

Faculdade de Medicina de Porto Alegre

THESE

Apresentada em Dezembro de 1924
à Faculdade de Medicina de Porto Alegre

pelo

Dr. Djalma da Costa Moellmann

Formado pela Faculdade de Medicina da
Universidade de Genebra

para

REVALIDAÇÃO DE DIPLOMA

A proposito d'alguns methodos de
coloração do corpusculo de Negri



MED
T
616.953
M693p
1924

PORTO ALEGRE
ASO & C. - LIVRARIA DO GLOBO
Santa Maria e Pelotas

Faculdade de Medicina de Porto Alegre

THESE



Apresentada em Dezembro de 1924
à Faculdade de Medicina de Porto Alegre

pelo

Dr. Djalma da Costa Moellmann

Formado pela Faculdade de Medicina da
:: :: Universidade de Genebra :: ::

para

REVALIDAÇÃO DE DIPLOMA

—♦♦♦—
**A proposito d'alguns methodos de
coloração do corpusculo de Negri**
—♦♦♦—

PORTO ALEGRE
BARCELLOS, BERTASO & C. — LIVRARIA DO GLOBO
Filiaes: Santa Maria e Pelotas



Bib.Fac.Med.UFRGS

T-0644

A proposito d'alguns metodos d

HISTORIA DA RAIVA

Seja-nos permittido, em face da intima relação entre os corpusculos de Negri e a raiva, esboçar neste pequeno trabalho algumas considerações sobre o historico desta affecção.

A raiva, zoonose infecciosa transmissivel ao homem, é conhecida desde os tempos os mais remotos. A Biblia, apesar de não se referir directamente á doença, allude porém ao facto dos judeus possuirem cães pouco doces e que algumas vezes chegavam a matar os donos; cita o caso dos cachorros de Josabel que, tornando-se furiosos, mataram o proprio senhor.

Entre os Egepcios, os cães gosavam a fama de possuirem attribuições divinas, pertencendo á classe dos chamados Deuses animaes. Entre os povos daquella epocha, o pó do escarabeu era tido como remedio poderoso contra a raiva. Esta medicação só podia ser executada pelos denominados sacerdotes medicos, pois o escarabeu tambem pertencia á classe dos Deuses. Quem os sacrificasse era punido de

morte, razão pela qual este tratamento era feito debaixo de todo o sigilo.

Nos tempos dos Gregos, a doença devia ser mui rara, pois Homero silencia por completo sobre a raiva dos cães.

A zoonose era-lhe porém conhecida, pois que um dos seus heróes, Tencer, accusa Hector de ser um cão raivoso.

Os latinos nos informam melhor a respeito; assim, Celso, considerava a raiva um castigo dos Deuses. Affirma que é perfeitamente evitavel e aconselha como tratamento preventivo a sucção da ferida com ventosas, cauterisação energica com ferro incandescente, sangrias, banhos quentes e lavagens da ferida com loções feitas com vinho e vinagre.

Apesar de todos estes tratamentos preventivos, o auctor confessa que a doença se póde manifestar, empregando-se então, como recurso extremo, os banhos frios. Estes banhos seriam praticados, pegando o paciente desprevenido e atirando-o dentro da agua, obrigando-o a beber o liquido para o qual elle demonstra visivel horror. Além desses recursos terapeuticos, era recommendada severa dieta, obrigando tambem o paciente a tomar um purgativo em cada tres dias.

Discoride aconselha tratamento analogo; sendo, porém, de opinião que a doença uma vez declarada, apresenta sempre um prognostico lethal. Plinio, que votava particular sym-

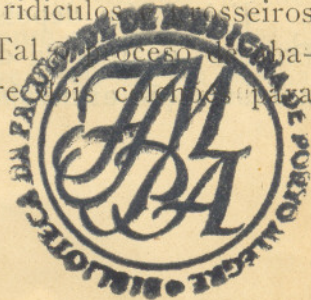
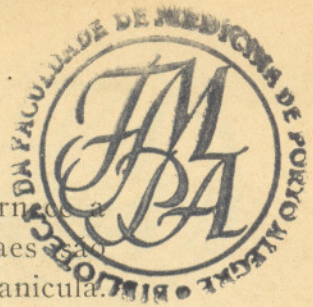
pathia aos cães, detalhadas noticias fornecidas neste respeito, dizendo que taes animaes são atacados principalmente durante a canicula. Aconselha administrar preventivamente aos cães, carne de gallinha, durante 30 dias. De uma fôrma evidentemente sceptica, refere-se a todos os meios de cura, empregados no combate á raiva, não acreditando na receita dos sacerdotes egypcios. Recommenda os cuidados aconselhados por Celso e empresta alguma efficacia aos seguintes tratamentos: comer crú o figado e a carne do cão mordedor e administrar internamente a genciana, camomilla e outras hervas em infusão.

O remedio por excellencia seria, porém, o chá da raiz da roseira selvagem. Esta tisana aconselhada por um oraculo, curára um pretoriano atacado de hydrophobia.

Tres seculos depois de Celso, Galeno aconselha como meio preventivo a excisão dos tecidos mordidos.

Os medicos da idade media continuaram na mesma ignorancia dos seus antecessores, contentando-se em repetir e aggravar ainda mais os erros de seus antepassados.

Seus trabalhos deram curso ás ideias mais absurdas e extravagantes. Originaram-se sistemas os mais variados, ridiculos e grosseiros de combater a doenca. Tal processo de tratar o infeliz doente entre outros meios para



evitar que sua respiração empestasse o ar, propagando assim a raiva.

Esta pratica foi ainda observada por Wirchow no norte da Allemanha. Celebre ficou o systema, tido como infallivel, de banhar-se o individuo mordido pelo cão raivoso, nove vezes nas aguas das praias da Normandia. Segundo a crença daquella epocha, só essas praias possuíam o dom de evitar a explosão da doença. Até os nossos dias chegou a fama que gosava Santo Umberto de preservar da raiva todo aquelle que se lhe approximasse.

Taes ideias campearam até o começo do seculo dezenove, quando ainda era a raiva considerada como consequencia da acção do calor, da fome, sêde e abstinencia soffrida pelos cães. A ninguem veio a ideia de consideral-a como doença infecciosa.

A partir dessa epocha percebe-se a influencia manifesta dos estudos experimentaes em taes assumptos, facto este que aliás imprimiu ao espirito scientifico uma nova orientação, permittindo apreciarmos em pathologia o avanço progressivo do homem, sempre em lucta com os mais variaveis males. Em 1804, Zinke obtem a prova experimental da doença, innoculando a baba dum cão raivoso num outro animal da mesma especie.

Foi porém depois dos geniaes estudos de Pasteur, quando da descoberta do systema de immunisação anti-rabica, problema este que já

tinha sido tentado por Galtier em 1881, que o estudo da raiva tomou um rumo verdadeiramente científico.

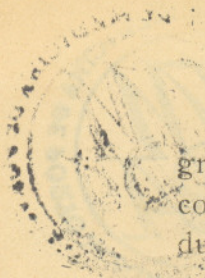


Conceito actual sobre o corpúsculo de Negri

Depois das celebres experiencias de Pasteur conseguindo reproduzir a raiva, por inoculação subdural, em coelhos, e descobrindo o methodo de immunisação preventiva da doença, dedicaram-se os pesquisadores com grande afan á pesquisa do seu agente especifico.

Em taes circumstancias, como era de prever, não faltaram descobertas, demonstrando cada auctor um microbio ou protozoario que seria o causador da zoonose. A maior parte destas descobertas, porém, passaram ao registro dos factos historicos, visto como não resistiram aos embates de uma critica severa e desapaixonada. Outras conservaram-se de pé até nossos dias pelo menos sob certo ponto de vista. O proprio Pasteur, e com elle numerosos observadores, dedicaram-se com afinco a estes estudos, chegando mesmo a descrever, como agente especifico da raiva, certas formações, ou melhor granulações arredondadas de diametro variavel.

Noguchi pensa mesmo ter chegado a cultivar estas granulações e num artigo original da Press. med. de 1913 descreveu certas fórm



granulares ou nucleares, obtidas em cultura com material de animaes mortos de raiva produzida pelo virus das ruas, virus de passagem e virus fixo. Egualmente Volpino (Press. med. 1914, pg. 79), repetindo as experiencias de Noguchi, observou nos tubos testemunhas não sementeas com o virus rabico, os mesmos corpusculos e concluiu que se tratava no caso de gottas de substancias lipoidê proveniente do liquido da cultura.

Em seu trabalho sobre a raiva (Wirch. Archiv 1887) Babés insiste sobre a frequencia de certos microbios de fórmula arredondada metacromaticos, cultivados pelo auctor e que mesmo na segunda e terceira passagem eram capazes de reproduzir a raiva com todo o cortejo de symptomatos classicos.

O auctor não considera essas fórmulas como sendo os agentes especificos da raiva, mas sim como simples associação na cultura dos verdadeiros causadores da doença. O microbio especifico seria impossivel ser evidenciado dado os escassos recursos de investigação daquella epocha.

A unica descoberta que se tornou classica e que, sob certo ponto de vista, ainda conserva o seu valor original foi a de Negri quando em 1903 descreveu no systema nervoso central de animaes mortos, de raiva, pequenos corpusculos considerados como o agente da zoonose.

Estes corpusculos foram classificados pelo



auctor conro sendo protozoarios, considerados como verdadeiros agentes do mal, dada a circumstancia de serem encontrados constantemente em individuos atacados de raiva.

Tal verificação aguçou naturalmente a curiosidade dos pesquisadores; sendo unanimemente confirmada.

Sómente Babes poudes descrever formações analogas nas cellulas dos ganglios espinhaes dum cão intoxicado pelo arsenico. Além disto foram descriptos corpusculos parecidos com os de Negri no corno de Ammon de gatos não rai-vosos. Estas formações acham-se geralmente situadas no cytoplasma ou nos grandes prolongamentos dentriticos das cellulas nervosas.

Variaveis de dimensão, oscillando entre 1 a 27 microns, pôdem ser apreciados ultrapassando taes dimensões. Medem em media 3 a 8 microns, encontrando-se alguns porém tão diminutos, que attingem apenas os limites da visibilidade. Inconstantes na fórmula, são em geral ovoides ou arredondados conforme sua localização na cellula nervosa. Quando comprimidos pelo nucleo do elemento celular, pôdem exteriorisar fórmassas mais variaveis, sendo em geral pequenos, quando localisados nos cylindros eixos. De estructura reticular, são delimitados por uma membrana nitidamente diferenciada, permittindo apreciar um ou varios vacuolos. Um halo transparente formado pela retracção

do cytoplasma, os separa nitidamente do protoplasma cellular.

Manouelian descreve no interior dos corpusculos de Negri outras pequenas formações arredondadas e mais claras, contendo estas, por vezes, ainda outros pequenos corpusculos. Estes ultimos seriam frequentemente substituidos por pequenos bastonetes curtos.

A quantidade das inclusões seria variavel podendo attingir, nos grandes corpusculos até o numero de 30.

Apesar de alguns auctores negarem a existencia dos corpusculos de Negri na raiva de virus fixos, Manouelian, em seus estudos comparativos entre estas duas especies de raiva, encontrou nos centros nervosos de 148 coelhos sacrificados em varios periodos da doença, frequentemente formações especiaes analogas aos pequenos corpusculos descriptos por Negri na Raiva das ruas.

Empregando o methodo de Mann, corou cortes de corno de Amon, da cortex cerebral, do cerebello, da protuberancia, do bulbo e medulla espinal, e dos ganglios cerebro espinaes e sympathicos dos animaes sacrificados.

Observou minusculas formações coradas em vermelho particularmente abundantes nas cellulas do tecido da cortex cerebral e do corno de Amon.

Observando as preparações com objectivas poderosas, encontrou algumas de tamanho tão



pequeno, que apenas eram visíveis. Estes corpusculos não foram encontrados nos animaes testemunhas.

Além destas formações verificam-se, frequentemente, algumas outras maiores analogas as de Negri, attingindo raramente a grandes proporções. Em taes circumstancias, podem-se apreciar corpusculos invadindo toda a area das cellulas pyramidaes do corno de Amon.

O auctor não ousa concluir definitivamente sobre a natureza dos corpusculos observados. Allude sómente a Negri e a outros observadores que os consideraram como agentes específicos da raiva. Compara porém os corpusculos de Negri, sob o ponto de vista de sua forma, estructura, character hysto-chimico e modo de regressão, — pois observou que algumas formações mostravam character francamente degenerativo, — aos corpusculos dos corpos residuaes dos testiculos. Aconselha ainda aos auctores não se pronunciarem apressadamente sobre os elementos que acabamos de fazer allusão.

Da Costa (Bull. da soc. portugueza de ciencias) descreveu-os nas glandulas suprarenaes de cobaios inoculados com virus rabico e Manouelian nas cellulas nervosas dos ganglios das glandulas salivaes de cães raivosos.

Além do homem, tem sido encontrado no systema nervoso de todas as classes de animaes atacadas pela zoonose rabica, como sejam o ca-

vallo, boi, cão, gato, coelho, cobaia, rato, camondongo e numa observação publicada por Viala e Manouelian numa leôa importada da Abyssinia.

Tratava-se dum lote de quatro leôas que chegadas a Paris, o proprietario notou que uma dellas mostrava-se triste, comendo muito mal e conservando-se sempre tristonha e afastada de suas companheiras.

No dia seguinte, mostrava-se muito agitada, urrando a todo o momento com uma tonalidade particularmente rouca. Vinte e quatro horas depois deste periodo de agitação, manifestou-se no animal uma paralyisia do segmento posterior que se accentúa rapidamente. No dia immediato, a paralyisia progride para os membros anteriores e a leôa morre depois dum curto periodo de agonia.

Diagnosticada a raiva pelo veterinario, foi feita a autopsia que nada revelou de anormal nos differentes orgãos. A urina colhida por punção da bexiga, revelou forte glycosuria. Os cortes hystologicos do corno de Amon, corados pelo methodo de Mann, demonstraram a existencia de corpusculos de Negri em grande quantidade. A emulsão do bulbo rachidiano, innoculada na camara anterior do olho dum coelho e nos musculos servicaes de duas cobaias, produziram a raiva typica nestes animais depois de 15 dias de incubação. Tratava-se pois no caso, indubitavelmente, de raiva, da-

da a imagem clinica apresentada pelo animal: a existencia de grande numero de corpusculos de Negri no corno de Ammon e a experimentação positiva.

Os auctores não conseguem porém explicar o modo pelo qual o animal contrahi a doença. Lembram a eventualidade de ter sido mordido por um cão ou por um animal de sua especie que estivesse raivoso, ou ainda que, tendo-se alimentado de um animal doente, tenha-se infectado por erosão da mucosa buccal feita por um osso da presa que lhe serviu de repasto.

A existencia dos corpusculos descriptos por Negri foi confirmada por um grande numero de auctores que se dedicaram ao estudo do assumpto, sendo porém justamente sobre a sua significação que nem todos estão de acôrdo.

Como já foi mencionado, o seu descobridor considera-os como um protozoario. De opinião analoga são, entre outros, Williams e Lowden que consideram o agente da raiva representado pelo corpusculo de Negri como um protozoario, classificando-o na subordem chamada microsporidias. Em favor de tal hypothese, pugna tambem Calkins que clasifica o corpusculo como sendo um rhisopodo, denominando-o de neurocytos-hydrophobiae.

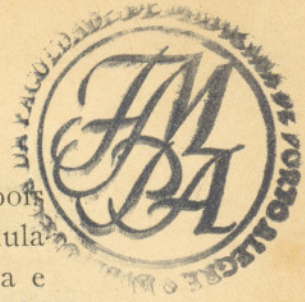
Tal não é a interpretação de Babès a respeito da questão a que vimos de fazer allusão. Repetindo as classicas experiencias de Reill



ger e Schüder, que demonstraram a permeabilidade do agente da raiva através de certos filtros impermeáveis para a maioria dos microbios, demonstrou que o virus só atravessa os filtros que dão passagem a certos microbios de diametro mais ou menos de 1 micron. Os filtros que detêm estes microbios tambem impedem a passagem do virus rabico.

O auctor deduz de taes observações que o agente da raiva deve oscillar nas proximidades de 1 micron, explicando assim a difficuldade de sua descoberta. Chegou mesmo a fazer passar através de velas Bekerfeld certos bacillos extremamente finos, apenas visiveis com forte augmento através dos quaes o virus rabico não passava mais.

Em sua communição á Academia da Rumania (Outubro de 1904) conclue que o microbio da raiva, ainda que diminuto, deveria com toda a probabilidade, ser visivel. Partindo deste principio encontrou, por meio de methodos especiaes (coloração pelo Cajal-Giemsa) certos grãos duma pequenez extrema, dispostos como fossem fina poeira no interior do cytoplasma das cellulas nervosas, principalmente nas do bulbo e da medulla. Nos animaes testemunhas, não doentes, estas granulações não estavam presentes. Como estas formações fossem maiores que um micron, podendo assim franquear certos filtros, o auctor não hesitou em consideral-as como se fossem os microbios causado-



res da raiva. O corpusculo de Negri seria por a expressão duma forte reacção local da cellula nervosa, provocada pela invasão do parasita e seguida de sequestração e incapsulação dos mesmos.

Esta reacção seria talvez a demonstração duma maior resistencia de taes elementos nervosos mais refractarios ao agente da raiva que os das outras partes do systema nervoso.

Manouelian e Viala, em recente communição publicada nos annaes do Instituto Pasteur de Paris, (Março de 1924) voltaram novamente a tratar do assumpto, confirmando as ideias externadas em 1912 e por nós alludidas. Os auctores insistem então sobre a existencia de corpusculos atypicos, corando-se com menos intensidade, apresentando-se de aspecto violaceo e mesmo azulados. Em determinados corpusculos, os detalhes estructuraes revelam-se com menos nitidez, empallidecem, tornam-se vacuolados, os contornos se apagam e, finalmente, desaparecem no protoplasma da cellula nervosa. Os auctores firmaram assim a convicção de terem acompanhado todas as etapas da degenerescencia dos corpusculos de Negri.

Imbuidos em taes ideias se propuzeram a investigar a origem destes corpos e foi utilizando fixadores especiaes e corando com grande cuidado pelo methodo de Mann os cortes incluídos em celoidina e parafina que chegaram a

isolar certas fórmãs especiaes, que consideram como sendo o agente causador da raiva.

Os exames praticados em individuos ataçados de raiva das ruas e raiva de virus fixos permittiram apreciar em todo o systema cerebro espinal, no systema nervoso sympathico, nos nervos perifericøs e nas glandulas salivares as formações acima mencionadas.

A technica seguida pelos auctores foi a seguinte :

Como elementó fixador, foi usado o sublimado alcool-aceutico de Gilson ou o sublimado de Dominici.

A formula no reactivo de Gilson é a seguinte :

Acetona pura.	} ãa
Acido acetico christalisado.	
Chloroformio.	

Ajunta-se o bi-chlorureto de mercurio em pó em excesso, preparando-se a mistura no momento de ser usada.

Na occasião de ser utilizada, junta-se gotta a gotta solução alcoolica de iodo, agitando o liquido com uma haqueta de vidro, até que o fixador tome côr acajú escura.

O liquido de Dominici deve ser preparado extemporaneamente.

Decanta-se uma solução aquosa saturada

de sublimado, ajunta-se gotta a gotta, agitando, tintura de iodo até o liquido tornar-se alaranjado.

A 100 volumes desta solução accrescentam-se 12 volumes de formol a 40 % e 5 volumes de acido acetico. E' preciso manter a côr alaranjada da mistura ainda que sejam necessarias mais algumas gottas de tintura de iodo.

As peças repousam neste fixador de duas a vinte e quatro horas, passando-se em seguida para o alcool ou acetona iodada. Os auctores recommendam como condição essencial para observar os parasitas em questão, a dupla-inclusão em celoidina e parafina, operação esta de technica delicada que em seus traços geraes passamos a descrever.

Depois de incluir a peça em celoidina pelo processo classico, evita-se o quanto possivel o endurecimento desta substancia. Envolve-se a peça numa ligeira camada da mesma substancia e deixa-se seccar durante alguns minutos e em seguida mergulha-se a peça na solução seguinte :

Alcool absoluto — 500 cm.³

Chloroformio — 50 cm.³

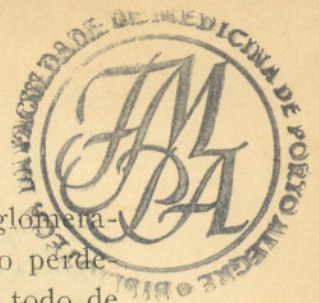
Ao cabo de algumas horas, transporta-se a peça deste liquido para um dissolvente da parafina, de preferencia o tolueno, depois pelo processo commum inclue-se na parafina. Graças a este methodo, obtem-se preparações muito bellas e de grande nitidez, observando-se per-

feitamente os prolongamentos cylindros-eixos das cellulas nervosas. Procedidos os cortes as preparações são coradas pelo methodo de Mann modificado por Manouelian que descreveremos detalhadamente, quando tratarmos de diversos processos para coloração dos corpusculos de Negri.

Estudando a raiva das ruas em cães, foi precisamente ao nivel das cellulas pyramidaes do corno de Ammon, que os parasitas foram encontrados em maior quantidade de par com os corpusculos de Negri. Corados pelo processo de Mann se apresentam em vermelho vivo, formando frequentemente agglomerados. Pódem ser apreciados mesmo com pequeno augmento.

Examinados com a immersão mostram-se alongados, periformes, de dimensões variaveis, oscillando entre 1 e 2 microns, havendo fórmulas muitissimo menores attingindo o limite da visibilidade. As imagens mais desenvolvidas pódem evidenciar, a um forte augmento, granulações de chromatina. A distribuição no interior da cellula nervosa é muito inconstante, havendo cellulas em que são mui raros e em outras em que se apresentam em grande numero. Não pódem ser confundidos com as formações de Negri, dado o seu aspecto fusiforme, sua coloração mais intensa e a falta do halo branco que sempre circunda os corpusculos de Negri.

Os auctores pensam ter observado fórmulas intermediarias entre estas duas entidades. As-



sim em certas cellulas sobresaem aglomerados dos parasitas que pela sua reunião perderam a fórma individual, formando um todo de contorno regular aparentemente assemelhando-se aos corpusculos de Negri. Os alludidos corpusculos seriam pois a expressão de uma reacção mais ou menos intensa da cellula nervosa contra a invasão dos parasitas que aglomerados e agglutinados formariam os corpusculos de Negri.

A propriedade de agglutinar os parasitas seria o apanagio das cellulas nervosas, pois nas cellulas das glandulas salivares, onde pullulam os parasitas, os corpos de Negri não seriam encontraveis.

Entretanto foram observados por varios auctores nas cellulas nervosas dos ganglios destas glandulas. Explicam a differença existente entre os corpusculos encontrados nos individuos atacados de raiva das ruas e os innoculados pelo virus fixo, na reacção especial das cellulas nervosas a um virus exaltado como é o fixo. Os parasitas além de se corarem pelo azul polychromo, pelo eosina e o azul de tuldina e Giemsa, são acidos resistentes como o bacillo de Koch. Coram-se pelo Gramm e não são impregnados pelo methodo de Ramon e Cajal.

As lesões das glandulas salivares nos individuos atacados de raiva são mui variaveis, sendo a histologia pathologica impotente para

affirmar, duma maneira peremptoria, o diagnostico da doença. Grande foi o esforço dos pesquisadores em achar um signal que fosse caracteristico, pois, em alguns casos o exame da massa encephalica torna-se impraticavel, sendo de grande importancia o exame das glandulas salivares.

De facto, como já foi mencionado, conseguiram corar nas cellulas dos ganglios destas glandulas corpusculos identicos aos de Negri, facilitando assim em taes circumstancias o diagnostico. Os parasitas da raiva, porém, foram encontrados nos ganglios nervosos e tambem no interior das cellulas glandulares, quer esparços, quer reunidos, formando grupos, ás vezes em numero consideravel. São principalmente encontraveis nas regiões em que a glandula é mais aggreddida e as cellulas mais alteradas. Acham-se em grande numero no interior dos canaliculos glandulares, ficando assim explicada a sua presença na baba.

A conclusão a que chegaram os auctores na descoberta do agente da raiva baseia-se nos seguintes factos :

Os parasitas foram constantemente observados nos órgãos virulentos, sua fórmula e estrutura não permitem confusão com os elementos constituintes das cellulas nervosas. A presença nas glandulas salivares e as reacções corantes fazem crer que se trata, no caso, dum protozoario. Insistem sobre a presença dos al-

ludidos parasitas no interior da cellula nervosa, relacionando este facto ao da incurabilidade da molestia. Da mesma fórma, porque consideram o prognostico sombrio da paralytia geral, devido á presença dos spirochetas no interior das cellulas nervosas. Julgam quando estas são invadidas por um parasita, o prognostico da doença torna-se extremamente grave.

Como as fórmas a que alludimos tenham particular semelhança com as descriptas por Doer e Zdansky na poliomyelite experimental do coelho, julgando estes autores tratar-se dum protozoario, creando assim o genero encephalitozoon (Levadite), Manouelian e Viola para não crearem um novo nome denominam os parasitas geradores da raiva de encephalitozoon rabiei.

Importancia do corpusculo de Negri no diagnostico da raiva

Do que acabamos de expôr, resalta claramente o grande valor que se deve attribuir aos corpusculos de Negri no diagnostico da raiva. Emquanto não fôr confirmada a descoberta do encephalitozoon rabiei por grande numero de pesquisadores e não se vulgarisar e simplificar os meios de suas pesquisas, será ainda á pesquisa das formações descriptas por Negri que teremos de recorrer, como um meio seguro e

rápido para diagnosticar a raiva. Com effeito, estas formações encontram-se constantemente, sobretudo no corno de Ammon dos animaes atacados de raiva, existindo tão sómente nesta doença. Grande numero de pesquisas foram feitas no systema nervoso de individuos soffrendo de paralytia geral, doença do somno e em individuos de idade avançada, sendo sempre impossivel encontrar formações analogas em taes casos. Sendo por vezes negativas as proprias provas experimentaes, estas que quando positivas tudo elucidam, todavia ao lado deste recurso nunca devemos abandonar a pesquisa dos corpusculos de Negri, visto como, pela rapidez do exame e constancia de sua presença, representam um valioso elemento para o diagnostico do mal em foco. Tal facto no referente á experimentação, está em flagrante contraste com a asserção de Kolle-Hecht, affirmando que a emulsão do bulbo innoculada subduralmente em coelhos reproduz a raiva com absoluta certeza, depois duma incubação de tres semanas pouco mais ou menos.

Das innoculações subduraes por nós feitas em oito coelhos com material retirado do bulbo de oito bois mortos de raiva, só dois reagiram com symptomas classicos da raiva depois de 3 semanas de innoculação. Manouelian, num relatório dos annaes do Instituto Pasteur de 1912, refere-se a factos analogos nos numerosos casos de raiva por elle estudados. Em 9 dos casos, ape-



zar da existencia de signaes clinicos de raiva e a pesquisa positiva do corpusculo de Negri a prova experimental foi negativa. O que mais uma vez põe em foco, no que pese a opinião de Kolle e Hecht o absolutismo em medicina, maximé no terreno da experimentação. Factos analogos foram relatados pelo professor Gonçalves Vianna, que numa das sessões da Sociedade de Medicina de Porto Alegre (1924), se insurgindo contra as formulas mathematicas em medicina, alludiu justamente a este mesmo facto que acabamos de commentar. Declarou o professor Vianna que em doze annos de trabalho no Instituto Pasteur da Faculdade de Medicina de Porto Alegre, mais de uma vez assistira, coelhos resistirem á innoculação pelo virus fixo, interrompendo então assim a série.

Para explicar tal eventualidade, Manouelian suggere varias possibilidades, taes como a destruição do germen ou a sua existencia em pequena quantidade no bulbo não sendo sufficiente para declarar a doença no animal innoculado.

Lembra ainda a possibilidade de ser o animal refractario á doença possuindo immunidade natural. Como os animaes chegados ao Instituto Pasteur, de Paris, acham-se frequentemente em máo estado de conservação, o auctor é obrigado a recorrer á innoculação intramuscular, pois a subdural produziria infecção e morte rapida do coelho ou cobaia injectada.

Julga o auctor que a innoculação intramuscular seja menos segura que a subdural e, para illustrar tal hypothese, relata duas observações em que se tratava de raiva humana, sendo feito, de uma emulsão do bulbo destes individuos innoculações subduraes em coelhos e innoculações nos musculos do pescoço de cobaias. Os coelhos passados 17 dias apresentaram paralytia typica, morrendo dois dias depois. As cobaias nada soffreram, conservando-se mezes após ainda com perfeita saúde.

Destas observações resalta a importancia que tem a via de innoculação para se obter a raiva experimental, não explicando, porém, o facto da mesma por vezes falsear, pois, nas nossas observações alguns coelhos tinham sido innoculados subduralmente pelo virus exaltado ao maximo e os outros haviam sido innoculados tambem pela via subdural com emulsão de bulbo de bovinos mortos de raiva. Taes animaes não apresentaram a minima alteração no seu estado de saúde.

Acreditamos, pois, que nos nossos casos os animaes possuíam immuidade natural contra a doença. Mais uma vez confirmadas vemos as nossas observações com respeito á importancia que tem a pesquisa do corpusculo de Negri no diagnostico da raiva, pois, a despeito dos symptomas clinicos, falhando as provas experimentaes, ficariamos em duvida sobre o diagnostico

se não tivéssemos a certeza de ter encontrado corpusculos de Negri typicos no corno de Ammon dos animaes em questão.



Comparação dos differentes methodos

Para pesquisarmos o corpusculo de Negri recorremos a tres processos e, estudando-os, procuraremos neste singelo e despretençioso trabalho, expondo os resultados colhidos, ao mesmo tempo apreciar comparativamente as vantagens que cada um offerece no seu emprego para o diagnóstico laboratorial da raiva.

O processo chamado de impressão, usado principalmente pelos Americanos, gosando de grande credito neste paiz no diagnóstico da raiva, consiste no seguinte: Em pequeno pedaço de madeira de preferencia porosa ou melhor em uma cortiça, colloca-se uma secção transversal do Corno de Ammon e com uma lamina exerce-se uma ligeira pressão de modo a pôr em realce os contornos do corte. Numa mesma lamina pôdem-se fazer tres impressões, tornando-se assim mais economico e rapido o exame.

Deixa-se seccar e trata-se a lamina assim preparada por uma solução de acido picrico a 1%, durante 2 minutos. Tal solução actúa como mordente fixador. Lava-se bem, e no momento de ser usada prepara-se á parte a seguinte solução :

Agua destillada.....	10 cm. ³
Solução alcoolica saturada de fuchsina.....	V a VII gottas
Solução alcoolica saturada de azul de methylená.....	1 cm. ³

Cobre-se a lamina com esta solução assim recentemente preparada, leva-se ao fogo com as mesmas precauções usadas na pesquisa do bacillo de Koch.

Lava-se novamente a preparação e depois de seccar leva-se ao microscopio.

Os auctores Americanos preferem este methodo devido á sua grande simplicidade e á rapidez com que se póde fazer o diagnostico da doença, gastando-se como tempo de preparação do material, isto é a coloração, mais ou menos meia hora.

Affirmam ainda que por este processo os corpusculos de Negri resaltam melhor á vista, contrastando a sua coloração vermelha intensa com o fundo da preparação que se apresenta corada em azul.

A estructura intima do corpusculo seria então mais visivel por este methodo.

Em nossas preparações pessoas não podemos verificar esta ultima affirmação, pois nas numerosas impressões por nós examinadas o corpusculo de Negri, embora sempre presente, corado em vermelho conforme a descripção acima feita, pareceu-nos que a sua estructura



Corpusculos de Negri corados pelo processo americano

intima era menos evidente do que no processo chamado de Mann.

Apezar deste inconveniente por nós apreciado, em nada altera o seu enorme valor no diagnostico da raiva, principalmente nos casos em que não se dispõe de laboratorios especiaes, sempre precisos para pôr em execução os outros processos. Com um simples microscopio de viagem, alguns vidros de reactivos e uma lampada de alcool achamo-nos aparelhados para diagnosticar a zoonose no proprio local da colheita de material.

Eis pois, a nosso ver, o seu maior valimento, isto é, o ser extremamente pratico.

O segundo methodo descripto por S. Andriani sobretudo empregado pelo auctor para evidenciar o corpusculo de Negri nas preparações de Corno de Amon de animaes mortos de raiva é o seguinte :

Fixam-se durante uma a duas horas na acetona pequenos fragmentos de Corno de Ammon tendo estes a espessura de 3 millimetros mais ou menos.

Incluem-se em seguida estas peças, em parafina depois de terem estado meia hora no xylol e igualmente meia hora no xylol parafina, bem como uma hora na parafina pura.

Em seguida praticam-se cortes em série com a espessura mais ou menos de 5 microns.

Deixam-se seccar na estufa e desembaraçando-se as preparações da parafina pelo xylol

deshidratando-se-a pelo alcool absoluto. Assim preparada mergulha-se a mesma durante 5 a 10 minutos na seguinte solução corante :

Verde de malachita.....	0,20
Alaranjado G.....	2,0
Alcool a 90°.....	10 cm. ³
Agua destillada.....	105 cm. ³

e fazendo-se em seguida actuar, durante dois a tres minutos sem lavar previamente a preparação, a solução seguinte :

Acido chromico.....	0,50
Alumen. de potassa.....	0,01
Agua destillada.....	100 cm. ³

Lava-se durante 20 segundos mais ou menos a preparação na agua corrente, collocando-se-a em seguida no alcool absoluto onde ella perde o excesso de verde e adquire uma côr rosea. Clareia-se emfim pelo xylol, montando-se em seguida a preparação com o Balsamo de Canadá.

As formações de Negri apparecem nitidamente coradas em verde, sobresahindo num fundo representado pelo elemento nervoso que se acha corado em amarello alaranjado.

O protoplasma e os nucleos das cellulas nervosas tomam uma côr alaranjada apreciando-se o nucleo mais intensamente corado que o

cytoplasma. Aprecia-se a nevroglia com uma coloração de amarello desmaiado.

Temos assim um excellente fundo para os corpusculos de Negri e corados em verde sobressahem intensamente do resto da preparação, apresentando-se com suas fórmulas classicas arredondadas ou ovoides.

No seu interior muitas vezes apreciamos vacuolos verde pallido ou refrangentes em cujo interior ainda o auctor diz podermos frequentemente encontrar pequenos pontos brilhantes, o que neste processo corresponde aos corpusculos de Volpino.

O auctor considera este methodo superior aos outros empregados para o mesmo fim, devido á facilidade com que se fixa a preparação e a rapidez e facilidade com que se coram os cortes. Estes assim obtidos são elegantes e se conservam durante longo tempo.

O auctor aconselha usar tal processo quando ha urgencia em fornecer o diagnostico da doença.

Para obtermos preparações bem coradas e nitidas, fomos obrigados a modificar ligeiramente o processo aconselhado pelo auctor. Assim, ao envez de deixar corar sómente 15 minutos pelo primeiro reactivo, deixamos sob a acção do mesmo durante meia hora. As preparações obtidas, seguindo á risca os conselhos do auctor, não se apresentam tão nitidas como seguindo o criterio por nós adoptado.

Fizemos ainda agir, em certas preparações, o primeiro reactivo durante duas, oito e vinte e quatro horas e não encontramos differenças sensiveis; sómente as cellulas e nucleos cellulares se apresentavam corados de côr alaranjada mais intensa.

Os corpusculos não se coram mais intensamente do que quando deixamos agir o reactivo sómente meia hora.

O terceiro e ultimo processo por nós usado foi o de Mann modificado por Manouelian, o qual consiste no seguinte :

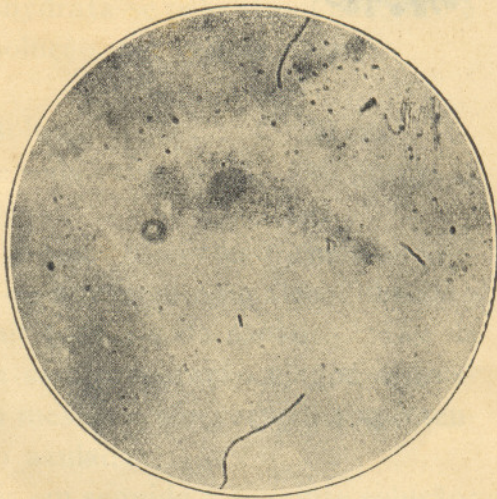
Depois de obtermos pequenos fragmentos de Corno de Ammon dos animaes a examinar, põem-se estas peças no fixador seguinte :

Acetona a 50°.....	50 cm. ³
Tintura de iodo.....	6 gottas

Abandonam-se durante meia hora as peças neste liquido e em seguida passam-se para a acetona pura.

Ao cabo de um quarto de hora póde-se proceder a inclusão na parafina que dura mais ou menos meia hora. Os cortes feitos em série, montados em laminas e seccos a estufa são então corados da seguinte maneira :

Faz-se primeiramente agir durante duas horas em media o reactivo de Mann aquecido a 40° :



Corpusculo de Negri corado pelo methodo de
Mann



Solução aquosa de azul de methylena a 1 %.....	3 cm. ³
Soluç. aquosa de eosina a 1%	45 cm. ³
Agua destillada.....	100 cm. ³

Em seguida lava-se rapidamente n'agua corrente. Deshydrata-se pelo alcool absoluto e faz-se agir a solução que vamos citar :

Alcool absoluto.....	30 cm. ³
Solução de soda caust. a 1 %	10 gottas

Espera-se até que os cortes tornem-se vermelhos. Lava-se novamente no alcool absoluto afim de extrahir toda a soda caustica. Depois disto mergulha-se a preparação n'agua ordinaria, perdendo a mesma a côr vermelha apresentando-se então azulada.

Faz-se agir em seguida a seguinte solução:

Agua destillada.....	40 cm. ³
Acido acetico.....	2 gottas

e immediatamente as preparações tornam-se azues.

Deixa-se neste ultimo liquido, durante alguns minutos, e deshydrata-se-a pelo alcool absoluto. Clareia-se pelo xylol e monta-se a preparação com Balsamo do Canadá.

Por este processo, o fundo da preparação revela-se corado em azul muito claro, o cyto-

plasma das cellulas nervosas em azul mais intenso e os nucleos em azul muito carregado. Sómente os corpusculos de Negri apresentam-se corados em vermelho intenso no interior das cellulas nervosas, apreciando-se nitidamente a sua estrutura alveolar.

Noutras preparações fizemos agir o liquido de Mann durante mais tempo, vinte e quatro horas por exemplo, onbservando então que os corpusculos acima citados apresentavam-se mais ou menos da mesma maneira do que no methodo precedente, quando deixavamos em contacto com o reactivo sómente duas horas.

Não tivemos resultados tão satisfactorios fazendo actuar o liquido de Mann sómente 5 minutos como querem Kolle e Hecht em seu tratado de Microbiologia.

Por este processo os corpusculos não se apresentam tão bem corados como pelo methodo precedente e a sua estrutura intima é menos apreciavel.

Após o estudo deste methodo, podemos dizer que é incontestavelmente o ultimo de technica mais difficil e complicada sendo porém, a nosso vêr, o que fornece preparações mais nitidas, deixando melhor perceber a estrutura intima dos corpusculos o que em geral não se verifica com os outros processos.

CONCLUSÕES

De tudo que acabamos de expôr neste pequeno e despretencioso trabalho, podemos concluir que :

Segundo as pesquisas modernas de Manouelian e Viala, os corpusculos de Negri podem ser considerados como o resultado d'uma degenerescencia dos parasitas da raiva no interior da cellula nervosa.

Que estes corpusculos encontraveis de maneira constante nos individuos infectados pela raiva, e como vimos de mui facil pesquisa, apresentam no diagnostico da zoonose, quando da sua verificação, uma importancia real.

Que quando ha urgencia no diagnostico da raiva é incontestavelmente o methodo Americano que melhor corresponde a tal exigencia, tanto mais quanto o mesmo pela simplicidade de sua technica e singeleza de aparelhagem permite a execução da pesquisa, mesmo na falta de um laboratorio bem montado.

Que o segundo methodo por nós focado, sob o ponto de vista da rapidez de execução, ficaria como que intermediario entre o Americano e o de Mann, sobresahindo todavia a nitidez dos corpusculos no referente á sua coloração, sendo a sua estrutura intima menos visivel que nos outros methodos.

Que embora sendo mais complexó e delicado em technica, o methodo de Mann, é de todos

o que permite ao lado de bellas colorações, apreciar com nitidez absoluta a estructura intima das formações de Negri.

Por ultimo, parece-nos o facto até hoje tão discutido, de certos filtrados de emulsão de substancia virulenta reproduzirem a raiva por inoculação, possa ser explicado pela passagem de certos parasitas extremamente pequenos através dos alludidos filtros.



BIBLIOGRAPHIA

- Adriani — Ann. Inst. Pasteur — 1924.
Babés — Press. med. — 1912 — pag. 898.
Courmont e Panisset — Microbiologia des maladies infectieuses des animaux.
J. Ferré — In. Roger Widal — Teissier.
Kolle et Hetreh — La Bacteriologie Experimentale.
Lafranchi e Lenzi — Soc. Biol. Paris, 1918.
Levaditi Nicolau e Mlle. Schoen — Soc. Biol. Paris, 1924.
Manoueliam e S. Viala — Ann. Inst. Pasteur, 1912.
Manoueliam e S. Viala — Ann. Inst. Pasteur, 1922.
Manoueliam e S. Viala — Ann. Inst. Pasteur, 1924.
Mme. Negri — 1.º Congresso internacional de Path. comparada — Paris, 1912.
Noguchi — Press. med. 913 — N. 73.
Negri-Luzzani — Ann. Inst. Pasteur — 913.
Remlinger — Ann. Inst. Pasteur — 1903.
Remlinger — Press. med. 1918; pg. 82.
Remlinger — Press. med. 1918, pg. 258.