

Étude expérimentale sur la grippe pandémique

par les Docteurs

Aristides Marques da Cunha, Octavio Magalhães et O. da Fonseca.

Les premiers résultats de nos recherches, faites à l'Institut O. Cruz de Rio et celui de Bello Horizonte, lors de la pandémie de grippe, furent publiées sous forme de note préliminaire dans le *Brazil-Medico* du 30 Nov. 1918.

Aujourd'hui, nous voulons donner les détails de ces recherches faites sur l'étiologie de la maladie, puisque c'est elle qui doit servir de base rationnelle à la prophylaxie et au traitement.

Selon l'avis de quelques uns de nos pathologistes les plus considérés, la grippe serait produite, comme la pneumoentérite des animaux, par un germe filtrable. Cette opinion est en grande partie due aux observations cliniques et épidémiologiques, faites au début de la pandémie. Parmi ses représentants se trouvent MM. les Docteurs ALCIDES GODOY, MARQUES LISBOA, EURICO VILLELA et ASTROGILDO MACHADO, dont les connaissances approfondies de pathologie les menèrent très tôt à l'observation de l'analogie clinique et épidémiologique entre la grippe d'un côté et les maladies de homme et des animaux produites par des germes filtrables (rougeole, rhume, hogcholerica etc), d'un autre. Ces idées *a priori*, nous servirent de point de départ, nous déterminant à la recherche d'un virus filtrable au moyen d'expériences, faites à un point de vue purement microbiologique.

Nous eûmes la satisfaction d'arriver à des résultats assez concluants et surtout de savoir que quoique l'orientation de nos études leur fût donnée lorsque nous ignorions encore les investigations des auteurs européens, elle leur fut semblable et conduisit aux mêmes résultats. En effet, nous étions déjà en voie de publication lorsque nous reçûmes les travaux de NICOLLE, LEBAILLY et VIOLLE, dans lesquels ces auteurs décrivent les premiers résultats de la production artificielle de la grippe chez l'homme et les animaux de laboratoire, au moyen d'inoculations de sang et de crachats filtrés.

Loin de diverger des leurs, nos expériences sont semblables, sauf pour quelques petites questions de détail; les résultats en sont identiques ou de nature à se compléter mutuellement.

L'étude étiologique, faite dans le but de trouver, soit le bacille de PFEIFFER, soit un autre germe auquel on pourrait attribuer la maladie, fut initiée dès l'apparition de l'épidémie à Rio.

Les premiers cas se montrèrent parmi les soldats du 56^e bataillon de Chasseurs. En partant d'eux, le Docteur CHAGAS inicia les recherches qui furent continuées par les Docteurs ASTROGILDO MACHADO et COSTA CRUZ; ils isolèrent, de la gorge des malades et même par hémoculture, un di-

plocoque qui fut considéré l'agent pathogène pendant un certain temps parce qu'il était très commun et existait dans le sang aussé. Mais les expériences d'inoculation d'animaux donnèrent des résultats négatifs et celles faites sur l'homme n'étaient pas concluantes. Le diplocoque en question est petit et forme souvent des chaînes. Il prend le Gram et se montre assez exigeant pour les milieux, ne donnant que des cultures maigres sur milieux ordinaires, mais abondantes sur milieux contenant du sang et du glucose, ainsi qu'en anaérobiose.

D'autres auteurs ont aussi isolé, de la gorge de grippés ou par hémoculture, des organismes dont les caractères coïncident avec ceux de notre diplocoque.

Le bacille de PFEIFFER fut isolé aussi, mais les essais d'inoculation chez l'homme et les réactions d'immunité, ne donnèrent pas de résultat.

En plus des investigations d'ordre bactériologique, faites en partant de cas de grippe et de complications qui survinrent, nous nous occupâmes de :

1°. Hémocultures.

2°. Inoculations de sang et de filtrat de crachat (homme et animaux de laboratoire).

3°. Vaccinothérapie avec des filtrats de crachat.

4°. Autohémothérapie.

5°. Réactions d'immunité.

La vaccinothérapie prophélaétique ne put être faite, puisque la pandémie était déjà en pleine période de déclin quand nous étions arrivés à des résultats qui la conseillaient.

1. Les hémocultures.

Nous avons cherché les germes du sang en circulation chez une dizaine de grippés, au moyen de hémocultures faites pendant les deux premiers jours de la maladie, c'est à dire au moment de la première période fébrile. Les échantillons de sang étaient obtenus aseptiquement par ponction veineuse et semés sur tous les milieux ordinaires, ainsi que sur des milieux speci-

aux contenant du sérum, du sang, du liquide d'ascite, et du glucose ou en anaérobiose. Notre attention se portait tout spécialement sur les milieux favorables au développement des spirochètes et des corpuscules globulaires de la poliomyélite endémique (milieux de NOGUCHI). Nous n'avons obtenus les corpuscules, décrits par FLEXNER comme agents de la poliomyélite, qu'une seule fois, en milieu de NOGUCHI. L'inoculation de 3 cc. de cette culture dans le péritoine de quelques cobayes ne produisit aucune réaction.

Les cultures de liquide céphalo-rachidien de grippés présentant des signes de méningite restèrent également stériles.

2. Les inoculations.

Les 14 expériences d'inoculation furent faites sur une quarantaine d'individus (hommes, cobayes et 6 espèces de singes). Elles avaient le double but de vérifier la présence du *virus* dans le matériel en étude et d'établir la transmissibilité expérimentale de la grippe.

Presque tous les animaux furent inoculés avec des produits considérés virulents, mais quelques uns furent inoculés avec des produits normaux, ou même seulement soumis à l'observation à titre de témoins.

La préparation des produits inoculés.

Le sang provenait des grippés au premier ou au deuxième jour de la maladie; exceptionnellement au troisième. Dans quelques cas il fut inoculé tel quel; dans d'autres, après défibrination, et dans d'autres encore, après filtration et dilution au dixième. Dans ce dernier cas la filtration durait deux heures et le sang était injecté immédiatement après sa fin, tandis que dans les deux premiers, il était inoculé tout de suite après la défibrination ou la saignée. Nous fîmes, en principe, des cultures du sang inoculé sur milieux ordinaires, surtout sur agar-sang et sur milieux de NOGUCHI pour les anaérobies. Sauf pour l'exception signalée plus haut les milieux restèrent stériles.

En plus des inoculations de sang, nous fîmes d'autres de moëlle osseuse triturée et diluée d'un individu mort de grippe. Les inoculés furent un *Jacchus penicillatus* et un singe du genre *Cebus* qui ne présentèrent rien d'anormal.

Le crachat tel quel ne fut inoculé qu'une seule fois et par le larynx, puisque nous craignons les infections secondaires que pourrait amener un autre genre d'introduction d'une substance si riche en germes. L'inoculé présenta des irrégularités thermiques que nous attribuons à la présence de ces derniers puisque elles ne furent constatées chez aucun animal inoculé avec du crachat filtré. Les bougies BERKEFELD et CHAMBERLAND furent employées toujours après dilution au cinquième en eau physiologique et homogénéisation mécanique par agitation au moyen d'un bâton de verre ou en flacon à billes. Les cultures témoins démontrèrent l'absence de bactéries dans tous les filtrats employés. Les cultures sur agar-sang furent surtout observées au point de vue du bacille de PFEIFFER et celles sur milieux de NOGUCHI au point de vue des corpuscules globoïdes. Nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la question du passage du bacille de PFEIFFER à travers les bougies et avons constaté qu'il pouvait se développer sur l'agar-sang, resté stérile après inoculation de crachats filtrés, mais seulement à condition d'être semé en partant de races isolées d'un grippé. Mais même si l'on arriverait à démontrer sa filtrabilité, cela n'annulerait pas nos expériences, puisque les conditions de filtration du crachat dilué et celles de la filtration d'eau physiologique pure sont bien différentes. Pour apprécier le degré du pouvoir filtrant des bougies employées par rapport à la solution filtrée, ainsi que pour éviter l'inoculation d'eau physiologique pure, nous faisons une recherche rapide d'albumine dans les substances filtrées.

Expériences d'inoculation.

a) SANG.

1^{re} expérience. Singe. Un singe du genre *Cebus* est inoculé avec environ 8 cc. de

sang nature, provenant d'un grippé au premier jour de la maladie. La réaction est intense et prolongée. (Courbe n. 1).

2^{me} expérience. Ouistiti. Le sang d'un grippé en pleine période fébrile, état avancé de la maladie, est inoculé à un *Jacchus penicillatus*. Il meurt 12 jours après; l'autopsie révèle la présence de pneumocoques dans la rate.

3^{me} expérience. Cobayes. Trois cobayes sont inoculés par la voie intra-péritoneale avec 2 cc. du sang d'un grippé; un autre avec 3 cc., et un autre encore avec 5 cc. du même sang. Celui qui reçoit 3 cc. donne une réaction faible. (Courbe 2); les autres réagissent fortement présentant une hyperthermie accusée et prolongée. (Courbes 3 à 6).

4^{me} expérience. Cobayes. Trois cobayes, inoculés avec du sang de grippé en état fébrile, au premier et au deuxième jour de la maladie, en raison de 2, 3 et 5 cc., ne réagissent point.

Témoins.

Sept cobayes sont inoculés avec du sérum humain normal et six autres avec du sang humain normal, nature. Aucune réaction.

b) MOELLE OSSEUSE.

6^{me} expérience. Singe et Ouistiti. La moëlle osseuse triturée et diluée d'un individu mort de grippe est inoculée sous la peau d'un singe du genre *Cebus* et d'un *Jacchus penicillatus*. Point de réaction thermique accusée.

c) CRACHAT.

7^{me} expérience. Singe. Un singe est inoculé (deux fois en deux jours successifs) avec des substances prises dans la gorge d'un grippé. Il donne une réaction thermique 24 heures après la deuxième inoculation. La courbe est très irrégulière, ce qui est peut être dû à la collaboration d'autres germes avec le virus de la grippe. (Courbe 7).

8^{me} expérience. 20 cc. de crachat filtré sont introduits sous la peau d'un singe du genre *Ateles* et 20 autres dans son péritoine. La réaction thermique est nette et prolongée (Courbe 8).

9^{me} expérience. Singe. Un singe du genre *Cebus* inoculé de la même façon que le précédent donne une forte réaction. (Courbe 9.)

10^{me} expérience. Singes. 5 cc. de filtrat de crachat sont inoculés au singe de la neuvième expérience et 5cc. à un autre de la même espèce qui n'avait encore subi aucune inoculation. Le singe inoculé pour la deuxième fois ne réagit plus; l'autre réagit fortement atteignant 41° C. (Courbe 10).

11^{me} expérience. Cobayes. Trois cobayes sont inoculés avec 2, 3, et 5 cc. de crachat filtré. Celui qui reçoit les 5 cc. réagit franchement. Les autres ne réagissent point.

12^{me} expérience. Homme. Un filtrat de crachat est inoculé dans le pharynx de deux hommes dont l'habitation commune est complètement à l'abri de la grippe; les doses sont pour un d'eux 5, pour l'autre 10 cc. Aucune réaction.

13^{me} expérience. Le crachat filtré de la gorge d'un grippé est inoculé par la même voie à deux hommes et sous la peau de deux autres, vivant dans les conditions de l'expérience 12. Le résultat est identique.

14^{me} expérience. Cobaye. Le singe qui réagit lors de la dixième expérience est saigné quand sa température est à 41° C.; 5 cc. du sang sont injectés dans le péritoine d'un cobaie et 5 cc. dilués en eau physiologique sont injectés à trois autres par voie intrapéritonéale, à raison de 5 cc. Aucune réaction.

Témoins.

Une émulsion de diplocoque, inoculée dans le pharynx d'un *Cebus* et une émulsion du bacille de PFEIFFER inoculée dans le pharénx de deux hommes, ne provoquent aucune réaction.

3. Vaccinothérapie par filtrats.

L'impossibilité de faire une culture du virus étant démontrée par les expériences précédentes, l'orientation de nos recherches nous mena à nous servir des substances virulentes provenant des malades, pour la préparation du vaccin. Nous employâmes donc des filtrats de crachat, préalablement

chauffés et traités par l'acide phénique, pour les injections faites sous la peau des grippés.

Nous ne pouvons arriver à aucune conclusion définitive sur les résultats de ce procédé parce qu'il ne fut employé qu'une demi-douzaine de fois; nous signalerons pourtant que, comme on le verra par le résumé qui suit, les résultats furent favorables. Tous les essais furent faits sur des adultes.

1^{re} observation. Cas avancé. La température oscille entre 38° et 39° C. depuis 10 jours. Une seule dose de 2 cc. est employée. Elle ne donne pas un résultat favorable (Courbe 12).

2^{me} observation. Cas avancé et grave. Température se maintenant au-dessus de 39° C. Deux doses sont employées en deux jours successifs. La température baisse dès la première dose et tombe à 36° C. après la deuxième (Courbe 13).

3^{me} observation. Cas récent. Température continuellement entre 38,8° et 39° C. Emploi d'une dose de 2 cc. de crachat filtré. 12 heures après chute de la température à 37° C. La vaccination n'est pas répétée et 3 jours après la température remonte à 38° (Courbe 14).

4^{me} observation. Cas récent. Température 39,6°. Emploi de 4 cc. de filtrat. La température tombe à 37,4°; elle remonte à 38° C., sans que la dose soit renouvelée. (Courbe 15).

5^{me} observation. Cas récent, deuxième jour de la maladie. Température 38° C. Inoculation de 2 cc. de filtrat, chute à 38,8° C., puis oscillations pendant deux jours, ensuite chute à 37,4° C. (Courbe 16).

6^{me} observation. Cas récent, premier jour de la maladie. Température: 39,2° C. Emploi de 6 cc. de filtrat; chute immédiate et continue à raison de 1° par 12 heures, atteignant 36° C. le deuxième jour (Courbe 17).

4. Autohémothérapie.

Ce procédé fut employé pendant la période la plus critique de l'épidémie. Il était justifié par le fait que (l'existence du virus

En résumé: avec le sérum de convalescent la réaction était positive 5 fois sur 7; avec le sérum de cobaie inoculé avec du sang, 1 fois sur 4; elle ne fut essayée qu'une fois avec du sérum de singe inoculé avec une émulsion de bacille de PFEIFFER et une fois avec du sérum de singe inoculé avec du filtrats de crachat de grippé et fut négative dans les deux cas. Le sérum normal de boeuf et de cobaye donnerent des résultats négatifs aussi.

Discussion.

Nous considérons les expériences et observations que nous venons de décrire amplement suffisantes pour établir la filtrabilité du *virus* de la grippe et son pouvoir de produire la maladie expérimentalement chez les animaux de laboratoire.

Le critérium adopté par nous est le même que celui de NICOLLE et LEBAILLY, c'est à dire la réaction thermique qui survient à la suite de l'inoculation. La légitimité de ce critérium peut être mise en doute par quelques auteurs qui pourront objecter que l'hyperthermie peut être due à l'action toxique des substances inoculées ou même résulter tout simplement d'une variation accidentelle de la température de l'animal en observation, sans signification pathologique. Ayant songé à ces deux objections, nous nous efforcâmes dès le début de nos recherches à trouver un déterminisme expérimental qui les écarterait. Les précautions prises consistaient en une observation très soignée de la température des animaux en étude, surtout des singes, suivie d'une interprétation rationnelle des courbes thermographiques.

Chez les singes la température ne varie pas seulement selon espèce, mais même selon l'état d'agitation ou de repos de l'individu. Il faut donc que les conditions dans lesquelles la température est prise soient rigoureusement identiques et que l'on ait une courbe thermographique du même animal en état normal. En plus de ce système suivi par nous, nous avons tenu compte de la température d'autres singes normaux qui ne jouè-

rent que le rôle de témoins pendant toute la durée des études.

Les singes inoculés avec sang et filtrat de crachat par les méthodes décrites, reagissaient deux jours après l'inoculation par une élévation de température atteignant 2° C., qui persistait pendant quelques jours et disparaissait ensuite après quelques oscillations. L'ensemble de nos observations nous démontra que l'intensité et la durée de ces oscillations ne sont jamais égalées par les variations normales ou accidentelles.

La présence d'une période d'incubation, l'immunité conférée par la première inoculation et l'absence de réaction quand les filtrats ont été chauffés ou traités par l'acide phénique montrent qu'il ne s'agit pas d'une fièvre toxique mais d'une hyperthermie produite par un agent vivant.

Les expériences d'inoculation de sang filtré ou nature, ainsi que celles d'inoculation de filtrats de crachat, donnèrent parfois des résultats négatifs; mais ils ne peuvent pas réfuter la conclusion à laquelle nous avons été menés, c'est-à-dire que la grippe est produite par un virus filtrable qui peut provoquer des réactions chez les animaux de laboratoire. Voyons pourquoi c'est ainsi.

Si quelques filtrats employés n'étaient pas virulents, ce fait est certainement dû à la rétention des germes par les bougies, déjà démontrée pour d'autres germes qui les traversent dans la plupart des cas et néanmoins sont quelque fois retenus, enduisant les inexpérimentés en erreur. Cette rétention peut être due à des conditions accidentelles des substances filtrées. Quant il s'agit de la filtration des solutions de crachat, dont la composition et la concentration sont variables et qui peuvent être plus ou moins riches en albumine et autres substances qui influent sur le degré de filtrabilité, elle est encore plus compréhensible.

Ce n'est donc pas étrange que quelques uns des crachats filtrés de grippés provoquent des réactions, tandis que d'autres n'ont aucun effet. Il y a en plus la possibilité de la disparition du *virus* avant la filtration.

L'absence de réaction chez les animaux inoculés avec du sang nature a été aussi constatée par NICOLLE et LEBAILLY et ne signifie pas que le sang ne contient jamais le virus; il existe dans le sang pendant une courte période pendant laquelle celui-ci est infectieux et a des propriétés curatives. Cette période une fois passée, toute inoculation de sang reste sans effet, parce que le *virus* s'est localisé dans d'autres parties du corps du malade ou en est même déjà disparu.

Il nous semble que les résultats, obtenus par nous au moyen de l'autohémothérapie et de la vaccinothérapie par filtrats, confirme notre interprétation, puisqu'ils sont plus efficaces pendant les premiers jours de fièvre, qui correspondent probablement à une phase de septicémie. Cette opinion est partagée par VIOLLE, qui l'exprime en parlant des résultats positifs de ses expériences d'inoculation de sang en nature et de sang filtré.

Le grand nombre de résultats positifs de la précipitation entre filtrats de crachat et sérum de convalescents est aussi en faveur de notre opinion.

Nous n'entrerons pas dans le détail des travaux sur l'étiologie de la grippe faits par de nombreux auteurs à un point de vue purement bactériologique. Nous devons pourtant citer ceux qui traitent de l'existence d'un virus filtrable et de sa transmissibilité expérimentale, c'est-à-dire NICOLLE, LEBAILLY et VIOLLE en France, SELTER et Mc. KEEGAN aux États Unis et ARAGÃO au Brésil. Nous avons déjà cité maintes fois les trois premiers, qui, l'exception de SELTER ont été seuls à obtenir des résultats positifs. Nos conclusions sont en accord avec les leurs.

Mc. KEEGAN se croit autorisé, à la suite d'un petit nombre d'expériences, à déclarer qu'il ne s'agit pas d'un *virus* filtrable. ARAGÃO dans son article publié dans *Brazil Medico* (vol. 32. n. 45. p. 253) déclare n'avoir eu que des résultats négatifs aux expériences d'inoculation de substances de la gorge de grippés: il dit que la réaction est

insignifiante, quand on inocule dans le larynx, et que les animaux périssent d'affections secondaires quand on les introduit par une autre voie. ARAGÃO ne dit pas qu'il a fait des filtrats et qu'il les a inoculés et ne cite aucune inoculation de sang. Ses résultats négatifs ne peuvent donc comme il est d'ailleurs le premier à le reconnaître, être considérés définitifs.

Conclusions.

1. La grippe est une maladie infectieuse produite par un *virus* filtrable.
2. Ce *virus* existe dans le sang des grippés pendant certaines phases de la maladie.
3. Le *virus* se trouve dans le crachat des grippés.
4. Le sang et le crachat des grippés conservent généralement leur virulence après filtration sur bougie; quand il y a perte de virulence, elle est due à la propriété de rétention des bougies, déjà constatée pour d'autres germes filtrables.
5. Le *virus*, tant du sang comme du crachat, peut provoquer des réactions chez différentes espèces d'animaux, avant ou après filtration; la réaction prend la forme d'une hyperthémie intense et prolongée et survient après une période d'incubation.
6. Les filtrats virulents chauffés et phéniqués semblent avoir des propriétés curatives.
7. L'autohémothérapie est souvent efficace; son efficacité doit dépendre de l'existence du *virus* dans le sang.
8. Un singe fut immunisé par une première inoculation de crachat filtré et ne réagit plus lors d'une deuxième, faite après un certain délai.
9. La réaction de précipitation entre filtrat de crachat de grippé et sérum de convalescent (homme) est souvent positive.
10. La réaction de fixation entre sérum humain et filtrat est négative.

Explication des Courbes.

(Voir le texte portugais. p. 174 à 191).

Les croix indiquent les dates des injections ou inoculations.

- Courbe n. I. 1^{re} expérience. Singe du genre (*Cebus*); inoculation de sang.
- Courbe n. II. 2^{me} expérience. Cobaye; inoculation de sang. Réaction faible.
- Courbe n. III. 3^{me} Expérience. Cobaye; inoculation de sang. Réaction intense.
- Courbe n. IV. 3^{me} expérience. Cobaye; inoculation de sang. Réaction intense.
- Courbe n. V. 3^{me} expérience. Cobaye; inoculation de sang. Réaction intense.
- Courbe n. VI. 3^{me} expérience. Cobaie; inoculation de sang. Réaction intense.
- Courbe n. VII. 7^{me} expérience. Singe; inoculation pharyngienne de crachat nature. Réaction intense, courbe tres irregulière.

- Courbe n. VIII. 8^{me} expérience. Singe (*Ateles*); inoculation de filtrat de crachat. Réaction intense.
- Courbe n. IX. 9^{me} expérience Singe (*Cebus*); inoculation de filtrat de crachat. Réaction intense.
- Courbe n. X. 10^{me} expérience Singe (*Cebus*); inoculation de filtrat de de crachat. Réaction intense.
- Courbe n. XI. 11^{me} expérience. Cobaye; inoculation de 5cc. de crachat filtré. Réaction faible.
- Courbe n. XII. 1^{re} Observation vaccinothérapique par filtrat de crachat. Résultat negatif.
- Courbe n. XIII. 2^{me} Observation vaccinothérapique par filtrat de crachat. Résultat favorable.
- Courbe n. XIV. 3^{me} Observation vaccinothérapique par filtrat de crachat. Résultat favorable.
- Courbe n. XV. 4^{me} Observation vaccinothérapique par filtrat de crachat. Résultat favorable.
- Courbe n. XVI. 5^{me} Observation vaccinothérapique par filtrat de crachat. Résultat favorable.
- Courbe n. XVII. 6^{me} Observation vaccinothérapique par filtrat da crachat. Résultat favorable.