi sacrificada apresentando um quadro tipico da infecção.

Série 3 — Cobaias vacinadas com a vacina São Paulo (grafico 11):

(a) — Vacina S. P. + virus M. G.

Um lote de 8 cobaias foi empregado nesta série. Seis sobreviveram: as cobaias 6712, 6715 e 6722 não reagiram e as 6713, 6717 e 6723 reagiram febrilmente durante dois ou mais dias; as cobaias 6714 e 6716 foram sacrificadas durante a reacção, revelando á necrópsia lesões de febre maculosa.

As testemunhas 6742 e 6741 reagiram e morreram com infecção tipica.

(b) — Vacina S. P. + virus S. P.

De um lote de 8 animais só sobreviveram 2, que não reagiram. Dos 6 restantes, morreram 4 com sinais de febre maculosa (tres dos quais mostraram tambem lesões tipicas de pneumonia) e dois de pneumonia.

Tres cobaias testemunhas do virus S. P. reagiram tipicamente e morreram de febre maculosa.

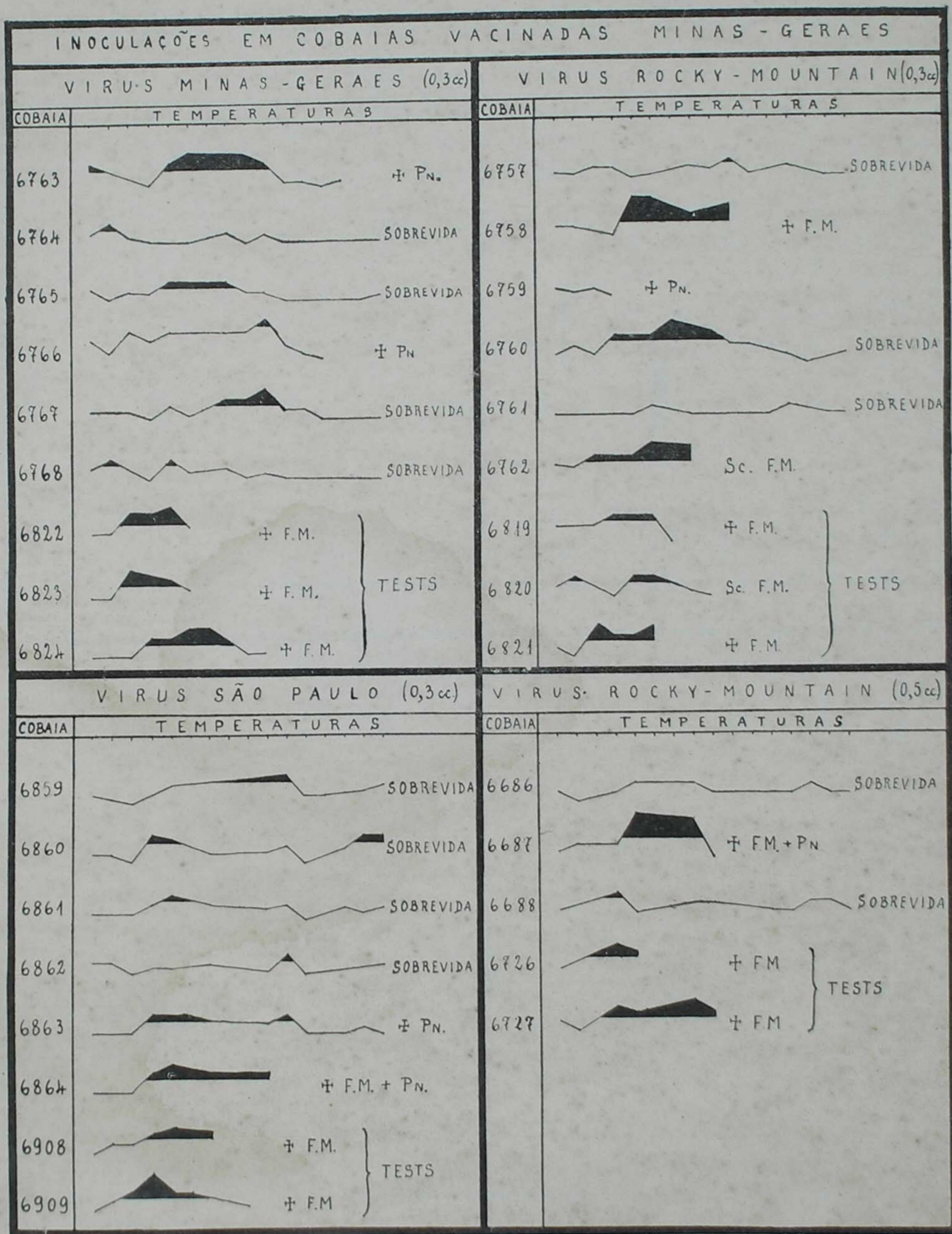


Grafico 10

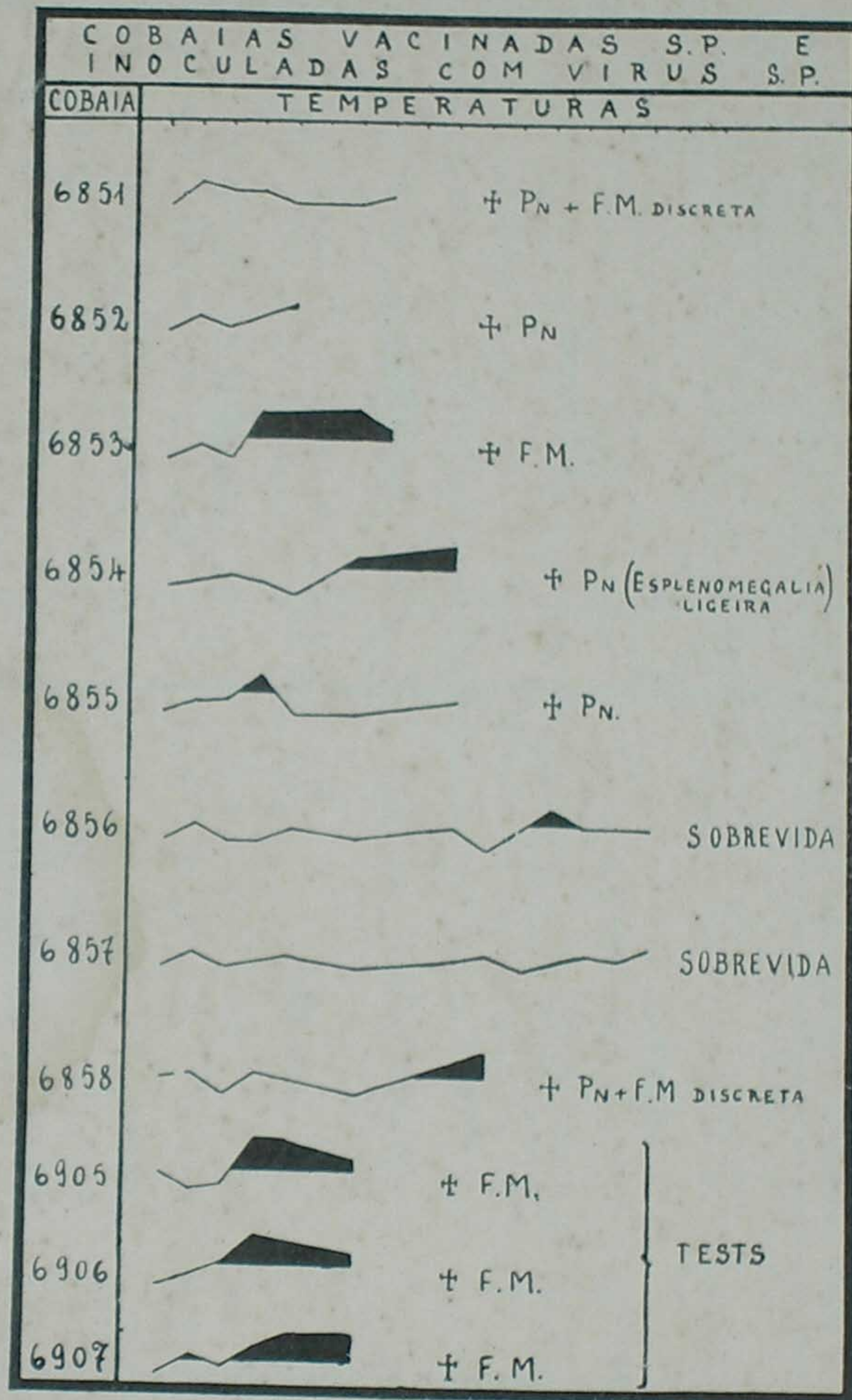
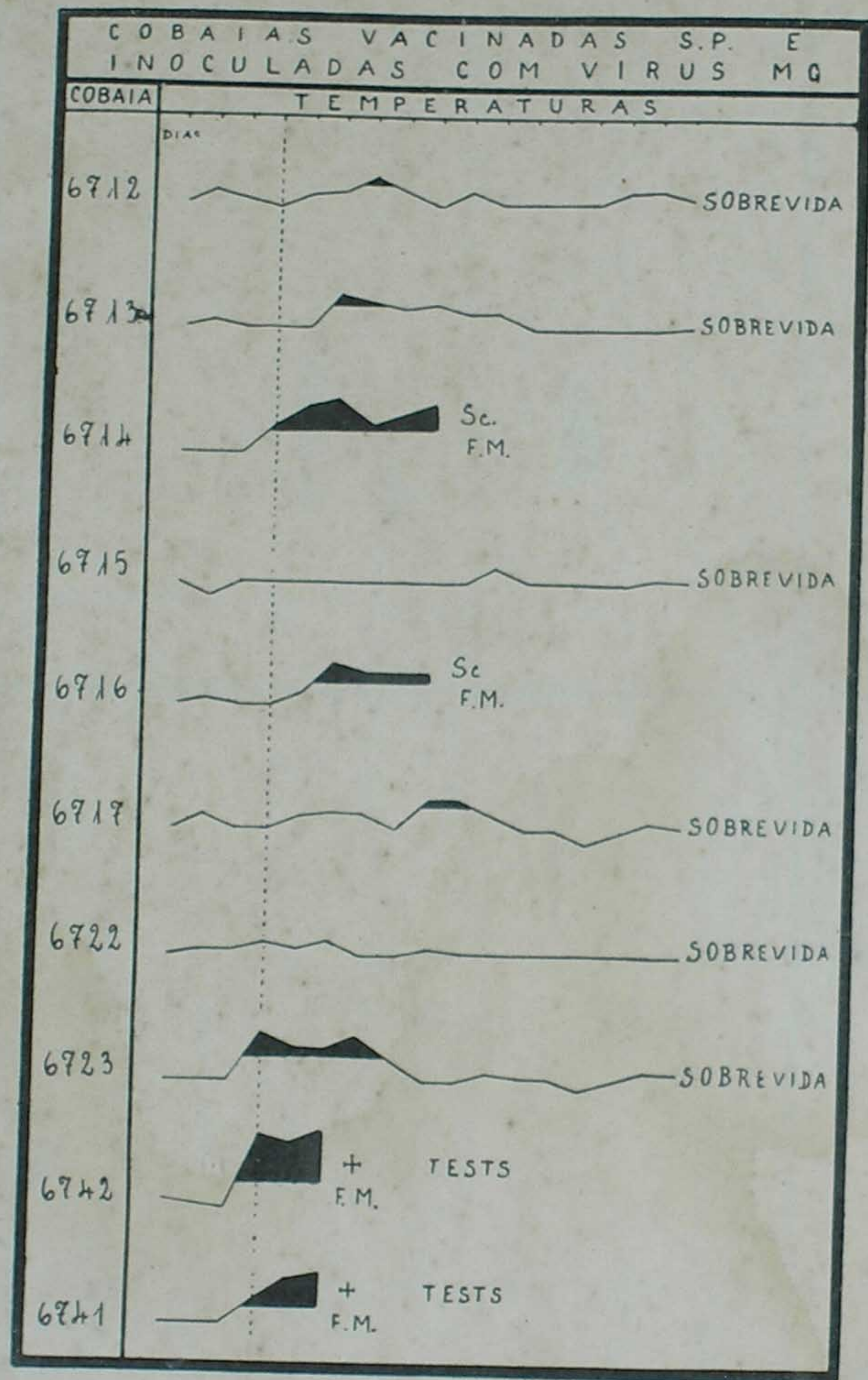


Grafico 11

## RESULTADOS GLOBAIS DAS PROVAS DE VACINAÇÃO

Na realização destas experiências e na observação dos animais nelas empregados observámos as mesmas regras gerais adotadas nas provas de imunidade crusada, com relação ao controle da purêsa dos virus, cuidados de assepsia e interpretação da curva térmica. A temperatura das cobaias foi acompanhada durante 16-20 dias após a inoculação do virus, sendo este praso mais longo do que o geralmente adotado no Laboratório das Montanhas Rochosas para dosagem das partidas de vacina, que é de 12 dias.

O quadro 2 encerra os resultados globais das diferentes séries de cobaias observadas, cuja interpretação faz parte do capítulo *Discussão* (pp. 176-177).

Quadro 2

Resultado global das provas de vacinação.

Vacina	Virus	N. util cobaias	Sobrevida	Totalmente imunes	Parcialmente imunes	F. M.		Cob. sem valor	Test. virus	Grafico n.
						Morte	Sacrif.			
R. M.	R. M.	8	3	1	2	1	—	4	4	9
	M. G.	30	22	11	11	1	—	7	8	8
M. G.	M. G.	6	4	2	2	—	—	2	3	10
	S. P.	5	4	2	2	—	1	—	2	
	R. M.	9	5	4	1	2	1	1	5	
S. P.	S. P.	8	2	2	—	4	—	2	3	11
	M. G.	8	6	3	3	—	2	—	2	
Total		74	46	25	21	8	4	16	27	

## PROVAS DE VACINAÇÃO DE PARKER

(Vaccine experiment 112; graficos 12 e 13)

Antes da impressão do presente trabalho enviamos ao Dr. R. R. Parker, Diretor do Rocky Mountain Laboratory, os graficos que resumem os resultados de nossas provas de imunidade, afim de submete-los á sua autorisada critica. Acompanhando sua resposta e autorisando a publicação no presente trabalho, enviou-nos aquele pesquisador resultados inéditos de experiencias de vacinação que realisara no intuito de verificar o poder protetor da vacina R. M. contra o virus Minas Gerais e Rocky Mountain, comparativamente.


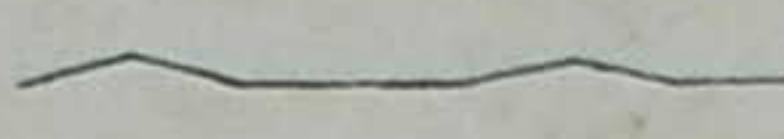


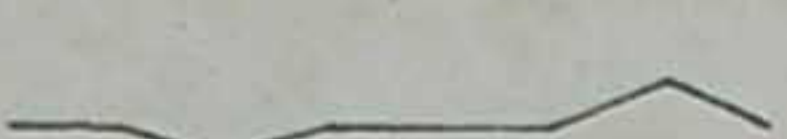
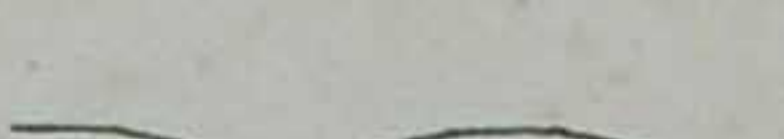

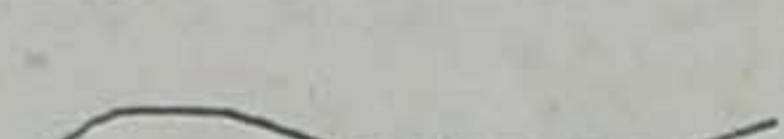
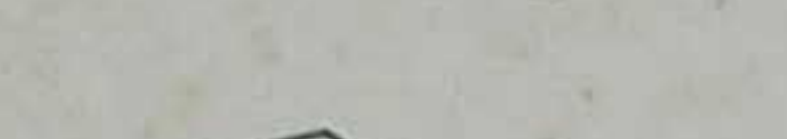
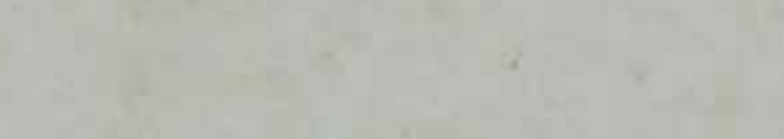





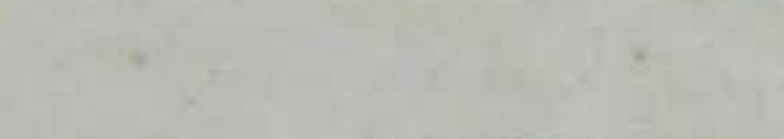





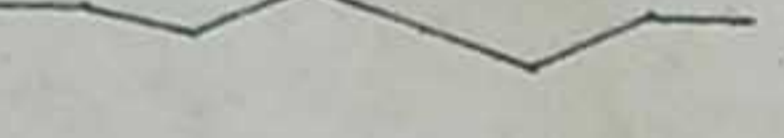

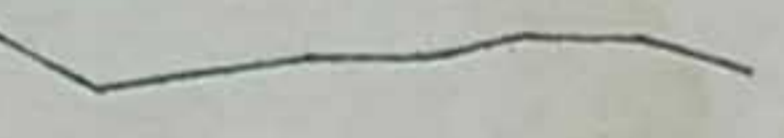





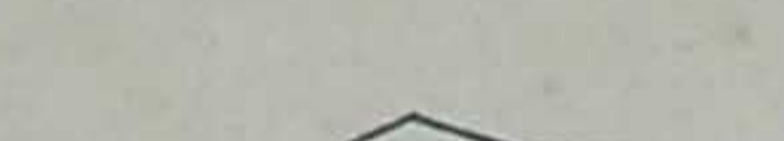

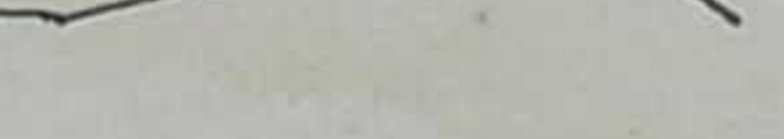






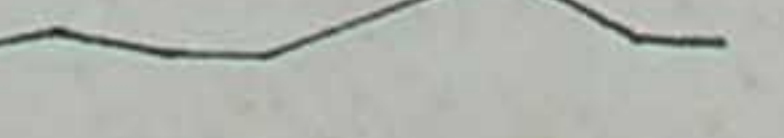

PARTIDA	Nº COBAIA	VIRUS R. M.		VIRUS M. G.
VACINA R.M 5557	13.719	 SOBREVIDA	13.725	 SOBREVIDA
	720	 "	726	 "
	721	 "	727	 "
	722	 "	728	 "
	723	 "	729	 "
	724	 "	730	 "
5556	13.707	 SOBREVIDA	13.713	 SOBREVIDA
	708	 "	714	 "
	709	 "	715	 "
	710	 "	716	 "
	711	 "	717	 "
	712	 "	718	 "
5555	13.695	 SOBREVIDA	13.701	 SOBREVIDA
	696	 "	703	 "
	697	 "	704	 "
	698	 "	706	 "
5554	13.683	 SOBREVIDA	13.689	 SOBREVIDA
	686	 "	690	 "
	687	 "	691	 "
			692	 "
			693	 "

Grafico 12

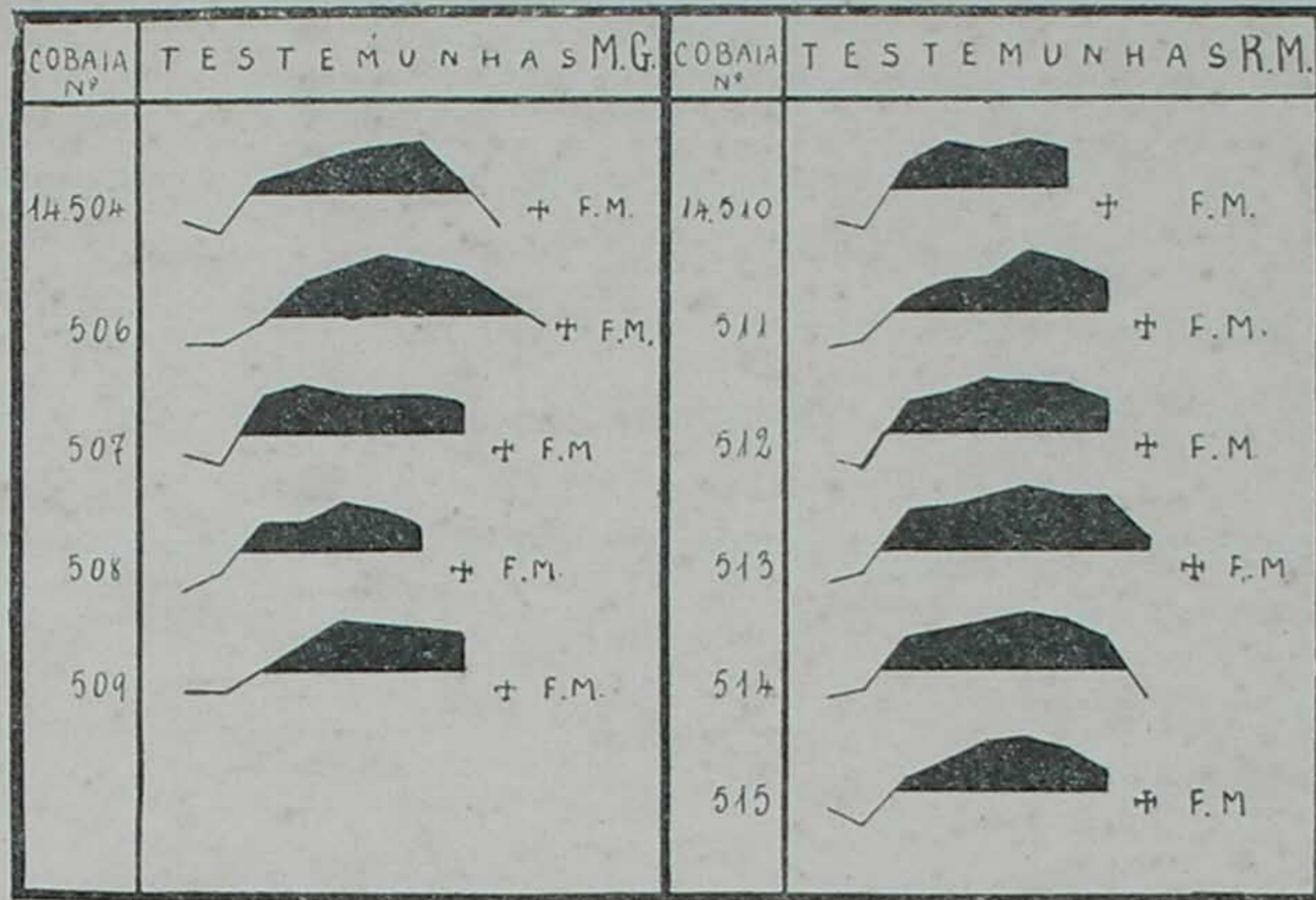


Grafico 13

Nessas experiencias serviu-se de 4 lótes de vacina da melhor potencia, com que inoculou 48 cobaias (12 para cada lote) com 1 cc. por via subcutanea; 10 dias mais tarde foi feita inoculação de virus-sangue no peritoneo, tendo 24 cobaias recebido o virus R. M. e 24 o virus M. G. O virus M. G. foi o mesmo que empregámos aqui e, segundo Parker, «This strain is more virulent than even the usual Bitter Root Valley strain» (comunicação pessoal).

Os resultados da experiencia 112 estão reunidos no grafico n.º 12, excluidos os resultados inutilizados por infecção intercorrente (*valueless*), mostrando sua análise que: das 24 cobaias provadas com o virus R. M. sobreviveram 19 (16 sen. apresentarem a menor reação febril) ao praso de 8 dias de observação, as 5 restantes tendo sido sem valor; e das 24 cobaias do virus M. G., 21 sobreviveram, sem reação, e 3 morreram de causas intercorrentes.

Um lote de 12 cobaias (grafico 13) foi testemunha dos virus, nas doses empregadas: das 6 do virus R. M. uma escapou após intensa reação, 5 morreram de F. M.; e das 6 do virus M. G., morreram 5 de febre maculosa e 1 de infecção intercorrente.

#### PROVAS DE REESTIMULAÇÃO ANTIGENICA EM COELHOS

Em coelhos que sobreviveram ao virus São Paulo após reação febril mais ou menos acentuada, foram feitas posteriormente reinoculações com os virus Rocky Mountain e Minas Gerais.

A primeira inoculação de virus (S. P.) foi feita nas seguintes datas: coelho 176 em 12/11/1937; coelhos 179 e 180, em 14/12/1937; coelhos 181 a 186, em 10/2/1938; coelho 199 em 28/3/1938. No dia 5/4/1938 os coelhos 176 e 179 a 183 receberam o virus de Minas Gerais, 3 coelhos

(184 a 186) foram inoculados com o virus R. M.; o n.º 199 foi inoculado com este virus em 6/5/938. A' exceção do coelho 199, que não mais foi inoculado, todos os demais foram reinoculados cruzadamente com os virus R. M. e M. G., no dia 6/5/938.

Como mostram os graficos ns. 13 e 14, a maioria dos coelhos não reagiu á 2.ª inoculação de virus, apenas 2 tendo tido reação febril pro-

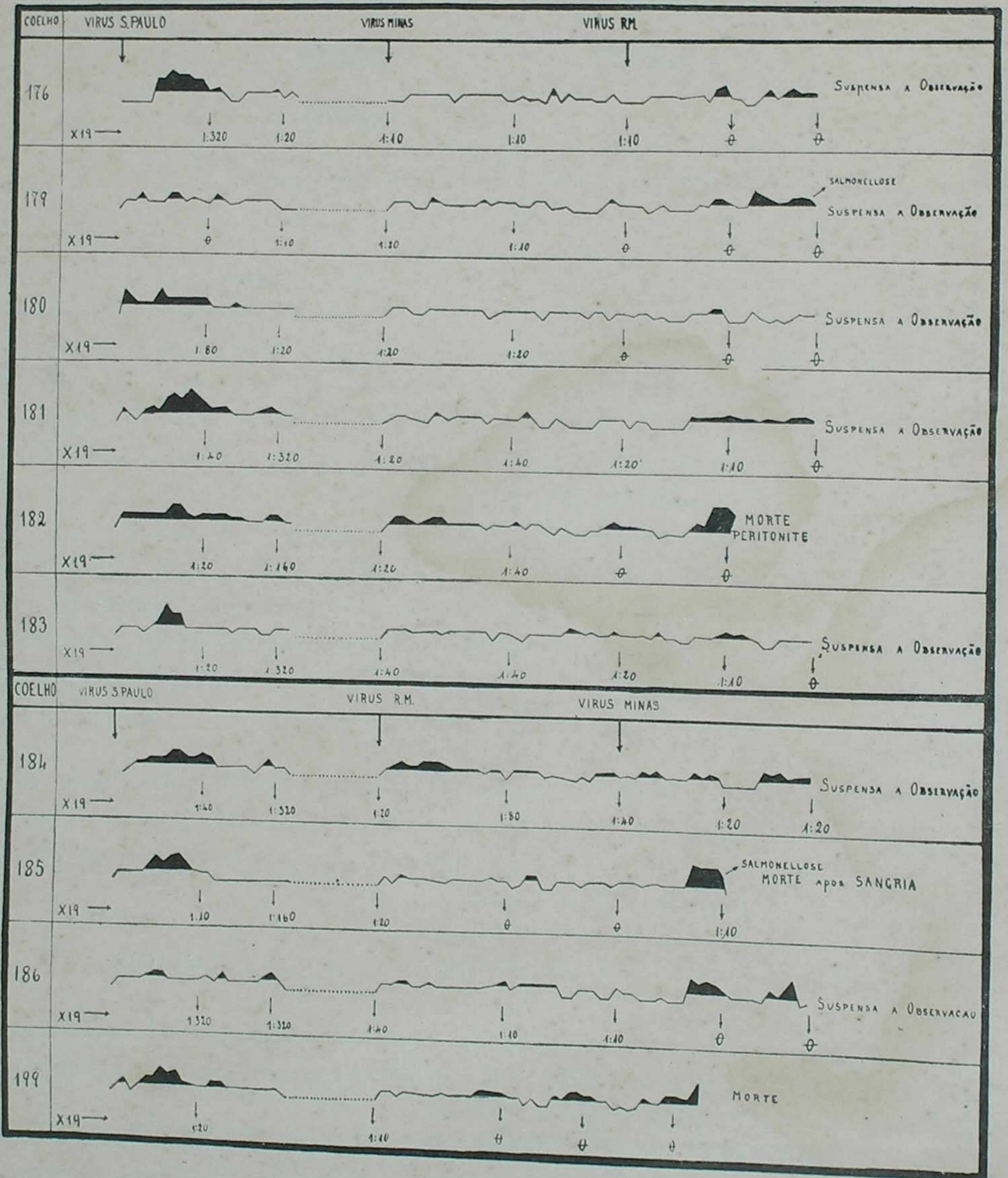


Grafico 14



longada (182, 184) nitida. Em seguida á 3.<sup>a</sup> inoculação, porém, a maioria dos coelhos sofreu elevação de temperatura acima de 39,6° por varios dias, mas constatamos por hemocultura tratar-se de uma salmonelose, complicação aliás comum nos nossos coelhos conservados nos bioterios por longo tempo<sup>1</sup>.

Nesses coelhos foi acompanhada por provas repetidas a curva do titulo aglutinante do sôro sanguineo para o Proteus X 19. Como se pode vêr no mesmo grafico, não se verificaram elevações significativas do titulo aglutinante em seguida ás reinoculações, não se tendo verificado portanto o fenomeno da reestimulação das aglutininas para o Proteus X 19, o que indicaria a igualdade ou a similhaça imunologica dos 3 virus de febre maculosa experimentados.

### SUMARIO E DISCUSSÃO

Desde varios anos é conhecida, no Brasil, a existencia dos chamados « tifo exantematico de São Paulo » e « tifo exantematico de Minas Gerais », que foram desde logo reconhecidos como pertencentes ao grande grupo das febres exantematicas ou « rickettsioses ». Os caractéres gerais da infecção, — aspéto clinico, epidemiologico e anatomo-patologico — incluíram-na no grupo da febre maculosa, cujo protótipo é a febre maculosa das Montanhas Rochosas. A sintomatologia da doença humana e experimental, e elevada mortalidade e demais características aproximam-na sobretudo da variedade Oéste da febre maculosa das Montanhas Rochosas, tal como grassa no Bitterroot Valey, em Montana.

Estudos imunologicos anteriores estabeleceram a grande semelhança ou mesmo a identidade do virus de São Paulo ao das Montanhas Rochosas.

Com relação ao virus de Minas Gerais, uma conclusão positiva não pôde ainda firmar-se pelas próvas de imunidade crusada, até agora realizadas. De suas experiencias de imunidade crusada entre o virus de Minas Gerais e as de São Paulo e das Montanhas Rochosas, Moreira & Magalhães (1934), concluindo que « Cobaias que se salvaram do virus de Minas podem morrer quando reinoculadas com o virus de São Paulo e morrem quando inoculadas com o virus Rocky Mountain », tendem a diferenciar o virus mineiro ao menos do das Montanhas Rochosas.

O valôr protetor da vacina Spencer-Parker da febre maculosa das

<sup>1</sup> O coelho 199, embora não tivesse recebido a 3a. inoculação também apresentou o mesmo quadro de infecção intercorrente, com hemocultura positiva, morrendo após um período febril mais ou menos acentuado.

Montanhas Rochosas foi diversas vês ensaiado. Moreira & Magalhães (1934) concluem primeiramente, da observação de 5 cobaias, que « A vacina da Rocky Mountain spotted fever não protege cobaias contra o virus mineiro ». Em trabalho ulterior Magalhães (1937) já pôde verificar um poder protetor parcial da vacina contra o mesmo virus, referindo que duas doses da vacina protegem cobaias contra a ação mortal do virus, mas não totalmente contra as reações febris, e que uma dose não protege contra a morte pelo virus mineiro. Magalhães (1938), em trabalho mais recente, descreve uma experiencia em que duas cobaias vacinadas com dose unica de 1 cc. se mostraram protegidas mesmo contra a reação febril; porém, o fato de haver conseguido reisolar o virus do cérebro destas cobaias, sacrificadas 10 e 11 dias após a inoculação do virus, levou-o a interpretar diferentemente o resultado da prova.

De suas provas de proteção com sôro de doentes, Moreira & Magalhães (1934) concluíram que « O sôro de convalescente do virus mineiro protege cobaias quando injetado imediatamente após a inoculação virulenta dos virus São Paulo, Rocky Mountain e Minas Gerais ».

Os resultados das diversas provas imunologicas realizadas com os virus de São Paulo e das Montanhas Rochosas são inteiramente concordes e demonstram a identidade destes virus. Em pesquisas paralelas, Monteiro (1933) e Parker & Davis (1933 a, b) verificaram que: sôro de coelhos imunes ao virus de São Paulo exerce ação protetora com relação ao virus Rocky Mountain, e vice-versa; e ainda que cobaias que sobrevivem á infecção pelo virus Rocky Mountain adquirem o mesmo grau de imunidade a este virus e ao de São Paulo, e vice-versa. A grande semelhança entre estes virus foi comprovada por Dyer (1933), que também verificou a resistencia ao virus São Paulo dos animais sobreviventes ao virus Rocky Mountain. Davis & Parker (1933) acumularam novos dados experimentais demonstrativos da imunidade cruzada entre infecções por estes virus, além de provarem o valôr protetôr da vacina Rocky Mountain contra o virus São Paulo, enquanto que concomitantemente Monteiro (1933) obtinha a proteção de cobaias contra o virus Rocky Mountain por meio de uma vacina preparada com carrapatos infectados com o virus São Paulo.

No presente trabalho descrevemos numerosas provas experimentais — de imunidade cruzada, de vacinação e de reestimulação antigenica — realizadas no intuito de esclarecer positivamente as relações imunologicas provavelmente existentes entre os virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas.

Nas experiencias de imunidade cruzada (v. graficos 1-7) foram empregadas 100 cobaias, sendo 56 de prova e 44 testemunhas. As co-

baías de próva, após resistirem á primeira infecção por um dos virus São Paulo, Minas Gerais ou Rocky Mountain, eram reinoculadas a intervalos com os outros dois virus sucessivamente (45 cobaias) ou com apenas um deles (11 cobaias). Algumas cobaias (graficos 5, 6 e 7) foram vacinadas com a vacina R. M. antes de submetidas ás próvas de imunidade cruzada. O resultado de conjunto destas próvas acha-se resumido no quadro I, cuja análise passamos a fazer.

Das 56 cobaias que sobreviveram á prévia infecção por um dos virus e que sofreram segunda inoculação, 50, ou 89,1%, sobreviveram; destas, 38 (76%) mostraram-se totalmente imunizadas, não tendo sofrido reação térmica superior a 39,6° C. por mais de 3 dias seguidos, e 12 (24%) mostraram-se parcialmente imunes; das 6 restantes, 5 morreram ou foram sacrificadas sem mostrar sinais de febre maculosa, e 1 foi sacrificada durante a reação apresentando sintomas de febre maculosa.

As cobaias submetidas a terceira inoculação de virus foram em numero de 37. Trinta, ou 81%, resistiram (4 foram sacrificadas após periodo suficiente de observação), das quais 27 (90%) apresentaram uma perfeita proteção e 3 (10%) sofreram reação febril; as 7 restantes morreram de pneumonia intercorrente, sem sinais de febre maculosa.

Das 44 cobaias que serviram como testemunhas da atividade dos virus empregados em segunda e terceira inoculação das cobaias de próva (e que foram 11 do virus São Paulo, 20 do Minas Gerais e 13 do Rocky Mountain), inoculadas com as mesmas doses usadas, 40 ou 90,9% morreram de febre maculosa em curto praso, 2 (virus R. M.) sobreviveram á intensa reação febril e 2 (virus R. M.) foram sacrificadas durante a reação.

Excluindo do total de animais de próva aqueles cuja morte por infecções intercorrentes invalidou as respectivas observações, verificamos que a percentagem das cobaias que sobreviveram á segunda e terceira inoculação de virus eleva-se respectivamente a 96% e 100%: á exceção portanto de um unico animal que foi sacrificado mostrando sinais de febre maculosa, mas que poderia ter sobrevivido, todos os demais que haviam resistido a uma primeira infecção, resistiram quando mais tarde reinoculados uma ou duas vêses com virus de procedencia diversa. O confronto destas cifras com a de 91%, que é a da mortalidade global das cobaias testemunhas, realça o valôr da próva.

Tratando-se de amostras de tamanha virulencia, estas próvas constituem segura indicação de que, em seguida á infecção por qualquer um dos tres virus em questão, um estado de imunidade se cria no organismo da cobaia sobrevivente, com relação tanto ao virus homólogo como quanto a qualquer dos outros dois, e a ambos sucessivamente. A próva de imu-

nidade cruzada é, segundo Pinkerton (1936), talvez a mais importante como critério isolado para a identificação dos virus de rickettsioses. Quando corretamente realizada e interpretada, ela permite quasi sempre, por si só, identificar fóra de duvida uma amostra de virus desconhecida.

O resultado das próvas de imunidade cruzada que realisámos com os virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas, são, a nosso vêr, demonstrativos da identidade destes virus.

Nossas próvas de vacinação foram feitas não sómente com a vacina Parker original como tambem com vacinas preparadas a partir de carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados desde larva com o virus Minas Gerais e com o virus São Paulo.

Lotes de cobaia foram injetados por via subcutanea com cada uma das vacinas e, alguns dias após, inoculados com virus-sangue por via peritoneal. Os detalhes sobre estas próvas e seus resultados figuram nos graficos 8 a 11, e os resultados estão reunidos no quadro n.º 2. Foram ao todo empregadas 101 cobaias, das quais 74 foram de próva e 27, testemunhas dos virus.

Das 74 cobaias de próva, morreram 16 de infecções intercorrentes, reduzindo o numero util de cobaias a 58. Dentre estas, sobreviveram á inoculações de virus 46, ou sejam 79%. Destas sobreviventes, 25 (43%) mostraram-se totalmente imunes e 21 (36%) reagiram febrilmente, mostrando-se, portanto, parcialmente imunes.

Dentre ainda as 58 cobaias em que a próva foi completada, 12 (20%) apresentaram febre maculosa, tendo morrido 8 e sendo sacrificadas 4.

As 27 cobaias testemunhas tiveram febre maculosa típica (100%), das quais morreram 25 e foram sacrificadas 2.

A percentagem de animais vacinados que tiveram febre maculosa somada á dos que reagiram á inoculação dos virus ( $36 + 20 = 56\%$ ), indica que o poder protetor das vacinas empregadas deixou a desejar. Entretanto, foi muito significativa a percentagem conseguida de sobrevividas ( $= 79\%$ ), e bem assim, a das cobaias que se mostraram protegidas mesmo contra as reações febris, isto é, totalmente imunizadas ( $= 43\%$ ).

E' sabido que as vacinas do tipo Spencer-Parker gosam de poder protetor mais evidente contra a mortalidade do que contra a morbilidade, no homem como nos animais. O estado de imunidade por elas conferido, bastante muitas vezes para prevenir a morte, nem sempre é suficiente para impedir a manifestação de febre e de outros sintomas devidos a maior ou menor ação patogenica desenvolvida pela circulação do virus no organismo. Póde ser muito diverso o poder protetor de diferentes partidas de vacinas deste tipo e, ainda mais, uma mesma partida póde ofe-

recer grau variavel de proteção para a mesma especie de animal. « A small amount of a given lot of vaccine may protect one guinea-pig while an equal and sometimes larger amount of the same material fails to protect another animal of approximately equal weight » (Spencer & Parker, 1925).

Devido a essa variabilidade, e á diversidade das condições em que praticámos nossas próvas de vacinação, não nos é possível comparar o poder protetor de cada uma vacina com o das outras, nem o poder imunisante de cada uma delas com relação aos diversos virus.

Estas provas mostram entretanto que vacinas de carrapato preparadas com um dos virus (R. M., S. P., M. G.) podem proteger cobaias contra a morte e contra as reações febris tanto com relação ao virus com que foram preparadas, como quanto a um dos outros ou a ambos. Além dos virus homólogos respectivos, as vacinas Rocky Mountain e São Paulo protegeram contra o virus de Minas Gerais, e a vacina Minas Gerais contra os virus São Paulo e Rocky Mountain.

Ao comunicar ao Dr. Parker os resultados de nossas provas de vacinação, feitas com partidas de vacina de fraco poder protetor, assim nos expressámos: « The protective value of the lots of tick-vaccine we used in the tests was rather poor, but it proved to be about the same for different strains of virus. Since the concerned viruses were so virulent, specially the Minas Geraes strain, we think the *partial immunity* afforded by different vaccines to many guinea-pigs, together with the *complete immunity* that some animals proved to have acquired, is a result which suggests the identity of the three viruses ». Perfeitamente concordante foi a conclusão de Parker, baseada nos resultados de sua experiencia 112 (vide grafico 12): « Spotted fever vaccine protects against Minas Geraes virus equally as well as against spotted fever virus » (comunicação pessoal).

Como as próvas de imunidade crusada, as de vacinação são sugestivas da identidade imunologica dos tres virus de febre maculosa.

Nas próvas de reestimulação antigenica empregámos 10 coelhos. Inoculados primeiramente com o virus São Paulo, apresentaram reação febril em seguida á qual o sôro sanguineo de alguns deles passou a aglutinar o Proteus OX 19 aos titulos maximos de 1/160 e 1/320, caindo depois o titulo aglutinante a 1/10 e 1/40. Submetidos á reinoculação, 6 coelhos com o virus Minas Gerais e 4 com o virus Rocky Mountain, não se observou elevação significativa do titulo aglutinante de seus sôros, o mesmo se verificando mais tarde quando 9 coelhos foram crusadamente reinoculados.

Foi, portanto, negativa a próva de reestimulação antigenica feita com os tres virus, o que é sugestivo de sua identidade.

As próvas de imunidade crusada, vacinação e reestimulação antigenica, que realizamos, demonstram claramente, a nosso vêr, a identidade imunologica entre os virus Minas Gerais, S. Paulo e Rocky Mountain. Esta conclusão está plenamente de acôrdo com o conjunto de conhecimentos adquiridos sobre febre maculosa, que nos mostram quanto tem de comum a febre maculosa das Montanhas Rochosas e a que grassa nos Estados de S. Paulo e Minas Gerais: o quadro clinico e anatomo-patologico, no homem e nos animais de experiencia; a transmissão por carrapatos e a epidemiologia; a aglutinação dos Proteus X pelos imunes-sôros; a morfologia das rickettsias, o tipo de celulas que invadem e sua distribuição no interior delas, são outros tantos elementos que nos permitem julgar os virus considerados como um mesmo virus, produzindo uma mesma doença.

### CONCLUSÃO

Os resultados das provas de imunidade crusada, de vacinação e de reestimulação antigenica, descritas neste trabalho, permitem assegurar a identidade imunologica dos virus de febre maculosa isolados em Minas Gerais, em São Paulo e nas Montanhas Rochosas.

### AGRADECIMENTOS

Os autores aproveitam a oportunidade para manifestar seu reconhecimento ao Dr. R. R. Parker, Diretor do Laboratorio das Montanhas Rochosas, pelas amostras de virus que bondosamente nos enviou; ao Dr. O. Magalhães, Diretor do Instituto Ezequiel Dias, pelo mesmo motivo; ao Dr. A. Vallejo, do Instituto Butantan, pelos demonstrativos graficos que organisou; e ao Sr. Zely Figueiredo, pelo muito que nos auxiliou em São Paulo, durante a realização do presente trabalho.

### BIBLIOGRAFIA

DAVIS, G. E. & PARKER, R. R.

1933. Additional studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. *Publ. Health Rep., Wash.*, **48** (33) : 1006-1011.

DIAS, E. & MARTINS, A. V.

1938. A preparação da vacina de Spencer e Parker contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas, no Rocky Mountain Laboratory, em Hamilton, Montana, Estados Unidos. *O Hospital, Rio de Janeiro*, **13** (1): 55-70.

## DYER, R. E.

1933. Relationship between Rocky Mountain spotted fever and exanthematic typhus of São Paulo. *Publ. Health Rep., Wash.*, **48** (20) : 521-522.

## MAGALHÃES, O.

1937. Typho exanthematico de Minas Geraes. Transmissão pelo carrapato americano. Outras experiencias. *Brasil Med., Rio de Janeiro*, **51** (34) : 871-873.
1938. Typho exanthematico de Minas Geraes. 10.<sup>a</sup> comunicação. *Brasil Med.*, **52** (4) : 115-116.

## MOREIRA, J. A. &amp; MAGALHÃES, O.

1934. Typhus exanthematico em Minas Geraes. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, **28** (2) : 225-234.

## PARKER, R. R. &amp; DAVIS, G. E.

- 1933 a. Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Mountain spotted fever. *Publ. Health Rep.*, **48** (19) : 501-507.
- 1933 b. Further studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. *Publ. Health Rep.*, **48** (29) : 839-843.

## MONTEIRO, J. L.

1933. Vaccina contra o « typho exanthematico » de São Paulo. Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas. *Memorias do Instituto Butantan*, **8** : 3-12.

## PINKERTON, H.

1936. Criteria for the accurate classification of the rickettsial diseases (Rickettsioses) and of their etiological agents. *Parasitology*, **28** (2) : 172-189.

## SPENCER, R. R. &amp; PARKER, R. R.

1925. Studies on Rocky Mountain spotted fever. Vaccination of Monkeys and Man. *Publ. Health Rep.*, **40** (41) : 2159-2167. (V. *Hygienic Laboratory Bull. n.º 154, P. H. S., Washington, 1930, pp. 28-36*).