

# Mielencefalite espontânea dos camundongos

por

Hermínio Linhares

Instituto Oswaldo Cruz

e A. Borges Fortes

Docente e Chefe de Clínica Neurológica da Faculdade Nacional de Medicina

(Com 18 figuras no texto)

A presença de vírus em certos animais aparentemente sadios, motiva às vezes erros em observações experimentais. Tem-se procurado contudo conhecer as doenças dos animais de laboratório, principalmente as causadas por vírus, que freqüentemente mascaram os resultados de inoculações com outro material. O camundongo foi apontado como portador de vários vírus, mesmo em animais de criação em que todos os cuidados são tomados para evitar qualquer contaminação possível.

Foi Theiler (31, 32) quem descobriu e descreveu a encefalomielite espontânea dos camundongos, causada por vírus. O período de incubação dessa doença varia de 7 a 30 dias; há paralisia flácida de um ou mais membros, mas quando os animais são muito jovens morrem após inoculação intracerebral sem ter paralisia. Exceto a via intracerebral, a instilação nasal é o único método de infecção. O vírus não é patogênico para o macaco rhesus. Foram isoladas cinco amostras de vírus, tendo tôdas aproximadamente o mesmo grau de virulência, exceto a amostra 4, relativamente avirulenta, com a qual nenhum ou apenas poucos camundongos do total inoculado mostram sintomas de paralisia.

Theiler e Gard (34) verificaram que o vírus mede 9 e 13 milimicra, é destruído rapidamente na temperatura de 50°C, precipita pelo sulfato de amônio e tem dois ótimos de estabilidade, um cêrca de pH 8,0 e outro 3,3. Animais inoculados por via intracerebral com amostra pouco virulenta adquirem alto grau de imunidade a uma subsequente inoculação de amostra muito virulenta. Há relação entre a amostra de vírus inoculada e o tempo de incuba-

---

\* Recebido para publicação a 29 de janeiro e dado à publicidade em fevereiro de 1944.

ção; a recíproca do período de incubação achado é proporcional ao logaritmo da amostra de vírus inoculada (10).

O vírus foi obtido purificado por GARD e PEDERSEN (11). BOURDILLON (3) aplicou o método da difusão analítica ao estudo deste vírus e observou que a preparação não era homogênea, com 10% de infetividade em partículas com cerca de 15 milimicra de diâmetro. MELNICK (21) concentrou 4.000 cc. de uma solução contendo cérebro de camundongo infetado, em volumes de 40 a 80 cc. O vírus presente nas soluções pervaporadas foi também concentrado no ultracentrífugo em frações ativas, com volume menor do que 1 cc.

GILDEMEISTER e AHLFELD (12) verificaram um caso de meningencefalite espontânea em camundongos de criação, causada por um vírus que foi passado em camundongo por inoculação intracerebral. O principal sintoma era paralisia dos membros posteriores. Nem todos os animais morriam; nesse caso albergavam o vírus no cérebro e medula por muito tempo. IGUCHI (15) também isolou um vírus, de uma doença semelhante à encefalite descrita por THEILER, tendo feito 15 passagens.

OLITSKY (23 a 26) observou que camundongos normais albergam o vírus no intestino, o qual não foi isolado do alimento ou da água. O vírus não foi encontrado em camundongo com menos de 12 dias de idade, estivesse ou não presente no intestino materno; com 20 a 25 dias foi observado irregularmente, porém a partir daí se encontra com grande freqüência. Mesmo animais inoculados no cérebro têm filhos que não demonstram vírus até o 5.º dia. Não foi isolado do cérebro de animais que tinham o vírus no intestino. Não conseguiu infetar rhesus por inoculação intracerebral, não tendo sido mesmo possível evidenciar o vírus no sistema nervoso central, 24 horas depois de administrado. OLITSKY e SCHLESINGER (28) isolaram-no também do intestino de camundongo cinzento aparentemente normal.

THEILER e GARD (35) isolaram um vírus das fezes de camundongo, semelhante ao estudado; animais alimentados com água e comida esterilizadas, continuaram a excretá-lo por mais de 53 dias.

Resultados interessantes foram obtidos por DUNHAM e PARKER (5) inoculando o vírus em embrião de galinha; fizeram suspensão a 10% de cérebro de camundongo infetado e inocularam por via intracerebral embriões de 11 a 13 dias, conseguindo 6 passagens, sem que entretanto houvesse sinais evidentes de infecção; o cérebro de embriões da terceira e sexta passagens produziu infecção em camundongos; o cérebro da sexta passagem foi inoculado na membrana corioalantóide e após 5 passagens neste tecido, matou camundongo com sintomas típicos.

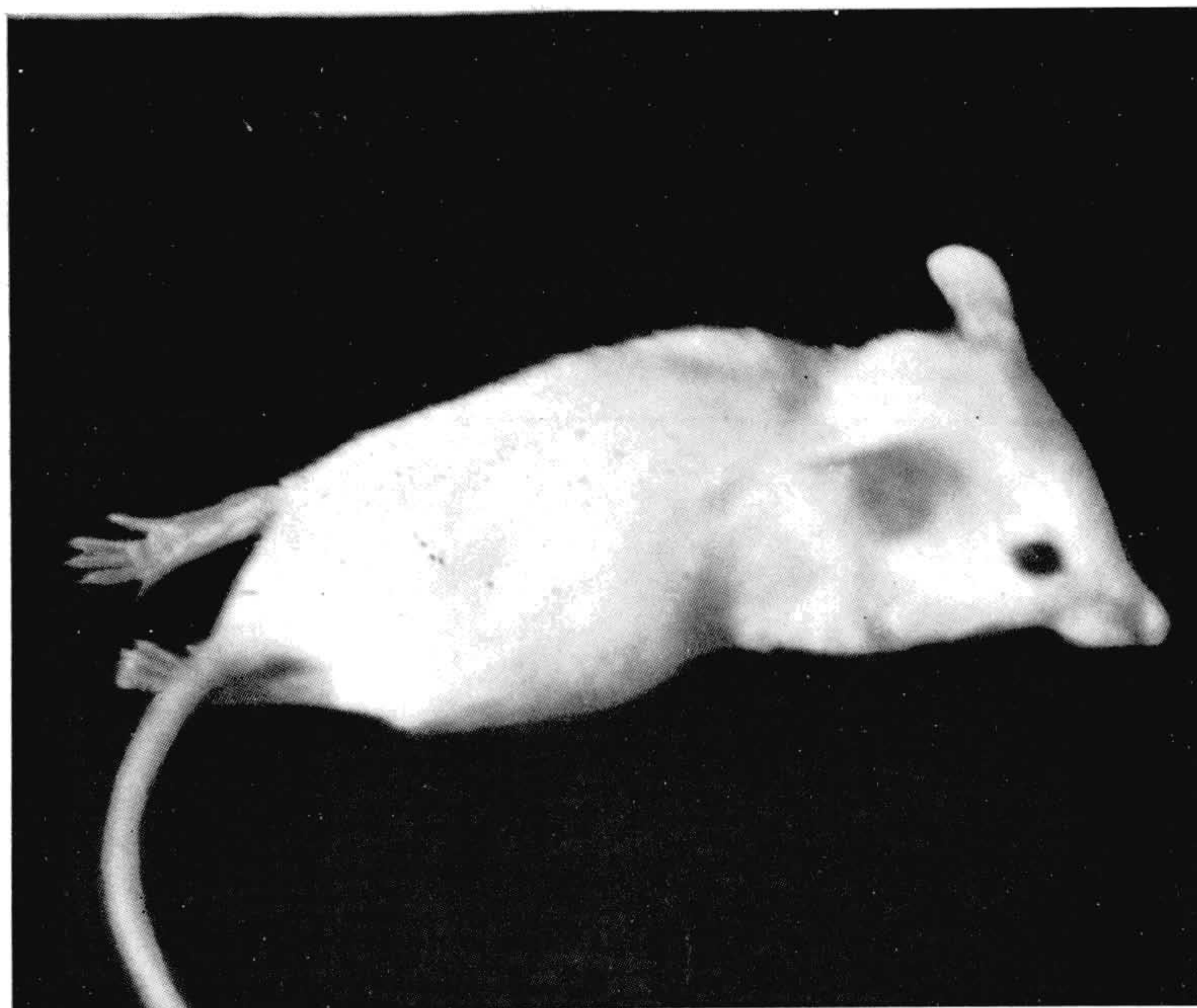


Fig. 1 — Camundongo branco de criação, com mielencefalite espontânea.

Foto *J. Pinto*.

GAHAGAN e STEVENSON (9) isolaram um vírus produtor de encefalomielite espontânea de camundongo transmissível por via intracerebral, mas não por instilação nasal. Algumas diferenças pequenas quanto ao comportamento do vírus levaram à suposição de que talvez não se tratasse do vírus de THEILER.

FINDLAY (7) diz que este vírus da encefalomielite de THEILER não foi encontrado na Inglaterra.

E' nossa intenção neste trabalho relatar o isolamento de amostras de vírus encefalomielítico, obtidas de camundongos espontaneamente infectados e apresentar os resultados dos estudos feitos a fim de determinar algumas de suas características.

#### MATERIAL E MÉTODOS

a) Amostras de vírus: após já têmos visto camundongos com encefalomielite espontânea entre os animais de criação da Fundação Rockefeller, resolvemos procurar também a doença nos camundongos brancos, suíços, da criação do Instituto Oswaldo Cruz, aliás provenientes da Fundação. Em

13-7-43, examinamos 7.000 animais com mais de 18 dias. Encontramos um com o pêlo eriçado, certa dificuldade em andar, devido a uma paralisia do membro posterior esquerdo; havia também outro, já moribundo, que apresentava paralisia de todo o trem posterior. Êstes animais, antes de serem sacrificados, foram mostrados ao Diretor do Instituto, Dr. HENRIQUE ARAGÃO, conhecedor de doenças por vírus, o qual sugeriu fôsem feitas inoculações em outros animais.

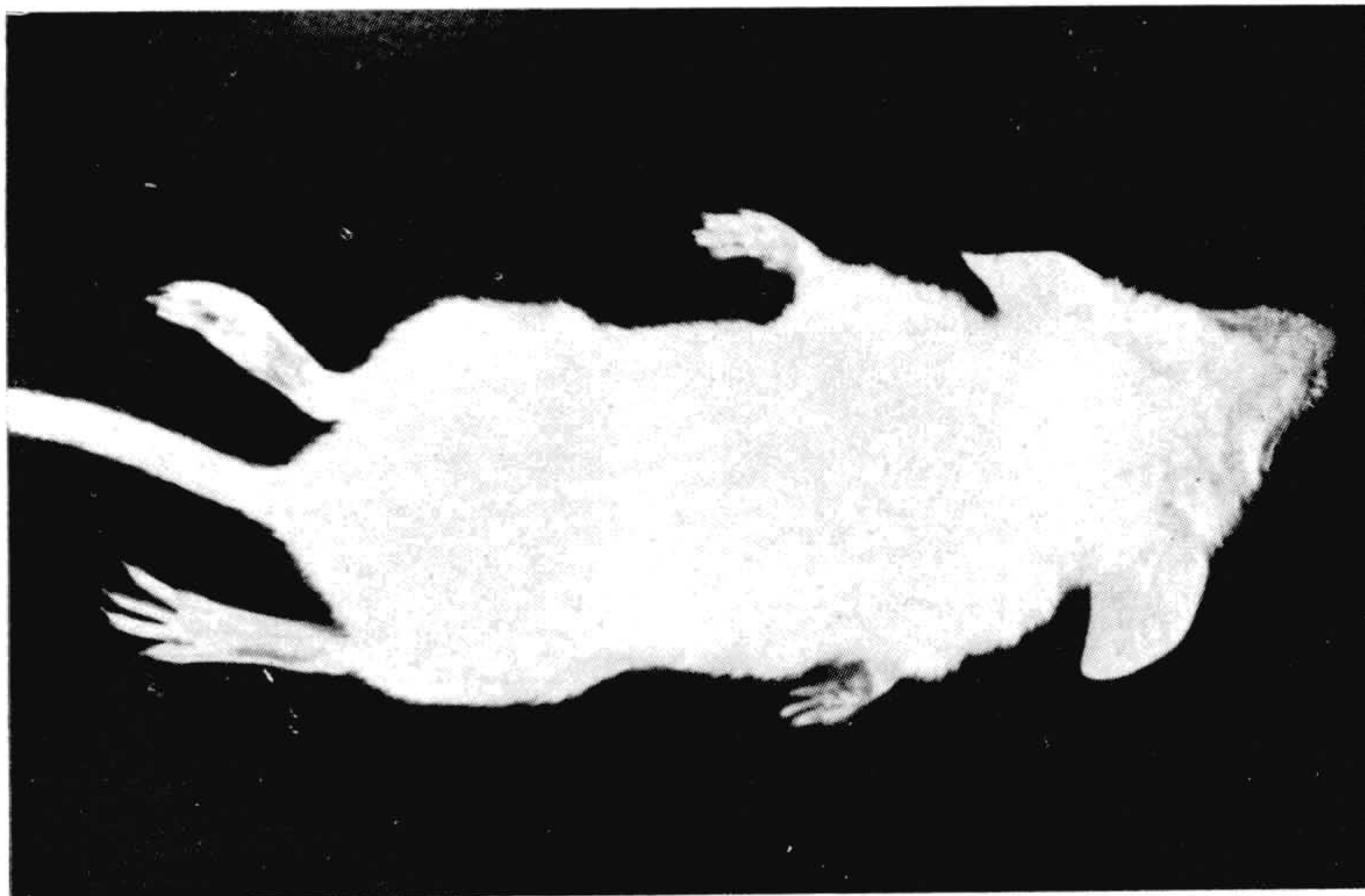


Fig. 2 — Tetraplegia em camundongo com mielencefalite após instilação nasal do vírus.

Foto M. Cesar.

Êstes dois camundongos foram sacrificados com éter, retirados o cérebro e medula, com os quais foram feitas suspensões a 10% em solução fisiológica e para cada uma inoculados, por via intracerebral, camundongos adultos de 36 dias e jovens de 19 dias.

Com o material proveniente do animal moribundo, dos camundongos adultos morreram, um no 11.º dia pós-inoculação e outro no 14.º dia, com sintomas de encefalomielite; ambos mostraram paralisia dos membros posteriores. Os demais inoculados, num total de 8, morreram nos primeiros dias após a inoculação sem sintomas aparentes de infecção.

No outro lote, de 10 camundongos, 7 ficaram doentes, sendo que 3 foram sacrificados no início, 2 morreram doentes mas sem paralisia, 1 morreu no 11.º dia após apresentar por dois dias paralisia dos membros posteriores e 1 foi sacrificado a fim de serem feitas passagens, após 6 dias de doença, apresentando uma paralisia progressiva.

Em outra série de experiências, seguindo a técnica de OLITSKY (20) sacrificamos 14 camundongos aparentemente normais, adultos de mais ou menos 40 dias de idade, retiramos todo o intestino que foi triturado e emulsionado juntamente com as fezes. A suspensão foi feita em caldo simples, centrifugada 10 minutos e filtrada em Chamberland L5; também foi feita emulsão idêntica e filtrada em Seitz EK (essas filtrações foram feitas no laboratório



Fig. 3 — Cérebro de camundongo com mielencefalite espontânea. Circunvolução do hipocampo. Infiltração mononuclear perivascular, em focos. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

de Bacteriologia, graças à gentileza do Dr. GENÉSIO PACHECO, a quem muito agradecemos). Em seguida, inoculamos 0,03 cc. i. c. do filtrado em camundongos adultos; foi possível a observação de um agente filtrável capaz de produzir uma doença semelhante à de THEILER.

Essas três amostras serviram para as experiências.

b) Animais de experiência: camundongos suíços, albinos, criados no laboratório, com idade variável de 3 a 6 semanas, foram utilizados neste estudo para as pesquisas e dosagens dos vírus isolados.

c) Técnica de infecção: foram feitas pesquisas inoculando camundongos por via intracerebral, algumas vezes por via intraperitoneal e por instilação nasal. As inoculações geralmente foram feitas em grupos de 6 camundongos, os quais receberam, quer nas inoculações intracerebrais quer nas instilações

nasais, 0,03 cc. de suspensão de cérebro e medula infetados; para a inoculação intraperitoneal, administrava-se 0,20 ou 0,40 cc. de suspensão de vírus e ao mesmo tempo fazia-se, para os camundongos adultos, uma injeção i. c. de 0,03 cc. de suspensão a 2% de goma de amido.

Para as titulações foram utilizados grupos de 6 camundongos adultos, cada um dos quais recebeu diluições decimais de vírus. A mortalidade de 50 % dos animais, o ponto limite da titulação, foi calculada pelo método de Reed e Muench (29), no qual uma dose mínima mortal (DMM) é definida como a quantidade de vírus contida em 0,03 cc. da diluição "ponto limite".

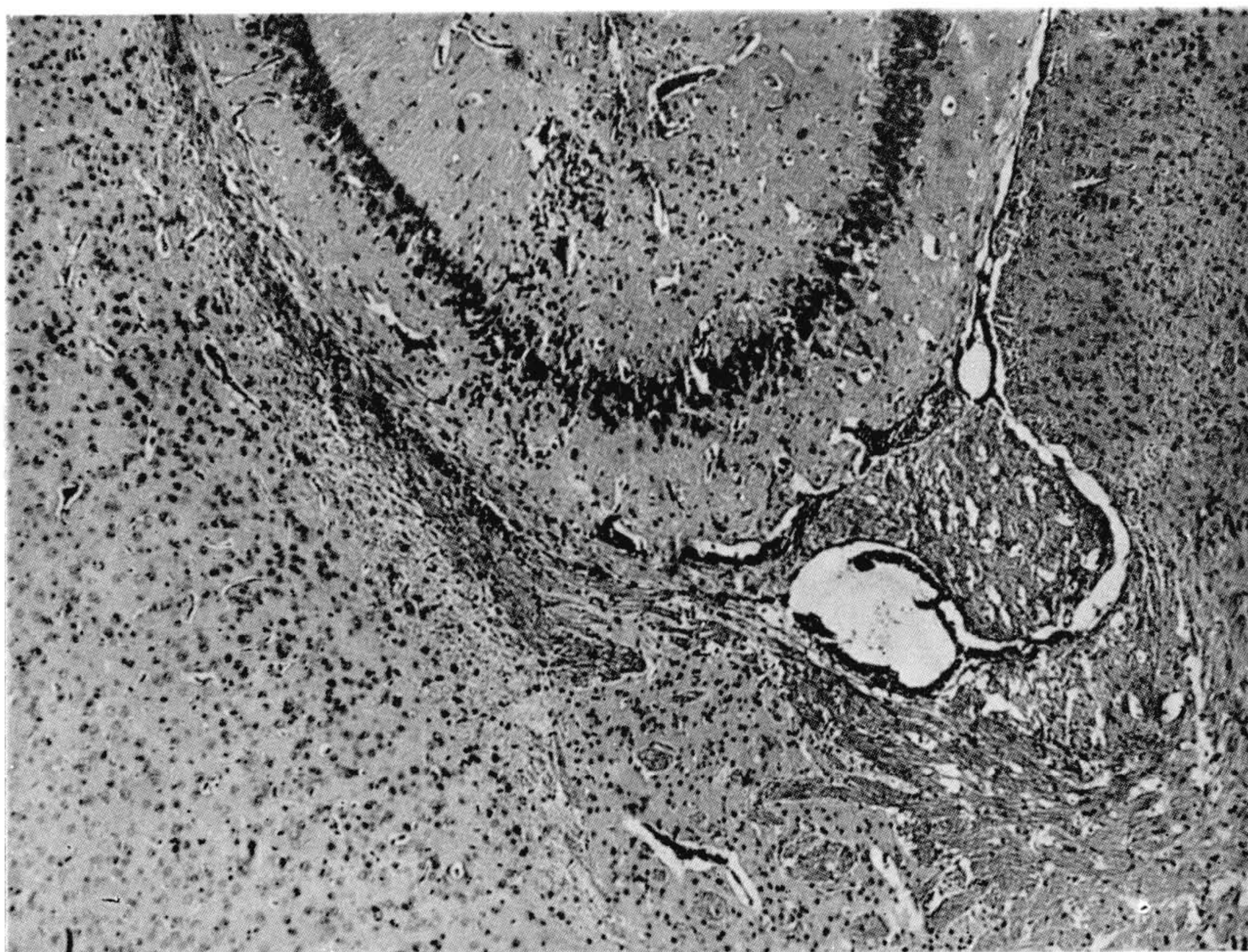


Fig. 4 — Outro aspecto da lesão observada na fig. 3.

Foto J. Pinto.

d) Observação dos animais : êles foram examinados diariamente pelo menos durante 40 dias e registrados em cartões adequados todos os sintomas observados.

e) Passagens do vírus : para as passagens foram retirados cérebros de camundongos paráliticos, geralmente moribundos, que foram sacrificados com éter. As suspensões foram feitas em solução fisiológica e o material filtrado em Chamberland L3. ou Seitz EK. Grupos de 6 e 12 camundongos foram inoculados por via intracerebral.

f) Exames histopatológicos : foram feitas autópsias em animais cuja morte se processou como término da doença ou que foi produzida pelo éter ou

clorofórmio. Retirados os cérebros e medulas, foram fixados em formol a 10% e corados pela hematoxilina-eosina. Com esse material foram feitos os estudos sôbre as lesões histopatológicas produzidas pelo vírus.

#### PARTE EXPERIMENTAL

##### 1) — *Isolamento do vírus e passagem em série.*

Durante o exame dos camundongos da criação do Instituto Oswaldo Cruz, observamos dois que apresentavam o aspecto da doença de Theiler, num total de 7.000 animais. Ambos eram adultos, com idade de 5 a 6 semanas.

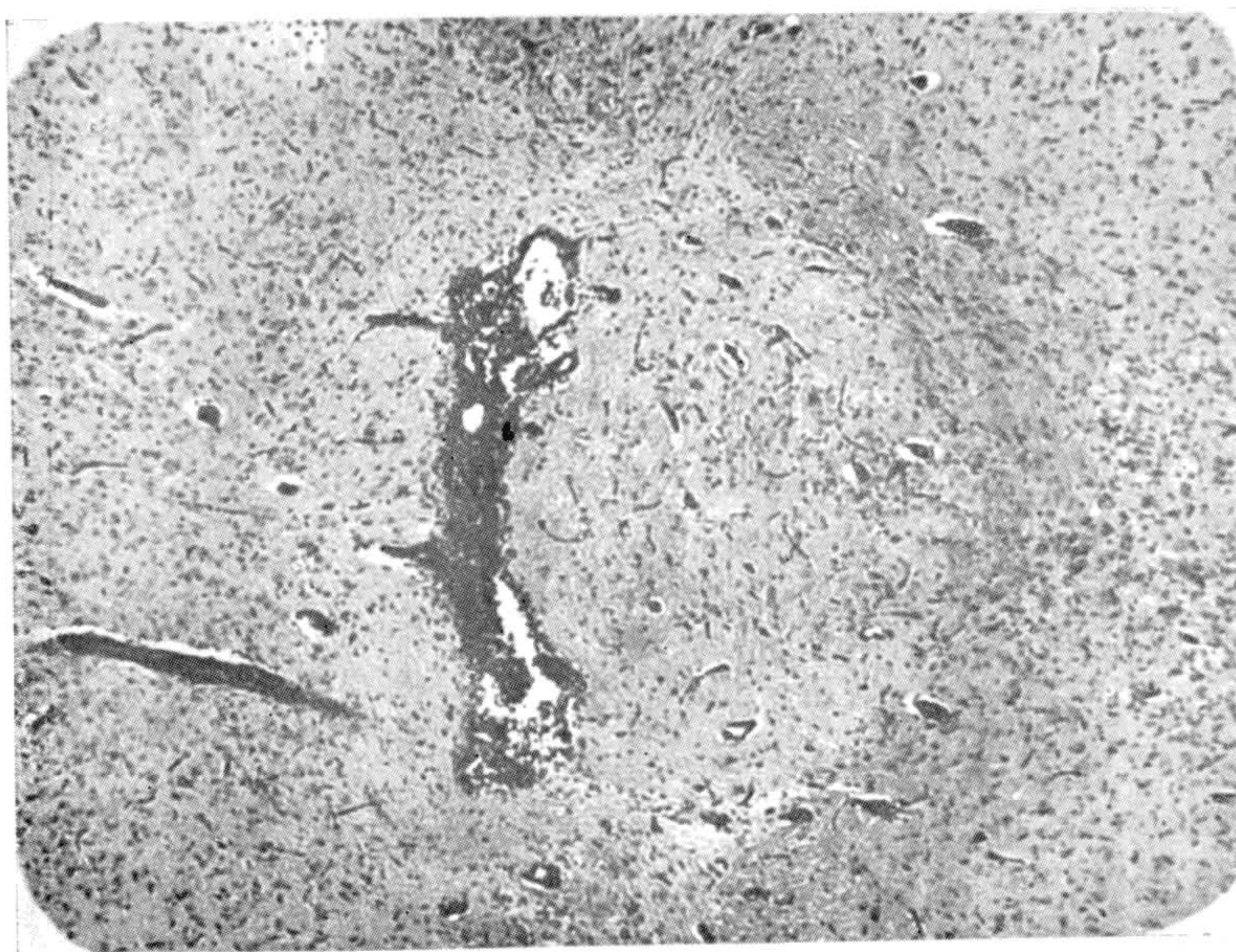


Fig. 5 — Cérebro de camundongo com mielencefalite espontânea. Hemorragia no espaço de Virchow-Robin, coincidindo com intensa infiltração mononuclear perivascular. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

Êles foram sacrificados com éter, retirados os cérebros e medulas, feitas suspensões a 10% em solução fisiológica, sendo o material inculado por via intracerebral em grupos de 6 a 12 camundongos. A terceira amostra foi obtida por trituração e filtração do intestino de camundongos aparentemente normais. Foram feitas com as 3 amostras dez passagens por inoculação intracerebral em camundongos adultos e jovens; geralmente utilizamos material de camundongos paralíticos, mas em alguns casos fizemos passagens com cérebro e medula de animais ainda no período de incubação. Denominamos as três amostras de A, B e C.

As passagens sucessivas aumentaram a virulência, o que se verificou não só pela diminuição do período médio de incubação como pela maior incidência da morbidade e da mortalidade (quadro nº 1). Assim, por exemplo, com a amostra A foram inoculados, na segunda passagem, 12 camundongos dos quais 7 ficaram paráliticos, 3 entre os adultos e 4 entre os de 21 dias, com tempo médio de incubação para os primeiros de 15, 2 dias e para os últimos de 12 dias, tendo apenas morrido 1 durante o período de observação. Na décima passagem também foram inoculados 12 animais, tendo todos ficado paráliticos, com tempo médio de incubação para os adultos de 10,3 dias e para os de 21 dias de 9,2, morrendo todos, com apenas uma exceção, até o 30.º dia. Verificou-se que o período médio de incubação é sempre menor nos camundongos jovens.

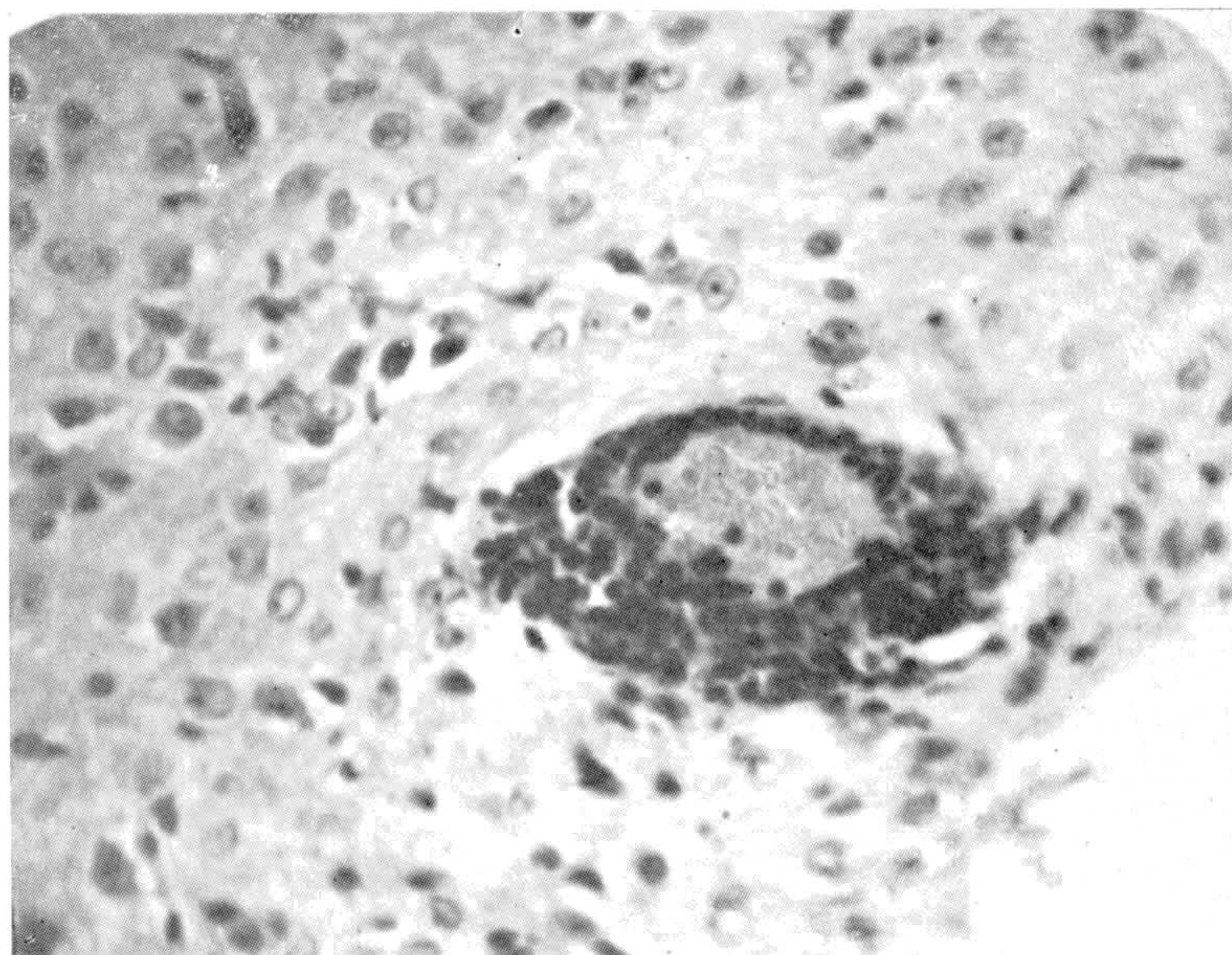


Fig. 6 — Cérebro de camundongo com mielencefalite espontânea. Infiltração mononuclear perivascular.

Foto J. Pinto.

Após dez passagens resolvemos fazer prova de imunidade cruzada a fim de verificarmos, como tudo aliás parecia mostrar, que as três amostras eram idênticas. Tomamos 12 camundongos de cada grupo, que haviam sido inoculados no cérebro 50 a 80 dias antes deste teste e que sobreviveram à infecção; cerca de 30 dias antes inoculamos os animais com 0,3 cc. intraperitoneal, com o mesmo vírus que eles haviam recebido antes. Dividimos em três subgrupos de 4 e inoculamos por via intracerebral cada um deles com as três



amostras de vírus. Assim, por exemplo, o grupo que recebera a amostra A foi separado em três subgrupos recebendo um deles novamente a amostra A e os outros dois as amostras B e C. O mesmo foi feito com os outros grupos. Como controle foram inoculados camundongos normais da mesma idade. O resultado (quadro n.º 2) mostrou que a grande maioria dos animais não apresentam novamente sintomas de infecção.

Essa pesquisa não afasta contudo a hipótese de ter havido um fenômeno de interferência, pois o vírus pode sobreviver muito tempo no sistema nervoso central, após uma inoculação por via intracerebral. Fizemos então uma experiência menor com as amostras A e B. Inoculamos quatro vezes, com intervalo de 5 a 7 dias, dois grupos de 5 camundongos jovens, com 0,3 cc. intraperitoneal de cada uma das amostras. Trinta dias depois injetamos por via intracerebral 0,03 cc. de suspensão a 10% da amostra A no grupo B e da amostra B no grupo A. A imunização dos camundongos por via intraperitoneal com a amostra A produziu uma imunidade observada pela inoculação intracerebral da amostra B, pois em 5 ficaram apenas 2 doentes, ao passo que 4 controles normais que receberam a amostra B apresentaram paralisias e morreram no prazo da observação. Por outro lado os camundongos imunizados com a amostra B e que foram depois inoculados no cérebro com a amostra A, num total de 5, apenas 1 apresentou paralisia ou qualquer outro sintoma de infecção durante todo o período de observação; no entanto, os controles normais inoculados com a amostra A adoeceram e morreram todos. Outrossim o tempo médio de incubação nos 3 camundongos que apresentaram paralisia, nos dois grupos previamente imunizados, foi de 17,6 e nos controles de 13,3 dias.

QUADRO N.º 1

**RESULTADOS OBSERVADOS NA II, VI E X PASSAGEM POR VIA INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGO, DAS TRÊS AMOSTRAS DE VIRUS ISOLADAS**

AMOSTRA	PASSAGEM	CAMUNDONGOS ADULTOS				CAMUNDONGOS DE 21 DIAS			
		N.º	Paralíticos	* P. M. I.	Mortos	N.º	Paralíticos	* P. M. I.	Mortos
A	II	6	3	15,2	1	6	4	12,0	0
	VI	6	6	10,5	4	6	6	9,5	6
	X	6	6	10,3	6	6	6	9,2	5
B	II	6	3	13,0	0	6	3	11,6	2
	VI	6	3	11,3	3	5	4	10,6	4
	X	6	6	10,4	4	6	6	10,0	4
C	II	6	3	17,3	1	5	3	16,3	1
	VI	6	4	15,2	2	4	2	12,0	2
	X	6	4	13,2	3	5	4	10,3	3

(\*) P. M. I.: período médio de incubação, em dias.

## QUADRO N.º 2

**PROVA DE IMUNIDADE CRUZADA ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C,  
DE VIRUS PRODUTOR DA MIELENCEFALITE DOS CAMUNDONGOS**

IMUNIZAÇÃO		PROVA DE IMUNIDADE			
Amostra de vírus	Via	0.03 cc. i. c. de vírus	N.º do camundongo	N.º de doentes	%
A	i. c. e i. p.	Amostra A	4	0	0
A	i. c. e i. p.	Amostra B	4	1	25
A	i. c. e i. p.	Amostra C	4	2	50
Contrôle normal.....	—	Amostra A	5	5	100
B	i. c. e i. p.	Amostra A	4	0	0
B	i. c. e i. p.	Amostra B	4	0	0
B	i. c. e i. p.	Amostra C	4	1	25
Contrôle normal.....	—	Amostra B	6	6	100
C	i. c. e i. p.	Amostra A	4	0	0
C	i. c. e i. p.	Amostra B	4	0	0
C	i. c. e i. p.	Amostra C	4	0	0
Contrôle normal.....	—	Amostra C	6	6	100

Depois destas experiências prosseguimos nas passagens apenas com a amostra A e abandonamos as outras duas.

2) — *Infecção espontânea nos camundongos.*

A infecção é em geral reconhecida pelo aparecimento, em camundongos normais, de uma paralisia flácida que atinge principalmente os membros posteriores, apenas um ou mesmo os dois. Não se sabe ainda qual o coeficiente de mortalidade. A doença parece ser mais comum em animais jovens, com 5 a 7 semanas de idade. Como a infecção experimental tem um período de incubação grande, é de supor que no processo natural êste ainda venha a ser maior. E' pois possível que êstes animais se infetem com menos de 21 dias, tempo em que as barreiras naturais de defesa do sistema nervoso central ainda não estão completamente formadas, tornando-os mais suscetíveis. Êste fato

não explicaria, porém, a tão pequena incidência de mielencefalite; para nós, além da hipótese de o vírus alcançar o sistema nervoso central em animais em geral com menos de 21 dias, ainda deve haver várias outras condições predisponentes desconhecidas.

Os camundongos adultos, que em grande percentagem são portadores de vírus no intestino, não se tornam mais doentes porque têm as barreiras do sistema nervoso central completamente formadas, salvo se essas defesas forem rompidas e houver ainda outras causas coadjuvantes. A inoculação intracere-



Fig. 7 — Medula de camundongo com mielencefalite espontânea. Focos de mielite no corno anterior direito (assinalado pelo círculo branco) e no corno posterior esquerdo. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

bral de goma de amido, ou um simples traumatismo com a agulha, não é motivo suficiente para que os animais tenham encefalomyelite, do contrário seria quase impossível se trabalhar com camundongos quando se usasse nas experiências a via intracerebral.

Nos animais espontaneamente infetados e que apresentam paralisias, o vírus se encontra na medula em concentração maior do que no cérebro. O vírus tem sido com frequência isolado do conteúdo e também das paredes do tubo gastrintestinal, o que nós mesmo conseguimos; ele é evidenciado nos glânglios mesentéricos e nas fezes, porém não no sistema nervoso central, glândulas salivares e outros órgãos de camundongo normal, com idade com-

preendida entre quatro e oito semanas. O vírus não é encontrado, ou apenas de forma irregular, nos animais ainda no período de amamentação e nos velhos de mais de oito semanas. THEILER e GARD (34) verificaram que a excreção do vírus pode persistir até 53 dias depois do primeiro isolamento. O cérebro, a medula, o fígado, o pulmão e o baço foram negativos, porém o tubo gastrointestinal mostrou a presença de vírus no estômago, intestino grosso e delgado e no ceco (33). EKLUND e THEILER (6) demonstraram mais tarde que, fora o intestino delgado, a única parte onde o vírus pode ser demonstrado com regularidade é nos gânglios linfáticos mesentéricos. O conteúdo do intestino parece conter mais vírus que a parede intestinal e nesta, a maior quantidade se encontra na mucosa; há mais vírus na parte superior do intestino delgado que na inferior.

### 3) — *Sintomatologia da doença experimental.*

Camundongos que receberam 0,03 cc. de suspensão de vírus por via intracerebral, parecem perfeitamente normais por um período que varia de 5 a 30 dias, dependendo da concentração e da amostra de vírus usada. Em seguida, pode haver uma fase prodômica em que eles se mostram menos ativos, com sinais de fraqueza e certa dificuldade no andar. Outras vezes, e é o que se dá com mais freqüência, a paralisia surge sem êsses sintomas premonitórios. Um animal, que na véspera estava aparentemente normal, apresenta paralisia de uma ou das duas pernas traseiras, na imensa maioria das vezes; em casos esporádicos pode ser uma ou as duas pernas anteriores as que apresentam inicialmente sintomas de paralisia do tipo flácido, ou, raramente, de forma espástica.

A progressão da doença em certos casos é muito lenta; nesta forma crônica o camundongo apresenta os primeiros sintomas em um dos membros, sobrevivendo uma paralisia flácida e as pernas se encurvando para trás; quando as duas pernas traseiras são atingidas e há progressão da doença, o animal ao caminhar utiliza apenas os membros dianteiros, arrastando o ventre no chão, dobrando as duas pernas para trás. Processa-se uma atrofia e contrações dos membros atingidos; os ossos sofrem deformações, porém a cauda não fica paralisada. Nestes casos parece haver deformações dos ossos da bacia; os músculos da região paralisada se atrofiam muito, notando-se ademais incontinência de urina e mesmo espermatorréia. Essas formas crônicas podem progredir, havendo tetraplegia, ficando impossibilitada completamente a marcha, em seguida sobrevém caquexia e morte num prazo de 10 até 50 dias, a contar do início dos sintomas. Outras vezes a doença não progride além da paralisia localizada em uma ou em duas pernas e o animal aos poucos vai rehavendo novamente as forças, ficando apenas com as seqüelas.

Em outros casos a paralisia é transitória e o animal recupera praticamente o estado normal. Foi possível ainda observar uma forma aguda e outra superaguda. Na primeira, os animais apresentam inicialmente paralisia de ambos os membros posteriores e 24 a 48 horas depois está instalada a tetraplegia, morrendo o camundongo nas próximas 24 horas; o curso da doença é no máximo de 4 dias, sendo sempre fatal. Nos casos superagudos, ou os animais não apresentam qualquer sintoma e morrem 5 a 6 dias depois da inoculação intracerebral, ou há uma paralisia ascendente tipo Landry, com morte em 24 horas. Além da paralisia não há geralmente outros sinais.

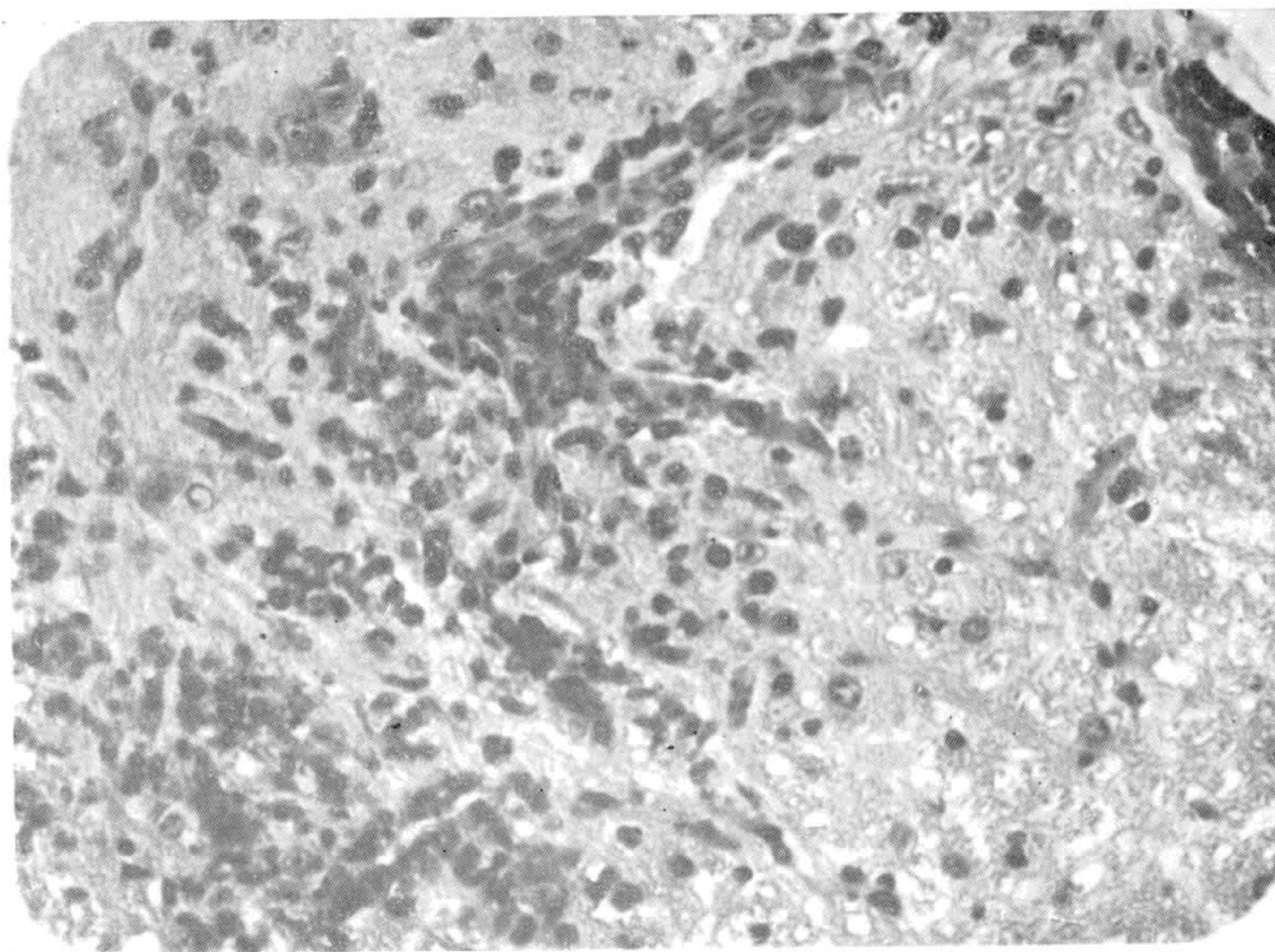


Fig. 8 — A mesma medula anterior, vendo-se um dos focos com maior aumento. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

Os animais jovens inoculados com menos de 21 dias, época normal do desmame, morrem freqüentemente sem evidenciar sintomas de infecção. Seja qual fôr a via utilizada para a inoculação experimental do vírus, desde que apareça a doença, o quadro clínico é semelhante. De modo geral pode haver variações no período de incubação, dependendo não só da via utilizada, mas principalmente da idade do animal e da amostra do vírus; como vimos ele é menor em camundongos de 21 dias.

Segundo DINGLE (4) a inoculação intracerebral de outros agentes resultou no isolamento de amostras mais virulentas do que as até então obtidas. Não foi porém possível estabelecer-se relação entre a amostra do vírus da

encefalomielite por êle isolada e os agentes inoculados (vírus da febre amarela e encefalite humana); a exacerbação de uma infecção latente parece ser a explicação mais plausível.

Fato importante a assinalar é a diversidade do quadro clínico, não só quanto ao tempo médio da incubação, como ao período médio da doença, quando se trata de amostras muito virulentas. Assim, THEILER e GARD (34) obtiveram duas amostras que, quando inoculadas por via intracerebral, apre-

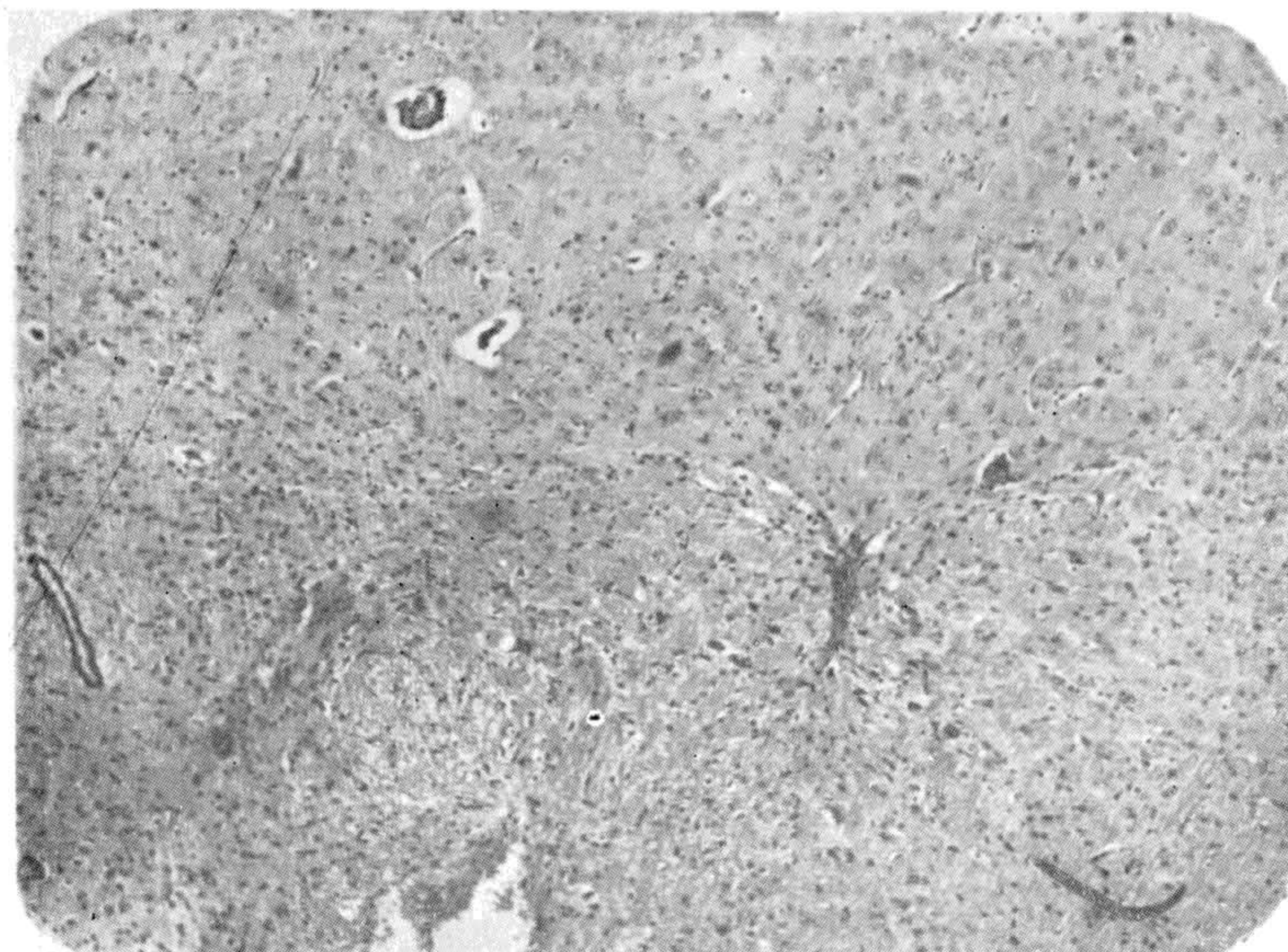


Fig. 9 — Cérebro de camundongo com mielencefalite por inoculação intracerebral. Zona de gliose com multiplicação dos núcleos neuróglícos nas proximidades do IV ventrículo.

Foto J. Pinto.

sentavam um curto período de incubação, de 2 a 6 dias, curso muito rápido da infecção, geralmente de 24 a 48 horas, coeficiente de mortalidade e título do vírus no cérebro mais elevado que com as demais amostras. Com a amostra GDVII, o primeiro sinal de infecção foi uma superirritabilidade mostrando que os sinais da doença estavam em relação com a medula. Com a amostra FA, os sinais de infecção que aparecem após inoculação intracerebral ou instilação nasal, assemelham-se mais aos de encefalite do que de mielite; os animais têm um aspecto de doentes, hiperexcitabilidade, eriçamento dos pêlos e convulsões tônicas que muitas vezes terminam com a morte; paralisia das pernas é rara, entretanto após a inoculação intraperitoneal uma paralisia flácida é comumente o sinal predominante.

## 4) — Caracteres físicos do material infetante

Pela sintomatologia da doença e passagens em série nos camundongos, de emulsão de cérebro infetado, pensamos logo tratar-se de uma infecção por vírus. Tentativas de cultura foram feitas, quer em meios aeróbios quer em anaeróbios, mas os resultados foram sempre negativos, seja com medula, seja com cérebro. Esfregaços corados pelo Gram nada revelaram. Estudamos então os principais caracteres dêste material:

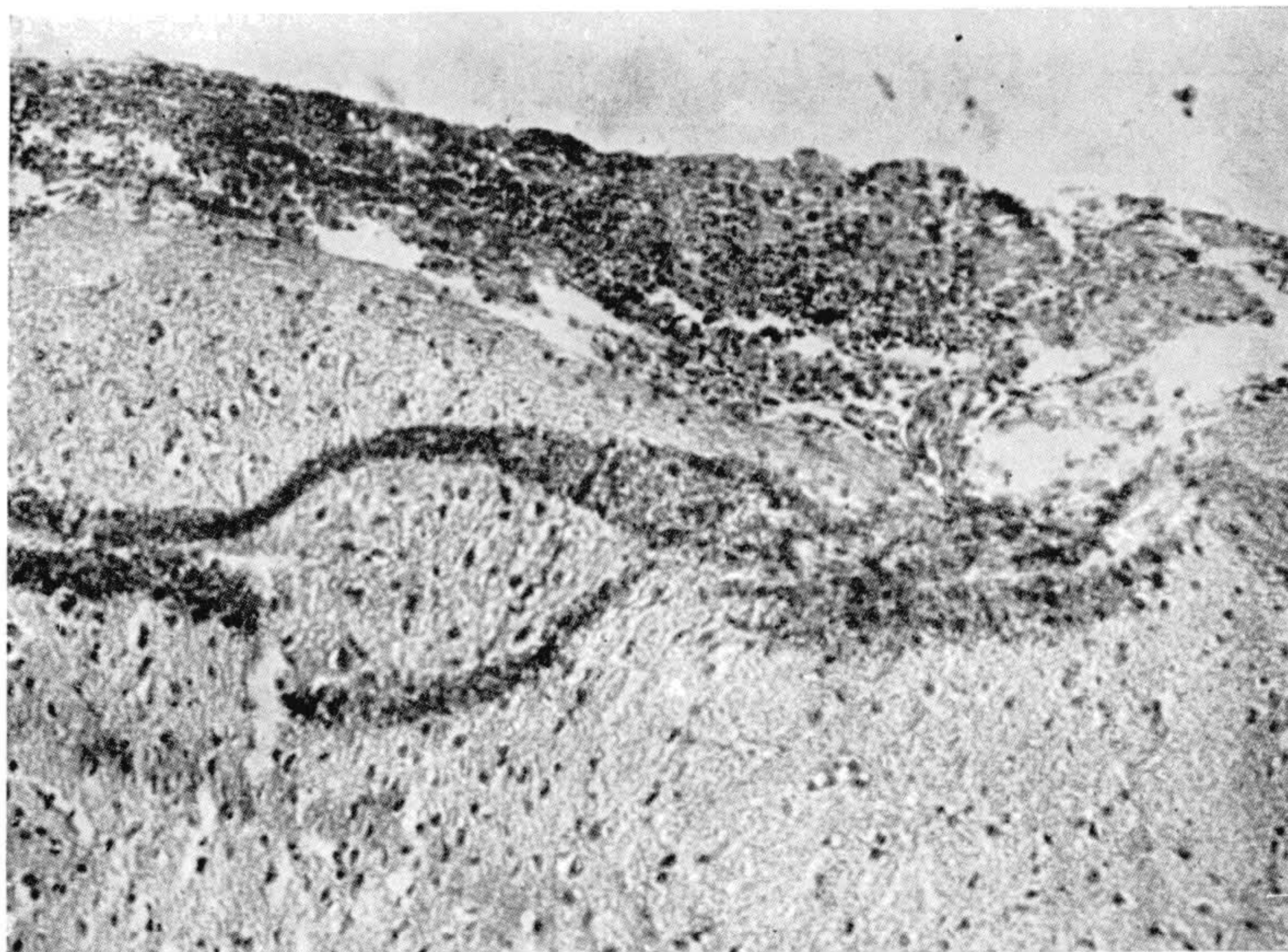


Fig. 10 — Cerebelo de camundongo com infecção experimental. Intensa inflamação da pia-máter, observando-se o acúmulo leucocitário e a hiperemia. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

a) Filtração: fizemos suspensões em água fisiológica com 10% de sôro normal de macaco, de cérebro e medulas infetadas. O material foi centrifugado alguns minutos, a fim de serem depositadas as partículas mais grosseiras, e foram feitas filtrações em velas Berkefeld, em Chamberland L3 e L5 e em filtro Seitz EK; o agente infetante atravessa-os com facilidade e conserva em geral a mesma atividade que tinha a emulsão antes da filtração.

Esta facilidade de o agente atravessar os filtros mesmo, por exemplo, Berkefeld W., sugere que o vírus é de tamanho pequeno, provavelmente com 35 m $\mu$ . ou menos. THEILER (32) conseguiu filtrar em Seitz e em todos os graus do filtro Berkefeld; o diâmetro médio das partículas determinado por filtração através de membrana de colódio foi de 13 a 15 m $\mu$ . sendo prática-

mente o mesmo da poliomielite humana. Posteriormente THEILER e GARD (34) calcularam entre 9 e 13 m $\mu$ .

b) Conservação: foi possível conservar o vírus em glicerina a 50% na geladeira, pelo menos durante dois meses, sem que fôsem notadas alterações na capacidade infetante do material. Este método é, pois, um bom meio para conservação do vírus. Aliás, THEILER (32) verificou que, nestas condições, o vírus pode ser guardado pelo menos por 150 dias e é mais estável em pH 8,0 ou pH 3,3.

c) Ação do calor: em 29-10-43 aquecemos a 56°C por 30 minutos, em banho-maria, uma suspensão a 10% de cérebro e medula infetados. O vírus foi totalmente inativado, pois a inoculação intracerebral de 0,03 cc. em um grupo de camundongos de 21 dias não mostrou qualquer sinal de infecção, ao passo que todos os controles morreram. Mesmo à temperatura ambiente o material perde a atividade em algumas horas; camundongos inoculados com suspensão de cérebro deixada por 24 horas no laboratório, sobreviveram todos.

#### 5) — Caracteres biológicos do vírus

##### a) Virulência para o camundongo.

Tratando-se de um vírus que camundongos aparentemente normais albergam em seu intestino, a virulência inicial não é muito grande. No entanto, com o decorrer das passagens do material por via intracerebral, observamos que há aumento gradual da virulência; contudo, o grau da infecção varia conforme a fonte infetante. Raramente foi possível observar camundongo doente após inoculação intracerebral de 0,03 cc. de material diluído a 10<sup>-5</sup>. Nas dosagens o título variou entre 4000 e 20000 DMM.

##### b) Vias de inoculação.

A via intracerebral é a melhor de todas e a única que provoca infecção com segurança. Fizemos uma experiência comparativa usando suspensão a 10% de cérebro e medula de camundongo paráltico, administrada por várias vias, em camundongos adultos com 36 dias e jovens de 21 dias. Todos os adultos inoculados por vias extraneurais receberam, cerca de 1 hora antes da inoculação de vírus, 0,03 cc. intracerebral de emulsão a 2% de goma de amido.

Por via intracerebral inoculamos 10 adultos e 12 de 21 dias, com 0,03 cc. Todos se infetaram, tendo morrido 20 durante o período de observação (quadro n.º 3).

Por via intraperitoneal, em 12 camundongos de 21 dias, adoeceram 7, morrendo 4; êles haviam recebido 0,20 cc. Onze adultos foram inoculados



com 0,40 cc. tendo adoecido 5 e morrido dois. Se observarmos êstes resultados em conjunto veremos que em 23 animais apenas 6 morreram ou seja 26%. IGUCHI (15) obteve 50% de infecção em camundongos que receberam vírus intraperitoneal e sofreram em seguida traumatismo cerebral por inoculação de caldo. THEILER e GARD (34) produziram infecção por inoculação intraperitoneal. Fato interessante é narrado por JUNGBLUT (16) que, trabalhando com uma amostra de vírus muito ativa, observou uma flutuação sazonal, principalmente após inoculação intraperitoneal.

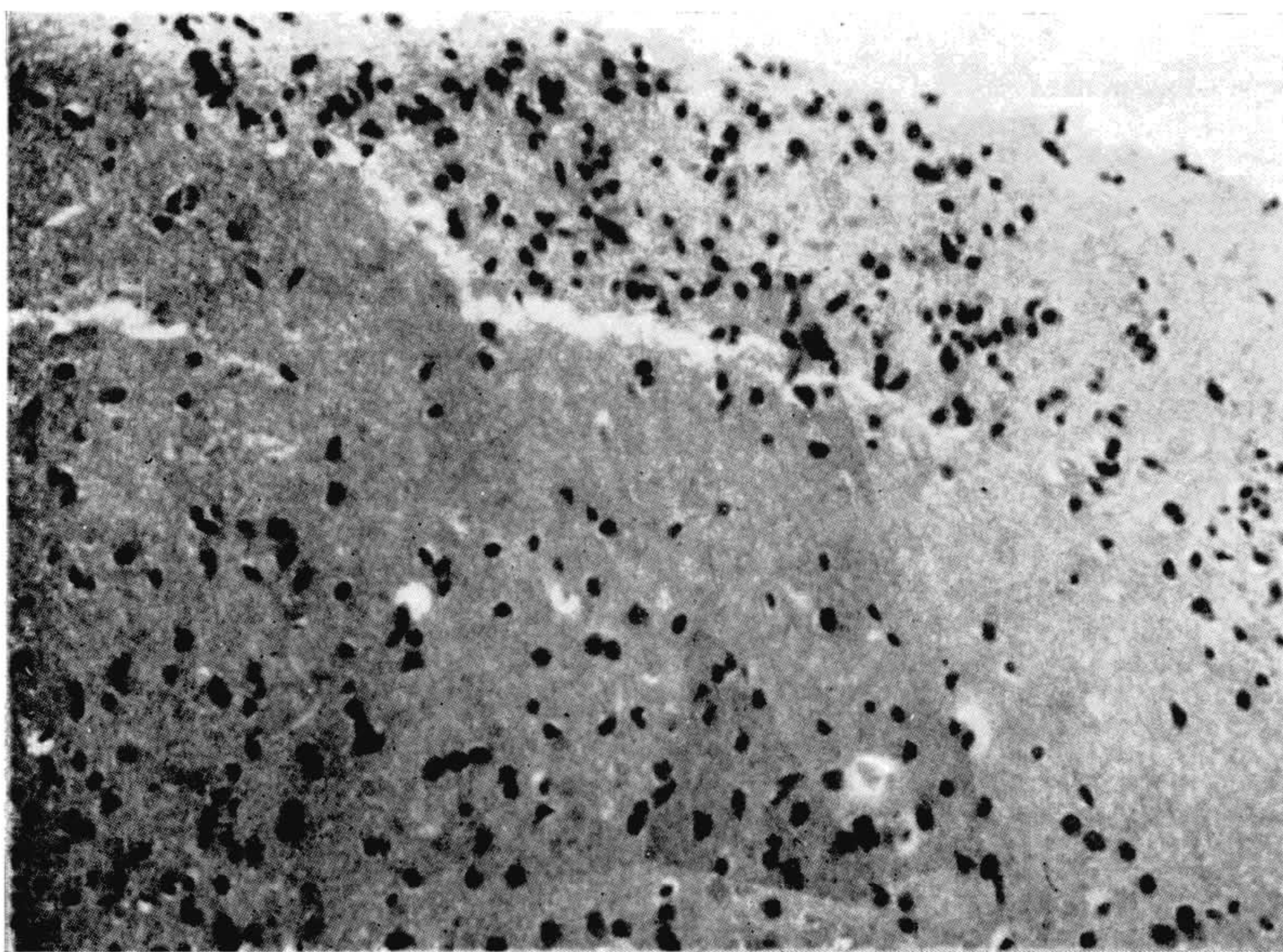


Fig. 11 — Cerebelo de camundongo com infecção experimental. Observa-se gliose da corteça cerebelar, ao nível da primeira camada ou camada molecular. Esta região corresponde às proximidades da pia-máter inflamada, cujo aspecto histológico está enquadrado em outra microfotografia. Hematoxilina-eosina.

Foto *J. Pinto*.

Por via nasal, instilamos 0,03 cc. da suspensão de vírus, fazendo leve escoriação com a agulha; esta é introduzida alguns milímetros dentro das narinas do animal anestesiado, injetando-se o líquido lentamente. Em 24 camundongos, 18 adoeceram (75%) e morreram 12 (50%). Provavelmente neste caso a inoculação intracerebral de goma de amido não tem influência. A infecção por instilação de vírus nas narinas se obtém com certa facilidade, pois esta via pode ser considerada como uma modalidade de inoculação neural e, se bem não esteja completamente elucidado o mecanismo de difusão do vírus, parece-nos que êle penetra diretamente pelo nervo olfativo ou pelos es-

paços linfáticos perineurais; outros caminhos podem no entanto ser tomados, como o nervo esfenopalatino ou o gânglio cervical superior.

Por fim, o vírus foi introduzido no estômago de camundongos anestesiados pelo éter, por meio de uma sonda de vidro ligada a uma seringa de tuberculina. Animais adultos receberam 0,30 cc. e os de 21 dias 0,20 cc. Os resultados foram todos negativos, não tendo os camundongos apresentado sintomas de infecção.

QUADRO N.º 3

RESULTADOS DA ADMINISTRAÇÃO DE VIRUS POR VIA INTRACEREBRAL, INTRAPERITONEAL, INSTILAÇÃO NASAL E VIA GÁSTRICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS E JOVENS

VIA DE INOCULAÇÃO	N.º DE CAMUNDONGOS	IDADE	QUANTIDADE DE VIRUS	GOMA I. C.	RESULTADOS				
					Doentes	%	Mortos	%	* P. M. I.
Intracerebral	12	21 dias	0,03 cc.	N	12	100	11	91,7	10,5
	10	adultos	0,03 cc.	N	10	100	9	90,0	12,5
Intraperitoneal	12	21 dias	0,20 cc.	N	7	58,3	4	33,3	16,0
	11	adultos	0,40 cc.	S	5	45,4	2	18,2	17,2
Instilação nasal	12	21 dias	0,03 cc.	N	9	75	7	58,3	15,9
	12	adultos	0,03 cc.	S	9	75	5	41,7	17,1
Gástrica	12	21 dias	0,20 cc.	N	0	0	0	0	0
	12	adultos	0,30 cc.	S	0	0	0	0	0

(\*) P. M. I.: período médio de incubação, em dias.

c) Influência da idade.

Nossas observações foram idênticas às de THEILER (32). Camundongos com idade variável de 1 a 7 dias morrem quase infalivelmente após a inoculação intracerebral e mesmo intraperitoneal do vírus. Eles morrem ainda dentro do período de amamentação e em geral não apresentam sinais de paralisia; nota-se porém que se alimentam mal, não estando a curva ponderal idêntica à dos filhos normais. Às vezes verifica-se paralisia dos membros posteriores, sobrevivendo a morte 24 a 48 horas depois. O tempo médio de sobrevivência depois da inoculação foi cerca de 9 dias. Em camundongos inoculados com 21 e 36 dias não se notam grandes diferenças quanto ao tempo médio de incubação e tempo médio de sobrevivência. Ambas variavam, decrescendo, ao mesmo tempo que o número de passagens aumentava (quadro n.º 1).

d) Persistência do vírus.

Camundongos que sobreviveram à inoculação de vírus, mas apresentaram paralisia dos membros posteriores, foram sacrificados em épocas diversas, retirado o cérebro e a medula, feitas suspensões a 10% em sôro fisiológico e inoculados grupos de 6 camundongos por via intracerebral.

Assim, animais foram mortos com éter 30, 60 e 90 dias após as inoculações. Retiramos separadamente o cérebro e a medula de um camundongo paralítico de ambas as pernas posteriores, que recebera vírus intracerebral, 30

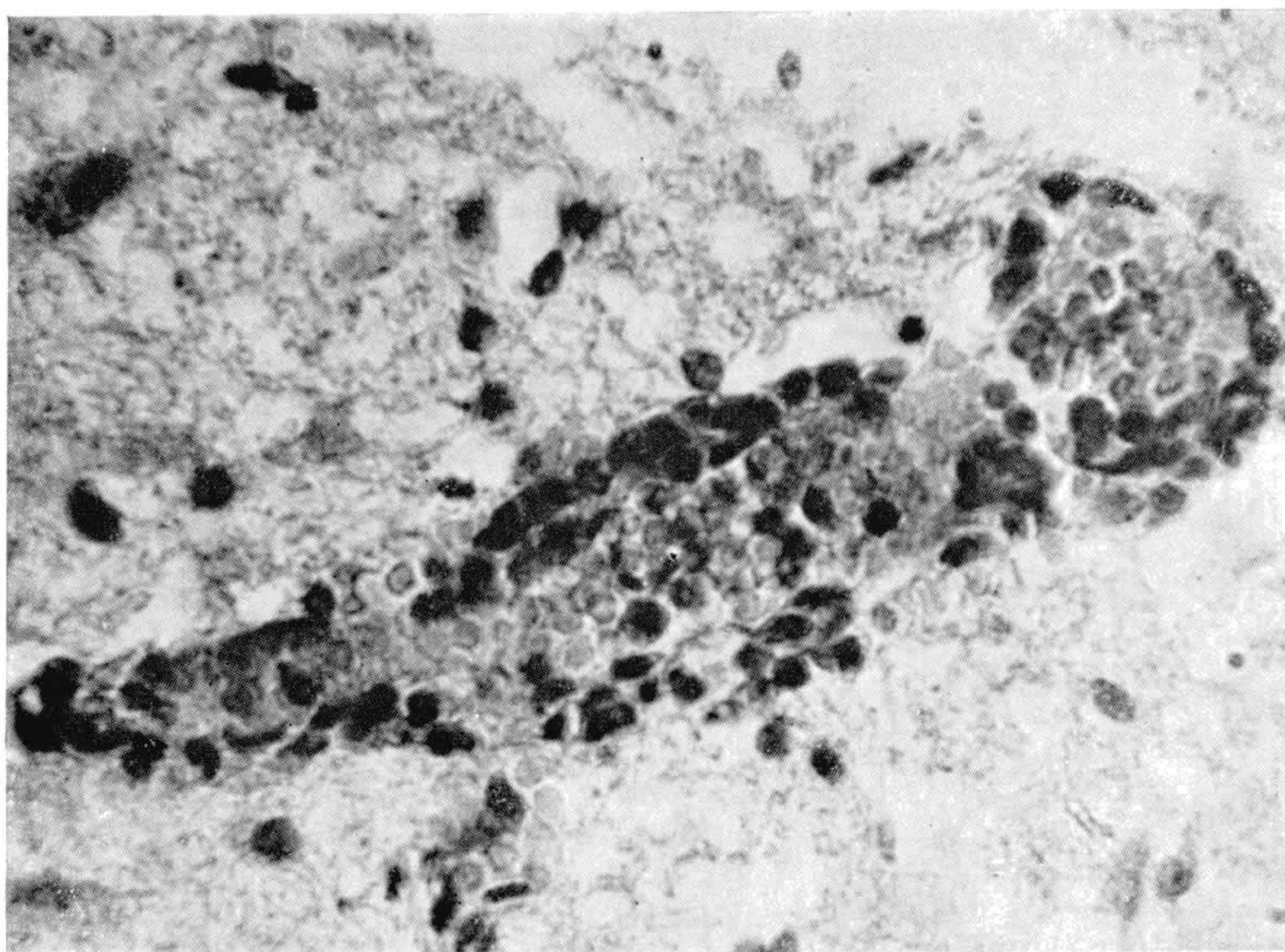


Fig. 22 — Infecção experimental em camundongo. Capilarite com hiperplasia endotelial registrada ao nível do metencéfalo.

Foto J. Pinto.

dias antes, e inoculamos com as suspensões feitas dois grupo de camundongos de 21 dias; dos 5 animais que receberam a suspensão de cérebro, 4 ficaram paralíticos, morrendo 2, e os 5 inoculados com medula mostraram paralisia do trem posterior, havendo duas mortes durante o período de observação.

O mesmo foi feito com outro animal paralítico, inoculado 60 dias antes. Em 5 camundongos que receberam suspensão de cérebro por via intracerebral, dois tornaram-se paralíticos e, em outros 5 inoculados com a medula, observamos 3 paralíticos, um dos quais morreu. Finalmente, retiramos o cérebro e medula de 3 camundongos inoculados a 90 dias. Como os resultados foram semelhantes damos-los em conjunto; a inoculação da suspensão de cérebro em 18 camundongos causou paralisia em 7, dentre os quais 2 morreram e a ino-

culação das medulas produziu paralisia em 9, tendo morrido 5 no prazo de observação.

Assim, pôde ser observado que tais camundongos albergam o vírus pelo menos 90 dias, quer no cérebro quer na medula. THEILER (32) já havia demonstrado que um ano após a inoculação ainda era possível o isolamento de vírus.

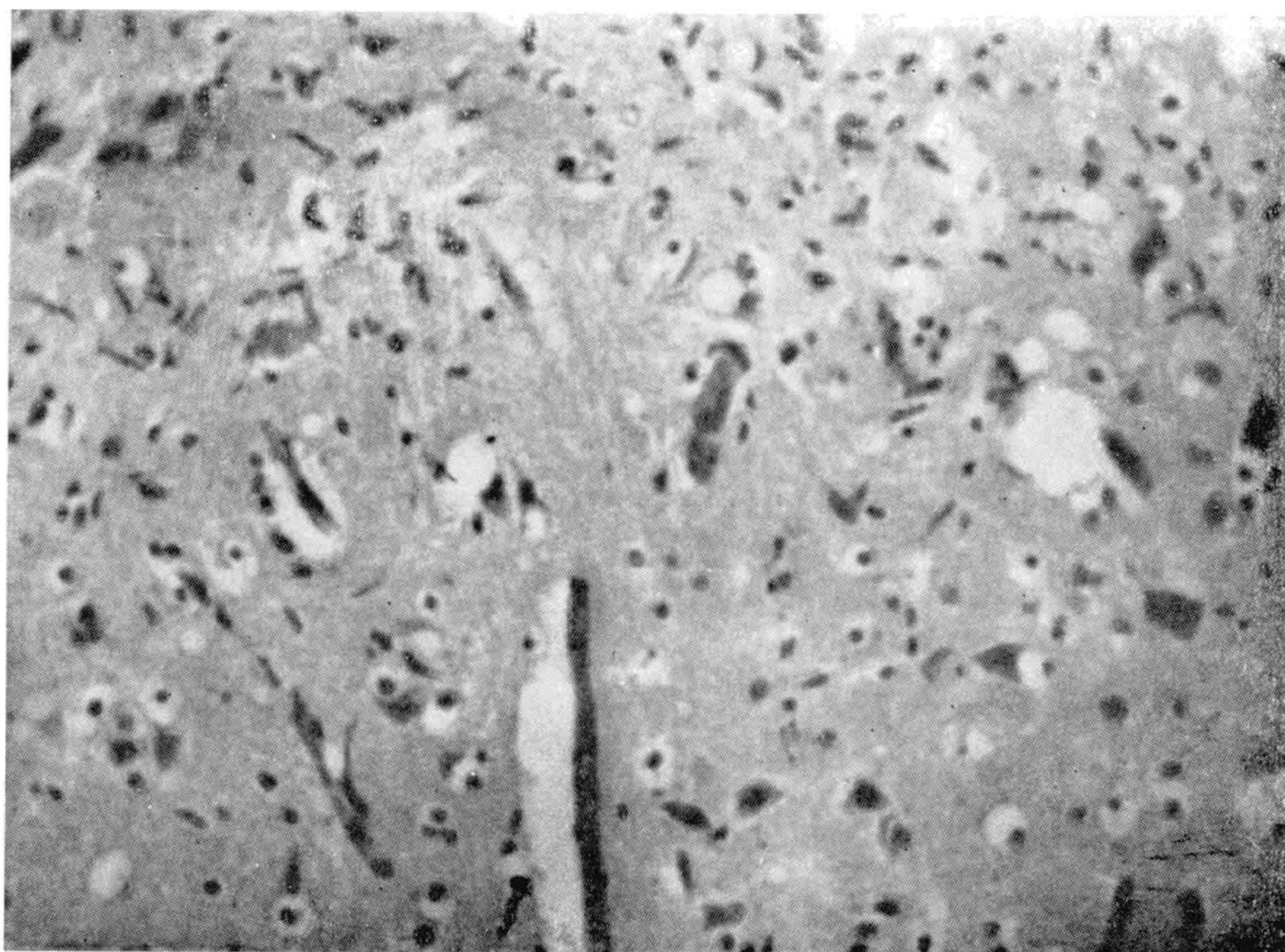


Fig. 13 — Região dos núcleos pontinus (Ponte de Varoli). Evidente proliferação da oligodendroglia. Edema perineuronal e perivascular. Desapareceram muitas células nervosas. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

Por outro lado, camundongos inoculados e que permaneceram aparentemente normais, quando sacrificados 30 dias depois da inoculação intracerebral, a suspensão de seu cérebro e medula inoculada em animais normais provocou infecção, mostrando a permanência do vírus. Parece que tais camundongos sem sintomatologia berrante tiveram uma infecção ligeira, clinicamente inaparente, mesmo porque quando reinoculados dificilmente se infetaram, mostrando terem adquirido certo grau de imunidade.

e) Distribuição do vírus.

No corpo de camundongos infetados por via intracerebral, encontra-se o vírus quase exclusivamente no sistema nervoso central. Não conseguimos evidenciá-lo no pulmão, fígado, baço e rim de três camundongos que morre-

ram na segunda semana pós-inoculação, com sintomas de encefalomielite; para evitarmos possíveis contaminações, retiramos primeiramente as vísceras e só depois é que foi removido o cérebro e a medula. Também o sangue obtido por punção cardíaca de dois camundongos, um no sétimo e outro no décimo quinto dia pós-inoculação e com paralisia, quando inoculado logo a seguir no cérebro de camundongos de 21 dias, não evidenciou vírus.

THEILER (32) verificou uma vez infecção no nervo ciático e também em alguns órgãos e IGUCHI (15) em um camundongo encontrou vírus nos gânglios linfáticos cervicais e no fígado. THEILER e GARD (35) mostraram que o vírus pode ser observado nas vísceras quando se usa uma amostra muito virulenta, sendo as discordâncias observadas justamente devido a diferenças de virulência entre as amostras usadas. Em geral os autores pensam que decorrido algum tempo a medula torna-se mais infetante que o cérebro; nós porém não conseguimos chegar a um resultado significativo.

#### f) Imunização dos camundongos.

Para o estudo da imunização ativa reinoculamos por via intracerebral animais que sobreviveram à inoculação inicial do vírus, com ou sem sintomas de infecção. Estas inoculações foram feitas 50 a 80 dias depois da primeira (quadro n.º 2). A grande maioria dos camundongos assim tratados permaneceu normal, demonstrando ter adquirido sólida imunidade.

Quanto à imunização de animais por via intraperitoneal e reinfecção feita por via intracerebral, já foi descrita por nós quando tratamos do isolamento e passagem em série do vírus. THEILER (32) não obteve imunidade por via intraperitoneal e apenas muito ligeira por instilação nasal; porém os camundongos paralíticos são imunes a uma subsequente inoculação intracerebral de vírus. Mais tarde, porém, THEILER e GARD (34) obtiveram uma imunidade a uma subsequente inoculação intracerebral, produzida pela administração de grande quantidade de vírus por via intraperitoneal e intranasal. Observamos ainda que, após uma infecção por inoculação de uma das amostras de vírus, os camundongos se mostram imunes quando reinoculados com qualquer das duas outras.

A presença de anticorpos neutralizantes foi pesquisada no soro de 10 camundongos inoculados por via intracerebral, que apresentaram forte infecção mas puderam sobreviver; êles foram reinoculados com 0,20 cc. por via intraperitoneal, 30 dias após a primeira inoculação. Os soros foram colhidos 30 a 60 dias depois desta inoculação, por punção cardíaca, procurando-se obter o máximo possível. Fizemos provas de proteção misturando duas partes do soro a uma parte de suspensão a 10% de cérebro de camundongo infetado; esta suspensão foi centrifugada previamente por 5 minutos. Os soros mistu-

rados com a suspensão de cérebro permaneceram neste contato durante uma hora na geladeira e em seguida inoculamos 0,03 cc. intracerebral em camundongos de 21 dias.

Como contrôles usamos soros de três camundongos normais, nos quais a idade correspondia mais ou menos à dos camundongos cujos soros estavam em prova. Tal fato tem real importância pois soros de camundongos velhos normais podem e costumam quase sempre apresentar maior capacidade neutralizante para o vírus da encefalomielite do que os de camundongos jovens. Assim, sangramos 10 camundongos imunizados, misturamos em um tubo de

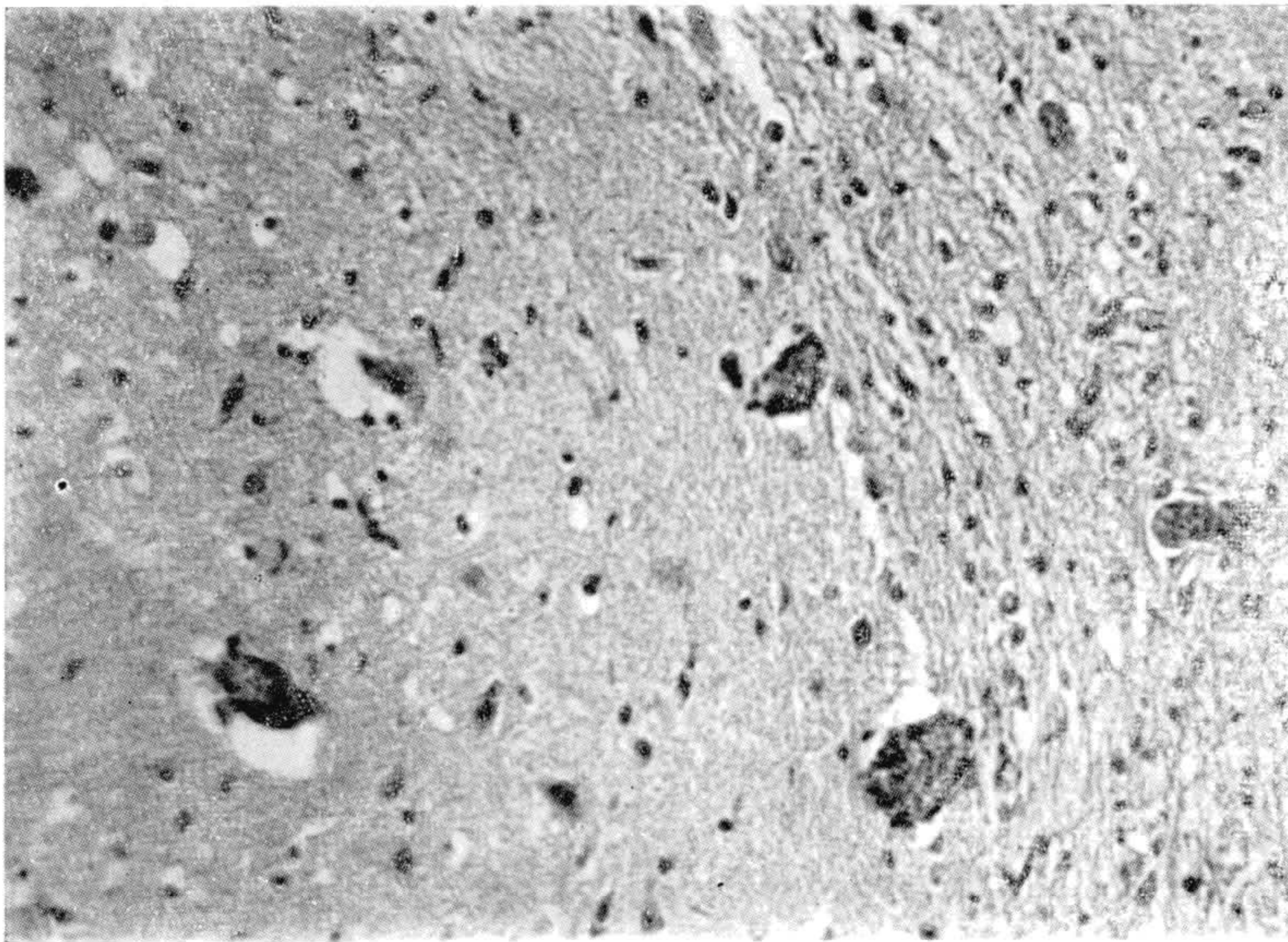


Fig. 14 — Protuberância. Hiperemia ou turgescência de pequenos vasos da protuberância anular, na zona de transição entre o pé e a calota.

Foto J. Pinto.

hemólise o soro (0,4 cc.) com o vírus (0,2 cc.), e inoculamos uma hora depois um grupo de 6 camundongos para cada soro. Dando o resultado em conjunto, verificamos que em 59 camundongos adoeceram 15, ou seja 25,4% e morreram 9, isto é, 15,2% durante os 30 dias de observação. Quanto aos controles, em 18 camundongos adoeceram 13, ou seja 72,2% e morreram 11, ou melhor, 61,1%. Ademais, o período médio de incubação dos camundongos que receberam soro imune e adoeceram foi maior que nos controles.

Não resta dúvida que há na verdade anticorpos neutralizantes no soro dos camundongos que sofreram infecção, pelo menos quando êle é colhido num período que poderíamos chamar de convalescença. Contudo o poder neutralizante do soro não nos parece ser muito grande.

g) Suscetibilidade de outros animais.

Em 17-11-43 sacrificamos com éter um camundongo moribundo com paralisia do trem posterior e correspondente à 12.<sup>a</sup> passagem; retiramos o cérebro e medula, sendo parte fixado em formol e com outra parte feita suspensão a 10% em soro fisiológico. Com este material inoculamos por via intracerebral: um macaco rhesus jovem com 0,50 cc., um coelho e uma cobaia, ambos também jovens, com 0,20 cc. Nenhum destes animais apresentou qualquer sintoma que pudesse ser imputado como devido ao vírus da mielencefalite, permanecendo, durante 60 dias de observação, perfeitamente normais.

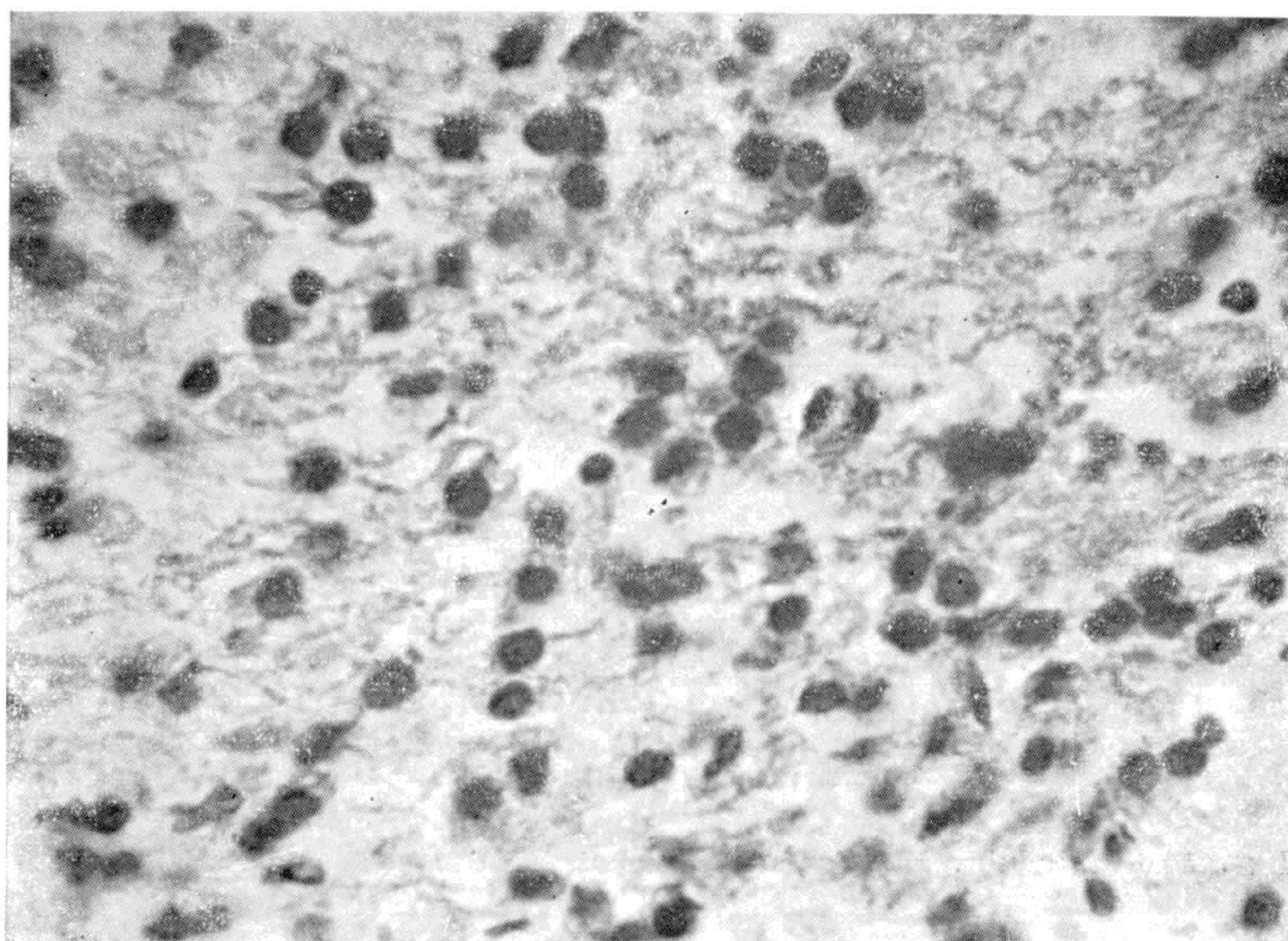


Fig. 15 — Protuberância. Área de proliferação neuróglia (esclerose ou gliose reacional) observada na calota protuberancial.

Foto J. Pinto.

Em 23-12-43, material oriundo de cérebro e medula de camundongos paralíticos da 14.<sup>a</sup> passagem, foi inoculado (0,05 cc.) no cérebro de 10 ratinhos brancos de criação, recém-desmamados. O resultado foi também negativo.

6) — *Incidência da doença*

Não foi feita ainda estatística minuciosa sobre a incidência da encefalomielite espontânea de camundongos, mas não resta dúvida que ela é sempre muito baixa. THEILER encontrou cerca de um doente para 2.000 camundongos suíços, comprados em diversos vendedores e OLITSKY (25) um a dois

por mil, o que parece uma incidência muito elevada, porém mais tarde não encontrou a infecção entre 5.000 camundongos examinados. Nós a observamos na proporção de cerca de 1 para 4.000.

A baixa incidência não indica falta de contato com o agente infetante pois o vírus foi demonstrado no intestino de grande número (66 a 100%) de camundongos com idade compreendida entre 1 a 2 meses. THEILER (33) não observou uma influência sazonal; procurando elucidar a epidemiologia da



Fig. 16 — Medula. Rarefação dos neurônios dos cornos ou pontas anteriores da substância cinzenta. Hematoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

doença ele fez uma série de experiências em que grupos de camundongos normais eram postos em contato com outros artificialmente infetados, porém sem resultado. Camundongos com infecção experimental do sistema nervoso central não são focos de infecção.

### 7) — Patologia

A base anatômica da paralisia foi descrita por THEILER (32) como uma necrose aguda das células nervosas do corno anterior da medula e também de alguns neurônios do cerebelo. Após esta necrose há neuronofagia; THEILER observou infiltração perivascular no cérebro e medula e não encontrou inclusões. IGUCHI (15) constatou infiltração celular perivascular, acúmulos de células gliais e degeneração das células nervosas. OLITSKY e SCHLESINGER



(27) verificaram que as lesões e sua distribuição no sistema nervoso central não têm diferenças nítidas, quando a doença é produzida após inoculações por diversas vias. Em geral, a parte anterior do cérebro mostrou predominantemente reação mesodermoglia, enquanto a posterior assim como a medula, apresentou nítida degeneração e destruição das células nervosas.

Nossos resultados são semelhantes aos descritos por êsses pesquisadores. Estudamos outrossim as lesões encontradas no cérebro e medula de camundongo espontaneamente infetado e também em alguns que morreram com

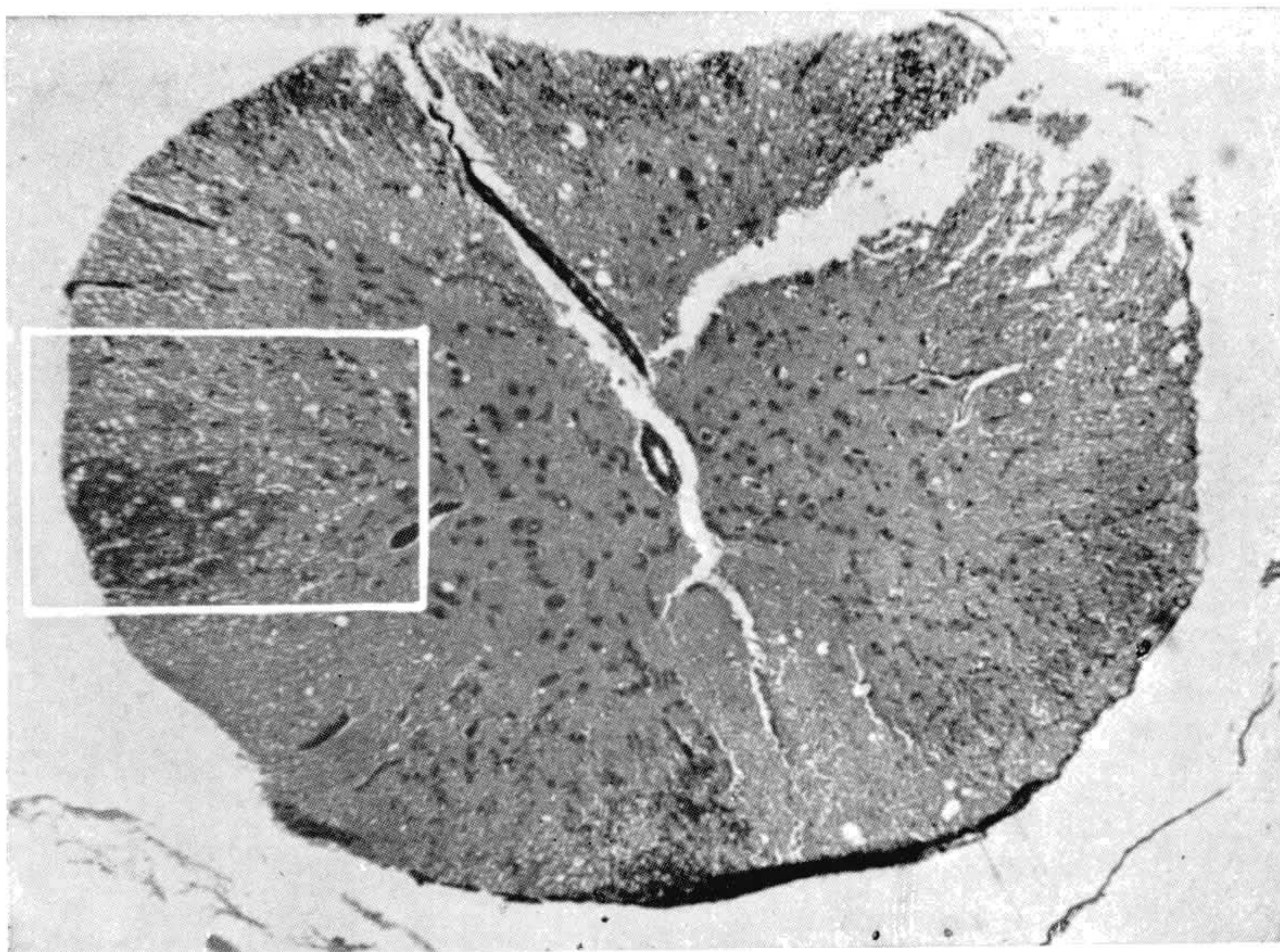


Fig. 17 — Medula de camundongo com infecção experimental. Nota-se nesta microfotografia a esclerose neuróglia cicatricial (degeneração fascicular) na periferia do cordão lateral assinalada pelo quadrado branco. No cordão posterior, em situação marginal, há pequena zona de esclerose do mesmo tipo.

Foto *J. Pinto*.

a forma aguda da infecção, após terem recebido vírus por via intracerebral. No primeiro caso, isto é, na infecção espontânea, observaram-se no tronco cerebral, em plena substância branca, numerosos focos de perivascularite; essas perivascularites eram constituídas por enorme acúmulo de leucócitos, dentro dos espaços de Virchow-Robin, na maior parte mononucleares, mostrando-se os vasos túrgidos de sangue. Eram vistos, em plena substância branca, rastilhos inflamatórios que, parece, acompanhavam o trajeto das fibras nervosas. Nódulos leucocitários foram encontrados nas vizinhanças do canal ependimário. Em plena região do hipocampo (rinencéfalo) vimos focos inflamatórios um tanto disseminados, destruindo a mais característica camada ce-

lular desta região. Nas zonas mais superficiais, especialmente na primeira camada, também chamada molecular, o processo assumiu o feitiço de encefalite hemorrágica, com aspecto semelhante ao observado na encefalite hemorrágica humana da influenza. Verificamos alterações graves em uns pontos e leves em outros, dos neurônios corticais, dos núcleos da base, do tronco cerebral e a presença de produtos degenerativos e eosinófilos intracelulares nessas regiões.

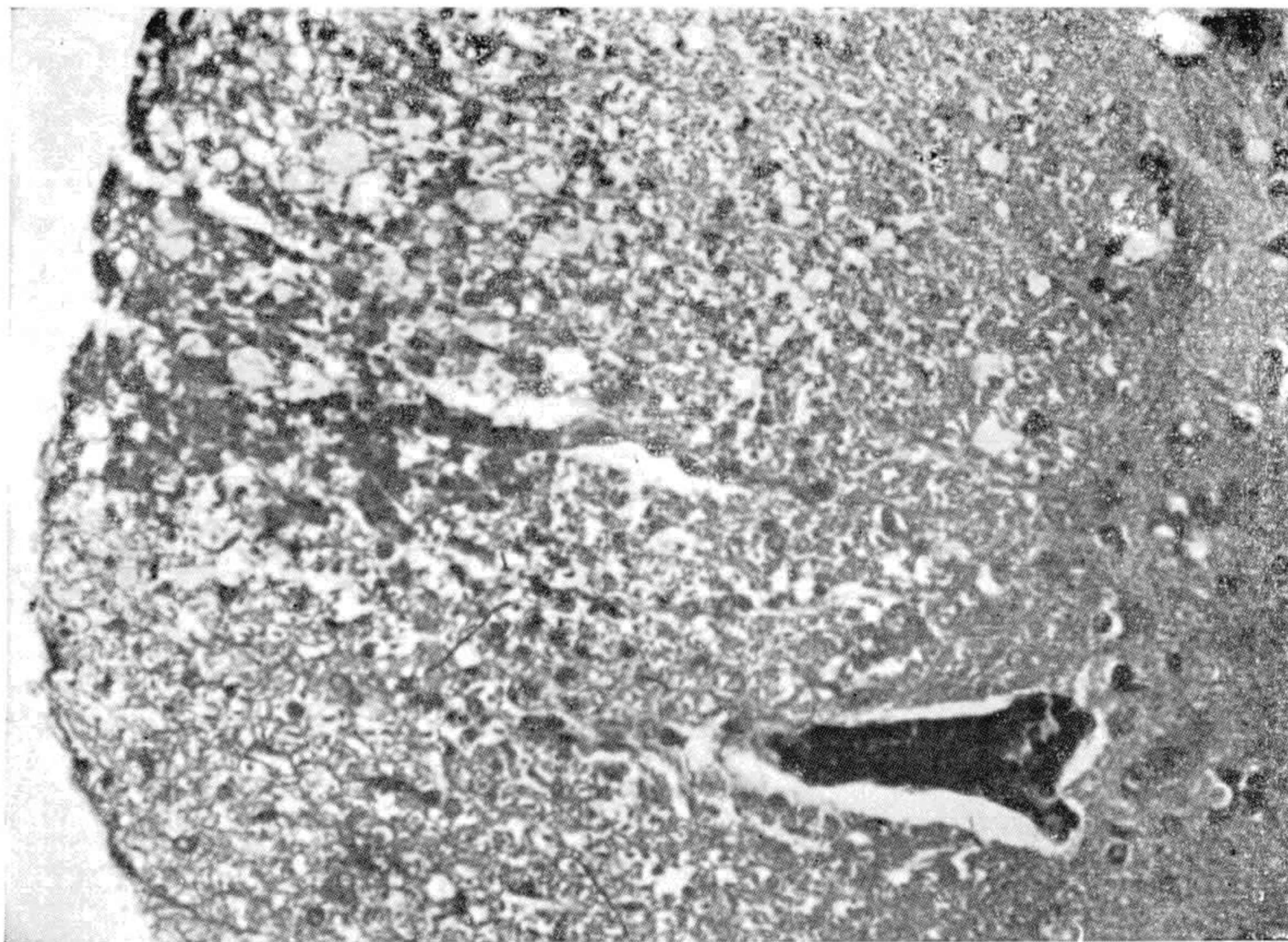


Fig. 18 — Detalhe da microfotografia anterior observado com grande aumento. Pode-se ver bem a cicatriz gliosa, os vacúolos deixados pelos tubos miélnicos desaparecidos ou degenerados e a capilarite e esclerose dos pequenos vasos. Hemotoxilina-eosina.

Foto J. Pinto.

O cerebelo não apresentou quase lesões; apenas registramos leves sinais de inflamação na substância branca, constituídos por afluxo leucocitário em pleno tecido nervoso e na periferia de alguns vasos. A estrutura das células e a disposição citoarquitetônica mostraram-se praticamente normais.

Quanto à medula, o corno anterior direito era a sede de um processo intenso de poliomielite, acompanhada de atrofia. A inflamação atingiu a quase totalidade dessa formação. Em certos cortes é evidente que o corno é muito menor que o do lado oposto e nêle as células nervosas estão reduzidas a restos. Verifica-se também que, vindo da linha mediana, penetravam neste corno vasos com acentuada infiltração leucocitária. Os sinais inflamatórios aumentavam à medida que os vasos penetravam na substância cinzenta. Este

fato sugere que o processo inflamatório teve origem hematógena. No outro corno anterior, com sinais mínimos de inflamação, as células nervosas mostravam boa estrutura e eram abundantes. Os cornos posteriores também apresentaram infiltração leucocitária, porém muito leve. É evidente que muitos neurônios continham produtos degenerativos com afinidade para a eosina. Não foram encontradas inclusões.

No exame do sistema nervoso central de um animal que teve infecção aguda depois da inoculação intracerebral de vírus, observaram-se no cérebro as mesmas alterações já por nós descritas e, ainda mais, um grande foco inflamatório e hemorrágico nas proximidades do ventrículo cerebral. Verificou-se infiltração difusa nas proximidades dos vasos que penetraram na circunvolução do hipocampo. Alguns capilares que atravessam a substância cinzenta cortical estão com forte perivascularite. Os capilares da região do núcleo da base estão túrgidos de sangue. Foi notada neste camundongo a quase integridade da medula, onde existiam apenas lesões discretas. Neste caso houve uma evolução aguda da doença e os processos inflamatórios se estabeleceram tão rapidamente que não deu tempo para lesões medulares grandes se instalarem.

Em outro animal que apresentava tetraplegia e proveniente da 12.<sup>a</sup> passagem, observamos, além das lesões já descritas, as seguintes alterações histopatológicas: no cerebelo vêem-se zonas de hiperemia e infiltração leucocitária da pia-máter. As camadas celulares da cortiça cerebelar estão sensivelmente conservadas. Nenhuma alteração evidente das células de Purkinje nem dos granulócitos. Em plena substância branca podemos ver muitos vasos de pequeno calibre túrgidos de sangue e cercados por manguito inflamatório. Nos cortes que seccionam transversalmente êsses vasos pode-se observar a localização dos linfócitos no espaço perivascular. De modo geral os vasos da substância branca apresentam-se congestos. Em alguns pontos da substância branca cerebelar vemos os núcleos de neuroglia proliferada formando agrupamentos (grupos isogênicos de CAJAL).

Nos cortes que atingem a protuberância pode-se observar na região do quarto ventrículo extenso rastilho inflamatório no meio do qual aparecem capilares dilatados por acúmulo de sangue.

Quanto à medula, no corno anterior as células motoras estão nitidamente atrofiadas com graves sinais de degeneração. Em muitos pontos faltam mesmo numerosos neurônios. Em alguns cortes podem ver-se capilares repletos de sangue e com sinais de pericapilarite. Os fenômenos de capilarite são mais evidentes na parte lateral do corno anterior. Em certas regiões, ao nível do corno anterior, observamos nódulos inflamatórios com abundância de núcleos alongados, pequeninos, precisamente na zona de transição entre a substância

cinzenta e a branca. Essas células de núcleos pequeninos e alongados são certamente elementos microgliais e assinalam pontos do tecido em desintegração nervosa (zonas de fagocitose).

Por fim, ainda foram constatadas as seguintes lesões em outro camundongo oriundo da 15.<sup>a</sup> passagem. Na profundidade da massa cerebral, próximo ao ventrículo lateral foram vistas zonas de infiltração linfocitária de formato coronal. No cerebelo vêem-se zonas de hiperemia principalmente na substância branca. Observamos no cordão lateral da medula uma zona de esclerose neuróglia em que as fibras mielínicas foram despojadas de sua bainha de lipóides (degeneração com esclerose fascicular). Nas proximidades dêste feixe degenerado, porém dentro da substância cinzenta, pode ver-se um capilar cujo endotélio está entumecido e proliferado (capilarite). Na zona de transição entre a substância cinzenta e a branca, adiante do corno anterior de um dos lados, observa-se intensa capilarite com infiltrado perivascular.

Outros exames do sistema nervoso central não mostraram diferenças com as lesões já descritas.

#### DISCUSSÃO

A encefalomielite dos camundongos tem sido atualmente motivo de acurados estudos. Parece não haver dúvida que a moléstia infecciosa encontrada por nós em animais de criação e causada por um vírus filtrável é idêntica à que foi descrita por THEILER. Recentemente YOUNG e CUMBERLAND (36) isolaram do intestino de camundongos normais um agente filtrável, que pensam ser o vírus da encefalomielite; verificaram que o quadro clínico produzido por inoculação intracerebral dêste vírus é em muitos casos distinto do produzido pela amostra Lansing da poliomielite, não sendo evidenciada relação imunológica entre os dois vírus. Também MELNICK (22) isolou do intestino de ratos (*Dipodomys merriami*) normais, um vírus que, por meio de testes de imunidade cruzada e de reação de fixação de complemento, mostrou-se imunologicamente idêntico ao de THEILER.

O problema magno é o estudo das relações entre o vírus da encefalomielite dos camundongos e da poliomielite humana. A princípio THEILER (32), após uma série de pesquisas, concluiu que provavelmente não havia qualquer relação entre os dois agentes. Esta opinião foi confirmada por OLITSKY (23), que verificou não ser o vírus de THEILER inativado pelo soro antipoliomielítico, assim como o soro de camundongo com encefalomielite não neutralizou o vírus da poliomielite.

Aos poucos se foi verificando a semelhança em muitos caracteres entre a doença de THEILER e a de HEINE-MEDIN. IGUCHI (15) foi o primeiro que disse serem os sintomas, o curso da doença, as modificações patológicas do

cérebro e da medula dos camundongos e sua localização muito semelhantes aos da infecção humana; denominou mesmo a enfermidade, de poliemielite dos camundongos (14). Em ambas as infecções observa-se paralisia flácida das extremidades e rápida atrofia muscular seguida de contraturas e deformidades. A inflamação do corno anterior, seguida de atrofia dessa região medular, muita semelhança tem com a doença de HEINE-MEDIN.

Por outro lado, quando se estudam as doenças do ponto de vista epidemiológico, o interesse torna-se maior. A distribuição geográfica é em ambas ubiqüitária; a encefalomielite já foi assinalada na Alemanha por GILDEMEISTER e ÄHLFELD (13), no Japão por IGUCHI (14), na Palestina por KLINGER (18) e agora no Brasil por nós, sendo esta a primeira verificação feita na América do Sul. Aos poucos foram surgindo novas semelhanças clínicas e epidemiológicas; assim, em ambas os jovens são atacados de preferência e a resistência à infecção aumenta com a idade. Tanto na encefalite dos camundongos como na poliomielite humana, a infecção por contato não parece provável.

É interessante o fato de a presença de vírus ser muito freqüente no intestino dos camundongos, sendo excretado pelas fezes durante longo período; o mesmo fato tem-se assinalado no homem.

O estudo comparativo entre as duas doenças tornou-se mais fácil depois que Armstrong (1) conseguiu infetar certos ratos (*Sigmodon hispidus hispidus*) e em seguida camundongos (2) com uma amostra de vírus da poliomielite humana. Esta produz uma polioencefalomielite (19 e 20) e as duas doenças no camundongo são clinicamente indistinguíveis.

Theiler (33) reviu cuidadosamente as relações entre os dois vírus e observou que o da encefalomielite não é patogênico para o macaco, o qual não se torna imune para a poliomielite; não havia, ou era muito ligeira, a neutralização do vírus de Theiler pelo sôro de macaco imune para a poliomielite, ou pelo sôro de rato ou macaco imunizado com a amostra Lansing; ademais, o sôro de camundongo imune para encefalomielite e que contém anti-corpos, não neutraliza o vírus de Lansing. Não há imunidade cruzada. Em oposição a êstes resultados negativos êle demonstrou que as amostras mais virulentas de encefalomielite produzem uma doença com paralisia em certos ratos, que é praticamente indistinguível da causada pela amostra Lansing da poliomielite. Os ratos e camundongos que ficam paráliticos, mas sobrevivem à inoculação intracerebral do vírus de camundongo, são resistentes à poliomielite, porém esta resistência não parece ser específica, porque depende da presença de paralisias. Além disso, as passagens sucessivas da amostra Lansing em camundongos produzem uma amostra de vírus que é patogênica para o camundongo, levemente patogênica para o rato e não patogênica para o macaco,

assemelhando-se agora êste vírus atenuado da poliomielite humana ao da encefalomyelite de Theiler. A mesma espécie de ratos que foi usada para poliomielite, mostrou-se suscetível ao vírus de Theiler e os animais sobreviventes a esta inoculação feita por via intracerebral, resistem à inoculação com a amostra Lansing.

JUNGBLUT (16) conseguiu também infectar ratos (*Sigmodon hispidus*) com o vírus de THEILER, fazendo muitas passagens, tendo verificado que o vírus se torna fixo para êste novo hospedador e adquire outras propriedades biológicas, sendo possível então infectar cobaias e macacos rhesus. Ele pensa que tanto o vírus da poliomielite humana, como o da encefalomyelite dos camundongos, originam-se de um tronco primitivo comum de vírus. Propõe o termo de "grupo poliomiélico" para designar as amostras humana e dos roedores. Já anteriormente JUNGBLUT, SANDERS e FEINER (17) assinalaram relações sorológicas entre o vírus murino SK da poliomielite e o vírus de THEILER devido à capacidade do soro antimurino e do soro antipoliomiélico de cavalo neutralizar o vírus da encefalomyelite espontânea. Verificaram também que a infecção prévia com o vírus de THEILER deixa os sobreviventes com uma relativa ou absoluta resistência à reinfecção com o mesmo vírus, mas não com outras amostras de vírus da poliomielite.

Assim como na poliomielite humana, se bem que ainda não se possa dizer com precisão qual a via de penetração do vírus, tudo leva a crer que ela se dê não só por via nasal como, e principalmente, por via gastrintestinal.

O vírus é encontrado com freqüência nas fezes e nas paredes do intestino de camundongos sadios, mas o mecanismo pelo qual êle consegue atingir o sistema nervoso é ainda obscuro. A presença aí do vírus mostra apenas que o tubo digestivo é um local de proliferação, mas não que seja obrigatoriamente uma porta de entrada. É possível que traumatismos ou outros processos lesivos da mucosa gastrintestinal de camundongos jovens facilitem a disseminação do vírus, que alcança o sistema nervoso através, por exemplo, dos nervos simpáticos. THEILER (33) não conseguiu demonstrar a presença de vírus na mucosa nasal; êle pensa que a infecção do SNC não seja devido a uma menor ou maior virulência, mas a um acidente ocorrido cedo na infecção do intestino delgado.

Apesar de se ter nestes últimos anos indicado a via nasal como a mais comum para penetração do vírus da poliomielite no homem, na verdade não houve uma prova concludente desta afirmativa. Estudos de SABIN (30) feitos em 13 casos de poliomielite humana não mostraram as alterações patológicas que foram observadas no bulbo olfativo de macacos que morreram após instilação nasal do vírus; além disso, não se conseguiu isolar vírus do bulbo olfativo de 5 casos humanos nos quais êle foi isolado de outros tecidos, o que se

torna uma séria evidência contra a teoria de que a via olfativa é a porta de entrada comum. Na verdade até o momento não há uma prova conclusiva pró ou contra uma determinada via de acesso, seja a respiratória, seja a digestiva. tanto para a poliomielite humana como para a encefalomyelite dos camundongos.

Se bem que os bulbos olfativos sejam suscetíveis ao vírus, não nos parece ser esta a via mais freqüente de penetração. Na poliomielite o faringe é, fora do sistema nervoso, um dos principais locais onde o vírus pode ser encontrado; se bem que na encefalomyelite o vírus já tenha sido evidenciado no faringe, não é entretanto tão constante a sua presença como no intestino.

THEILER e GARD (35) pensam que a produção de anticorpos devido à infecção do intestino possa ser responsável pelo aumento de resistência que se verifica nos camundongos velhos. Assim, também a poliomielite humana é uma doença tão mais freqüente entre as pessoas jovens que se denomina mesmo de paralisia infantil. Este aumento de resistência pode ser devido a uma prévia infecção inaparente, capaz de produzir imunidade ou então a um completo desenvolvimento das barreiras fisiológicas, as quais servem para deter uma progressão centripeta do vírus de um ponto periférico.

Na doença de THEILER o mecanismo protetor contra o vírus, o aumento de resistência com a idade, deve ser sempre uma forma específica de imunidade latente que é adquirida por contato prévio com o vírus. Como desde muito jovens já os camundongos podem ser portadores de vírus no intestino, deve se produzir aos poucos uma imunidade que é suficientemente forte para proteger camundongos velhos, permitindo porém que os animais jovens ainda sejam de uma maneira mais ou menos uniforme suscetíveis à infecção. Este mecanismo protetor local é também averiguado pela incapacidade de se produzir infecção por administração de vírus por via gástrica mesmo em animais recém-desmamados. Se bem que camundongos velhos possam ser infetados particularmente com amostras muito virulentas, são necessárias doses maciças de vírus diretamente no sistema nervoso central.

O vírus poderia invadir o corpo partindo do intestino, pelos vasos linfáticos, indo aos gânglios mesentéricos; THEILER (33) pensa que tal fato mostra, pelo menos durante um período de infecção, que o vírus é capaz de invadir o organismo animal e provavelmente agir como um antígeno para a produção de anticorpos.

Os processos de penetração do vírus e certas propriedades devem ser semelhantes ainda às observadas na poliomielite humana. Nesta já se averiguou que o vírus penetra ao longo das fibras nervosas para o sistema nervoso central e que o cilindro-eixo e não as bainhas ou "os espaços linfáticos perineurais" jogam o maior papel neste processo de disseminação. Experiências

de HOWE e BODIAN (13) com o vírus da poliomielite mostraram que ele não é apenas neurotrópico, isto é, possuidor de uma predileção para os tecidos nervosos, mas altamente neurocitotrópico ou neuronotrópico, tendo afinidades seletivas para o próprio neurônio. O principal papel na disseminação do vírus é jogado pela via neurônica e uma vez alcançado o sistema nervoso central a progressão se dá do ponto de entrada para as regiões suscetíveis, especialmente os centros motores do metencéfalo e da medula, onde se vêem os maiores efeitos da reação entre o vírus e o hospedador.

A relação entre a gravidade das alterações histológicas e a concentração do vírus não é estritamente proporcional, mas geralmente há uma correspondência entre a distribuição de lesões no sistema nervoso e a distribuição do vírus, o que permite uma boa análise das vias de disseminação por meio de pesquisas histológicas. Na progressão de centro a centro o vírus parece preferir as cadeias curtas de neurônios como sendo melhor via do que o sistema de fibras nervosas longas.

A semelhança dos processos histopatológicos, verificada na medula e no cérebro de nossos camundongos, com a poliomielite humana é muito grande. A denominação de poliomielencefalite murina nos parece a mais precisa. Diferenças nas distribuições de lesões dependem da porta de entrada, se bem que o quadro patológico no final da maioria dos casos seja idêntico.

HOWE e BODIAN (13) em estudos feitos em macacos com o vírus da poliomielite, mostraram que a suscetibilidade de várias partes do sistema nervoso é geralmente independente da porta de entrada. A disseminação do vírus no cérebro, mesmo em casos fulminantes foi limitada pela resistência de certos centros como a córtex estriada e o corpo geniculado lateral e também pela inacessibilidade de dados centros, os quais não são necessariamente imunes mas geralmente não são atingidos por concentrações efetivas de vírus.

Os vírus isolados por nós do cérebro e medula de dois camundongos paralíticos e dos intestinos e fezes de camundongos normais, mostraram nos testes de imunidade cruzada serem idênticos. Ademais, produzem uma encefalomyelite em tudo semelhante à descrita por THEILER. Assim, fora da inoculação intracerebral em animais adultos, apenas a via nasal produz uma infecção regular, sendo que a via intraperitoneal dá resultados variados e inconstantes. As lesões histopatológicas são semelhantes; a inoculação em coelho, coelho, macaco e em rato branco de laboratório, não produz infecção. As leves dissemelhanças existentes podem ser explicadas por diversidade nas amostras de vírus.

O quadro clínico e a marcha da infecção produzida por inoculação intracerebral do vírus da encefalomyelite permite diferenciá-lo de outros microrganismos capazes de produzir processos de encefalite, como o causador da



encefalomielite eqüínea e da coriomeningite linfocítica; êle se distingue também do vírus da meningopneumonite aguda (8) não só por que êste é muito maior mas também pelas diferenças dos processos patológicos em camundongos, assim como sua patogenicidade para o macaco.

#### SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1) — Duas amostras de vírus capazes de produzir uma mielencefalite foram isoladas de dois camundongos brancos suíços, de criação, espontaneamente infectados, em um total de 7.000 animais examinados; uma terceira amostra foi obtida por trituração e filtração dos intestinos de camundongos aparentemente normais.

2) — Foram feitas separadamente dez passagens por inoculação intracerebral em camundongos jovens e adultos. Verificou-se por testes de imunidade cruzada que as três amostras eram idênticas. Prosseguiu-se então nas passagens com apenas uma das amostras.

3) — O poder infectante aumenta com o número de passagens: o período médio de incubação diminui e aumenta a letalidade.

4) — A infecção espontânea e experimental é descrita. A doença parece ser mais comum em animais jovens. O período de incubação varia de 5 a 30 dias. Às vêzes observa-se uma fase prodrômica: fraqueza, menor atividade, dificuldade em andar; geralmente surge a paralisia flácida sem sintomas prévios, na grande maioria das vêzes, nos membros posteriores. Três formas clínicas foram observadas: super-aguda, aguda e crônica.

5) — Em camundongos normais o vírus pode ser demonstrado nas fezes e nos intestinos. Êle é comum no tubo digestivo e só ocasionalmente invade o sistema nervoso central, ou melhor, a encefalomielite é primariamente uma doença do trato digestivo no qual a invasão do SNC é um acidente.

6) — O vírus passa através de velas de CHAMBERLAND L3 e L5, em BERKEFED V, N e W e em filtro Seitz EK, a suspensão sendo tão ativa como antes da filtração. Conserva-se bem em glicerina a 50% pelo menos 60 dias, se guardado na geladeira. Suspensão de cérebro e medula aquecida em banho-maria a 56°C por 30 minutos perde a atividade.

7) — O título variou entre 4.000 e 20.000 dmm.

8) — Obteve-se infecção por inoculação intracerebral, por instilação nasal e, com menos regularidade, por inoculação intraperitoneal; a via gástrica deu sempre resultados negativos. Camundongos muito jovens são mais suscetíveis do que os adultos.

9) — O vírus foi sempre isolado até 90 dias pós-inoculação, do cérebro e da medula de camundongos com paralisia. Animais inoculados por via i.c., que permaneceram aparentemente normais, albergam o vírus no cérebro pelo menos durante 30 dias.

10) — Não foi possível isolar vírus do fígado, pulmão, baço, rim e sangue de camundongos infetados por via intracerebral.

11) — Camundongos que foram inoculados por via i.c. e não apresentaram sintomas de infecção, mostraram-se em geral imunes a uma posterior inoculação de vírus. Os soros de animais convalescentes apresentam anticorpos neutralizantes verificados por provas de proteção.

12) — A inoculação intracerebral do vírus em macaco, coelho, cobaia e rato, todos jovens, não produziu infecção.

13) — As lesões encontradas foram de poliomielencefalite aguda, com atrofia do corno anterior da medula. Ao nível da substância cinzenta medular e cerebral encontram-se abundantes focos inflamatórios, com predominância de mononucleares, bem como em torno de numerosos vasos. Em certos pontos do cérebro, sobretudo no rinencéfalo, foram vistos focos extensos de encefalite hemorrágica. É evidente que em torno do foco e participando das infiltrações celulares, muitos elementos microgliais puderam ser reconhecidos. As meninges, especialmente a pia-máter, mostraram-se levemente alteradas e assim mesmo em focos esparsos.

14) — O cerebelo foi o órgão nervoso que se mostrou menos afetado. Lesões naturalmente na dependência da toxi-infecção, foram observadas aí. A pia-máter e a substância branca deste órgão também foram sede de lesões congestivo-inflamatórias, bem como a substância que forma o soalho do quarto ventrículo.

15) — Lesões degenerativas foram encontradas nos neurônios da corteza cerebral, mas é fora de dúvida que as células nervosas da ponta anterior da medula apresentaram as mais graves alterações regressivas. As alterações inflamatórias focais e as degenerativas da ponta anterior lembravam as encontradas na poliomielite anterior aguda ou enfermidade de HEINE MEDIN. Esta semelhança era ainda reforçada pelo fato de o corno anterior da medula murina apresentar-se evidentemente atrofiado em consequência do processo inflamatório e do desaparecimento de numerosos neurônios radiculares. É preciso realçar também que num animal encontramos a degeneração de um feixe do cordão lateral, o qual se achava esclerosado e que pela sua sede deve ser o feixe piramidal cruzado. A degeneração deste feixe pode ser explicada seja pela lesão traumática da inoculação, o que é mais provável, seja pela inflamação cerebral.

16) — Parece que o vírus encontrado em nossos camundongos é perfeitamente idêntico ao descrito por THEILER na encefalomielite espontânea destes roedores.

#### SUMMARY AND CONCLUSIONS

1) — Two strains of virus which produce myeloencephalitis were isolated from two white swiss mice, from breeding, spontaneously infected, among 7000 mice examined; another strain was obtained by trituration and filtration of the intestines of normal mice.

2) — There were made separately ten serial passages in young and adult mice by intracerebral route. By crossed immunological test it was verified that the three strains were identical, and so only one was continued.

3) — The infective power grows with the number of passages: the average incubation period diminishes and the mortality ratio increases highly.

4) — The spontaneous and experimental disease is described. The infection is more commonly among young mice. The average incubation period varies from 5 to 30 days. Sometimes it is possible to observe a prodromal period: weakness, smaller activity, difficulty of locomotion; generally there appears a flacid paralysis without previous symptoms, most commonly on the hind legs. Clinical forms: superacute, acute and chronic.

5) — In normal mice virus can be demonstrated in the feces and also in the walls of the intestine. The virus appears to be a common inhabitant of the alimentary tract and only occasional invader of the central nervous system, in other words, the encephalomyelitis is primarily an alimentary tract disease in which invasion of the nervous system is only an occasional incident.

6) — The virus is filtrable by Chamberland L3 and L5, Berkefeld V, N and W and Seitz EK; the suspension is as active as before filtration. It will keep well at frigo at least during 60 days in glycerine at 50%. Brain and cord suspensions when heated in hot bath at 56°C by 30 minutes, lost their activity.

7) — The title has varied between 4.000 to 20.000 M. L. D.

8) — Infection was obtained by intracerebral inoculation, nasal instillation and, with less regularity, by intraperitoneal inoculation; the gastric route was always negative. Very young mice are more susceptible than adult ones.

9) — Virus was always isolated up to 90 days post-inoculation from brain and spinal cord of mice with paralysis. Animals inoculated through intracerebral route, which remain apparently normal, keep the virus in the brain at least during 30 days.

10) — It was not possible to find virus in the lungs, liver, spleen, kidneys and blood of mice inoculated intracerebrally.

11) — Mice which received virus by intracerebral route and did not show symptoms of infection, generally were immune to another administration of virus. The convalescent mice sera showed positive protection test.

12) — Young rhesus, rabbit, guinea pigs and rats, inoculated intracerebrally with relatively large doses of encephalomyelitis virus failed to show symptoms referable to the virus.

13) — Lesions of acute poliomyeloencephalitis, with atrophy of the anterior horn of cord, were found. At the level of grey substance of the spinal cord and brain we found a considerable number of inflammatory foci, at all times mononuclears predominate in the infiltration and around the numerous vessels. In certain parts of the cerebrum, especially in the rhinencephalus, extensive foci of hemorrhagic encephalitis were found. It is evident that around the focus and affected by cellulars infiltration many microglial elements could be traced. The meninges, especially the pia mater, showed a slight alteration, and even so in separate foci.

14) — The cerebellum was the nervous organ which showed to be the least affected. Insignificant lesions, resulting from the toxi-infection, were observed in this point. The pia mater and the white substance of this organ also presented inflammatory and congestive lesions, as well as the substance of the floor of fourth ventricle.

15) — Degenerative changes were found in the nervous cells of the cerebral cortex, but there is no doubt that the nervous cells in the anterior horns of the spinal cord showed the most serious regressive alterations. The focal inflammatory changes and the degenerative alterations of the anterior horns resemble those found in the human acute anterior poliomyelites or Heine-Medin disease. This resemblance is still increased by the fact that anterior horn of the cord of the mouse is shown to be evidently atrophied in consequence of the inflammatory process and the disappearance of numerous radicular neurons. It must be pointed out that we found in one animal degeneration of the lateral funiculus, which was esclerosed and, by its localization must be the crossed pyramidal tract. The degeneration of this tract can be explained either by traumatic lesion caused by the inoculation which is more probable, or by the central inflammation.

16) — It seems that the virus, found in our mice is exactly identical to the one described by Theiler in the spontaneous encephalomyelitis of these rodents.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMSTRONG, C.  
1939. The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern cotton rat, *Sigmodon hispidus hispidus*. Pub. Health Rep., 54 : 1719-1721.
2. ARMSTRONG, C.  
1939. Successful transfer of the Lansing strain of poliomyelitis virus from the cotton rat to the white mouse. Pub. Health Rep., 54: 2302-2305.
3. BOURDILLON, J.  
1941. Analytic diffusion of mouse encephalomyelitis virus. J. Gen. Physiol., 25 : 263-273.
4. DINGLE, J. H.  
1941. Encephalomyelitis of mice. Biology of the laboratory mouse, By the Staff of the Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory, 443-448.
5. DUNHAM, W. B. e PARKER, S.  
1943. Cultivation of the virus of mouse encephalomyelitis (Theiler's virus). J. Bact., 45 : 80.
6. EKLUND, C. e THEILER, M.  
Citado por Theiler (32).
7. FINDLAY, G. M.  
1939. Variation in viruses. Handbuch der Virusforschung. Herausgegeben von Prof. Dr. R. Doerr und Prof. Dr. Hallauer, Zweite hälfte, 892.
8. FRANCIS, T. JR. e MAGILL, T. P.  
1938. An unidentified virus producing acute meningitis and pneumonitis in experimental animals. J. Exp. Med., 68 : 147-160.
9. GAHAGAN, L. e STEVENSON, L. D.  
1941. A strain of virus producing meningo-encephalomyelitis in mice, with special reference to pathogenesis. J. Infect. Dis., 69 : 232-237.
10. GARD, S.  
1940. Encephalomyelitis in mice; methods for measurement of virus activity. J. Exp Med., 72 : 69-77.
11. GARD, S. e PEDERSEN, K. O.  
1941. Purification of virus of mouse encephalomyelitis (Theiler's virus). Science, 94 : 493-494.
12. GILDEMEISTER, E. e AHLFELD, I.  
1938. Über eine bei der weissen Maus spontanen aufgetretene Meningo-Enzephalomyelitis. Cent. Bact. Orig., 142 : 144-148.

13. HOWE, H. A. e BODIAN, D.  
1942. Neural mechanisms in poliomyelitis. Commonwealth Fund, New York.
14. IGUCHI, M.  
1938. Citado por Iguchi (15). Saikingaku Zasshi, 509 : 481.
15. IGUCHI, M.  
1939. On the spontaneous encephalomyelitis of mice and its virus. Kitasato Arch. Exp. Med., 26 : 56-78.
16. JUNGEBLUT, C. W.  
1943. Biological changes in Theiler's virus of spontaneous mouse encephalomyelitis. Am. J. Pub. Health, 33 : 1227-1243.
17. JUNGEBLUT, C. W., SANDERS, M. e FEINER, R. R.  
1942. Studies in rodent poliomyelitis. I. Further experiments with the murine strain of SK poliomyelitis virus. J. Exp. Med., 75 : 611-629.
18. KLINGER, I. J.  
Citado por Olitsky (25).
19. LILLIE, R. D. e ARMSTRONG, C.  
1940. The pathology of poliomyelitis experimental induced in the eastern cotton rat, Sigmodon hispidus hispidus. Pub. Health Rep., 55 : 115-119.
20. LILLIE, R. D. e ARMSTRONG, C.  
1940. Cerebrospinal pathology of experimental poliomyelitis in the eastern cotton rat, Sigmodon hispidus hispidus, and the white rat, Mus musculus. Pub. Health Rep., 55 : 718-725.
21. MELNICK, J. L.  
1942. Concentration of dilute solution of virus of mouse encephalomyelitis by pervaporation and ultracentrifugation. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 49 : 553-557.
22. MELNICK, J. L.  
1943. Detection of the virus of mouse encephalomyelitis in the intestines of normal kangaroo rats. J. Immunol., 47 : 231-236.
23. OLITSKY, P. K.  
1939. Viral effect produced by intestinal contents of normal mice and of those having spontaneous encephalomyelitis. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 41 : 433-437.
24. OLITSKY, P. K.  
1940. Agent in intestines of normal mice which induces encephalomyelitis; further studies. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 43 : 296-300.
25. OLITSKY, P. K.  
1940. A transmissible agent (Theiler's virus) in the intestines of normal mice. J. Exp. Med., 72 : 113-127.

26. OLITSKY, P. K.  
1940. Immunological studies on intestinal Theiler's virus and its relation to poliomyelitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 45 : 339-343.
27. OLITSKY, P. K. e SCHLESINGER, R. W.  
1941. Histopathology of central nervous system of mice infected with virus of Theiler's disease (spontaneous encephalomyelitis). *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 47 : 79-83.
28. OLITSKY, P. K. e SCHLESINGER, R. W.  
1941. Virus of spontaneous encephalomyelitis found in intestines of normal wild gray mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 47 : 101-103.
29. REED, L. J. e MUENCH, H.  
1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27 : 493-497.
30. SABIN, A. B.  
1940. The olfactory bulbs in human poliomyelitis. *Am. J. of Dis. of Children*, 60 : 1313-1318.
31. THEILER, M.  
1934. Spontaneous encephalomyelitis of mice — a new virus disease. *Science*, 80 : 122-123.
33. THEILER, M.  
1937. Spontaneous encephalomyelitis of mice, new virus disease. *J. Exp. Med.*, 65 : 705-719.
32. THEILER, M.  
1941. Studies on poliomyelitis. *Medicine*, 20 : 443-462.
34. THEILER, M. e GARD, S.  
1940. Encephalomyelitis in mice; characteristic and pathogenesis of virus. *J. Exp. Med.*, 72 : 49-67.
35. THEILER, M. e GARD, S.  
1940. Encephalomyelitis in mice; epidemiology. *J. Exp. Med.*, 72 : 79-90.
36. YOUNG, L. E. e CUMBERLAND, M. C.  
1943. The mouse-adapted Lansing strain of poliomyelitis virus. III. Comparison with a strain of mouse encephalomyelitis virus isolated from the intestines of normal mice. *Am. J. Hyg.*, 37 : 216-224.