

Guerra Bacteriológica Contra os Hospedeiros Intermediários da Esquistossomose Humana (*)

por

EMMANUEL DIAS

No Posto do Instituto Oswaldo Cruz em Bambuí, Minas Gerais — criado em 1943, por ordem do Diretor Henrique Aragão, com o fim especial de investigar a doença de Chagas e sua profilaxia — foram iniciadas pesquisas sobre esquistossomose, em agosto de 1952. Os resultados de um inquérito preliminar foram comunicados em outubro do mesmo ano (1).

Foram experimentados alguns agentes físicos e químicos contra o *Australorbis glabratus*, mas tais experiências foram depressa interrompidas, sendo iniciadas pesquisas com agentes biológicos. Foram isoladas de caramujos algumas amostras de bactérias, que entretanto não mostraram nenhuma ação contra êsses moluscos.

Admitiu-se então que, se presentes nesses animais microorganismos atual ou potencialmente virulentos, eles poderiam ser mantidos por meio de passagens ininterruptas de caramújo a caramújo, e que talvez sua atividade pudesse ser aumentada através as passagens.

No dia 6 de setembro foram iniciadas três séries de passagens, cada uma com 5 caramújos vivos em 250 cc. d'água; enquanto que a duas delas foram juntadas culturas bacterianas indeterminadas, em uma foi adicionado apenas o triturado de 5 moluscos normais. A princípio, cada três dias os planorbídeos eram macerados em 250 cc. d'água com 5 caramújos vivos procedentes de focos naturais, mas depois as passagens passaram a ser feitas cada dois dias, da mesma maneira, não sendo as culturas adicionadas senão na primeira passagem. Posteriormente, muitas outras séries de passagens foram feitas, sendo notado que algumas eram mais ativas do que outras e que às vezes são observados certos sinais típicos, indicadores da morte próxima dos caramújos. Do ovoteste de moluscos que apresentam tais sinais (retirado após semi-seção da carapaça, sendo o animal e o órgão banhados repetidas vezes em éter), foram isoladas bactérias, cortando-se a extremidade posterior do órgão, tocando-se a superfície de secção em placa de agar e espalhando-se.

(*) Comunicação ao V Congresso de Medicina Tropical e Malária, Istambul, 28 de agosto a 4 de setembro de 1953, com 5 figuras adicionais.

Desde que os gérmenes assim isolados eram aparentemente os primeiros a invadir os tecidos, podia-se supôr serem eles os responsáveis pela morte dos animais nas passagens em série. Tais gérmenes foram cultivados em caldo simples e experimentados no campo contra caramújos, com resultados preliminares que foram considerados muito promissores (2).

A espécie mais frequentemente assim isolada é um *Bacillus* não patogênico, denominado convencionalmente BET (bacilo de espóro terminal), que foi estudado em cooperação com o Dr. Oswaldo Cruz Filho e que é aparentemente uma nova espécie. No momento, parece suficiente informar que se trata de um bacilo Gram variável, móvel, provido de espóro terminal (fig. 1); pleomórfico, aeróbio, mesófilo; proteolítico; indol positivo; não fermenta os hidratos de carbono comuns; acetilmetilcarbinol, negativo; tolerante ao sal; pH ótimo 7,0 a 7,2; não patogênico para vertebrados, mesmo a inoculações maciças.

Um poucas séries continuam a ser mantidas no laboratório, a fim de se procurar aumentar a atividade do BET contra os molúscos.

As primeiras experiencias de campo foram feitas em pequenos poços, devido à falta de material para o preparo de grandes quantidades de cultura. Os resultados foram publicados em parte (2). Observações posteriores mostraram que em 6 poços artificiais em que moluscos vivos foram introduzidos foi obtida uma mortalidade de 100%, bem como em 6 outros poços semelhantes. Quanto aos três primeiros focos naturais tratados, os resultados observados até o momento são os seguintes:

Foco 1 — Volume, 1.466 litros d'água; tratado com 5 litros de cultura.

Após 214 dias, mortalidade de 99,8% (total de mortos recolhidos 4.060 caramújos, ainda vivos 8). Recem-nascidos vivos foram vistos muitas vês, mas morriam em poucos dias.

Foco 2 — Volume 680 litros, tratado com 3,5 l. de cultura: mortalidade de 100% em 59 dias (total de mortos 693). No 69.º dia após o único tratamento, novos caramújos foram introduzidos no tanque, tendo morrido todos no 174.º dia após o tratamento. O bacilo BET foi isolado da água e de caramújos vivos mais de 6 meses depois da aplicação da cultura.

Foco 3 — Volume 260 l., recebeu 7 l. de cultura: 100% de mortalidade no 140.º dia.

O seguinte exemplo mostra que a adição de peptona em pó às culturas, no momento do uso, é bastante eficaz:

Foco 25 — Volume 1.020 l., tratamento com 15 l. de cultura com 1 libra de peptona: 100% de mortos em 12 dias (colônia natural em tanque artificial). Caramújos vivos foram introduzidos no 30.º dia, e no 106.º dia a mortalidade era de 95,1%.

Foi feita a adição de peptona não só porque ela melhora as condições nutritivas do meio, como também porque as proteínas provavelmente não são atacadas pelas bactérias na ausência de traços de peptona. Parece provável que a ação do BET sobre os planorbídeos dependa da elaboração de enzimas proteolíticas.

Devido ao fato de que bactérias proteolíticas foram isoladas de caramújos vivos aparentemente normais, foi feita a seguinte experiencia:

Foco 45 — Volume 185 l. Tratado com 1 kg de peptona mais o macerado de 100 caramújos. Mortalidade total foi verificada no 8.º dia. Novos planorbídeos foram introduzidos no 12.º dia, morreram todos no 17.º dia. De novo introduzidos planorbídeos no 25.º dia, todos mortos no 28.º dia após o único tratamento.

Em dois pequenos focos naturais aos quais foi aplicada peptona pura em pó, todos os caramújos estavam mortos depois de 7 dias, quando foi feita a primeira observação dos resultados.

Também no laboratório a ação letal da peptona em relação aos planorbídeos é facilmente demonstrável, podendo a morte ocorrer em um, dois ou mais dias, conforme a concentração. Por outro lado, a ação do BET puro sobre os caramújos é antes lenta, tardando mesmo até 4 semanas ou mais, sendo os mortos retirados — mas pelo aumento da concentração bacteriana pode obter-se uma mortalidade mais rápida.

Para se comparar o efeito de peptona pura e de peptona com BET contra o *A. glabratus*, foram feitas duas séries de diluições de peptona de 1:100 a 1:102.400 (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 etc.), em volume de 100cc. para cada diluição. Um cc. de cultura de BET foi acrescentado a cada uma das diluições de uma das séries e três caramújos vivos foram colocados em cada vidro de ambas as séries. Ao passo que na série de diluições de peptona com BET todos os molúscos morreram de 2 a 7 dias em todas as diluições, na série com somente peptona, dentro do mesmo prazo, eles morreram só até à diluição de 1:3.200. Nas diluições mais altas de peptona pura a mortalidade total foi observada de 11 a 30 dias. Os caramújos de ambas as séries eram retirados tão cedo quanto possível após a morte.

As duas seguintes experiências mostram que os planorbídeos podem ser mortos de modo muito simples, usando-se apenas água e caramujos.

Foco 16 — Num foco natural em que foi observada elevada mortandade espontânea de caramújos, foram colhidos 81 vivos e deixados em 1 litro d'água da bica. Ao cabo de 3 dias, havendo morrido 36 caramújos, a água com planorbídeos vivos e mortos foi lançada num poço artificial que continha 200 caramújos em 81 litros d'água (2), morrendo todos os animais em 13 dias. Após sua remoção, 100 novos caramújos foram colocados e, na última verificação feita 52 dias depois, só dois molúscos vivos foram encontrados.

Foco 20 — Tal como na experiência anterior, 90 caramújos foram colhidos num outro foco natural e deixados no laboratório, em 1 litro d'água. Em 6 dias morreram 73 deles. A água com todos os molúscos foi então lançada noutro poço artificial, que continha 100 caramújos vivos num volume d'água de 53 litros. Ao fim de 45 dias não restava nenhum molusco vivo e outros 100 foram introduzidos. No 185.º dia após o tratamento apenas se encontraram 3 planorbídeos vivos.

E' provável que os resultados destes dois ensaios teriam sido mais rápidos se à água contendo os caramujos, utilizada para o tratamento, houvesse sido adicionada de peptona e cultura do bacilo.

Experiências em larga escala

Para fins práticos, grandes quantidades de meio de cultura (água de peptona a 1% ou caldo simples) podem ser convenientemente preparadas em tambores de 200 litros de capacidade. Não sendo necessária uma esterilização perfeita, é suficiente aquecer o meio à ebulição alguns minutos, ajustar a reação a 7.2 ou 7.4 e semear abundantemente com uma cultura pura de BET, depois de resfriamento a 50º ou 60º. A incubação a 37º é desnecessária. Boas culturas foram obtidas mesmo sem fervura do meio, somente com moderado aquecimento.

O tratamento de focos grandes pode ser feito mediante simples lançamento da cultura na água, parecendo ser melhor, para isto, o uso de bombas ou aspersores. Represas e grandes poços são melhormente tratados nas margens, no fundo e na vegetação flutuante, quando existe. As valas devem ser tratadas em toda sua extensão. O tratamento de cursos d'água deve ser feito intensivamente em diversos pontos, de preferência nos lugares onde a água é menos movimentada, que são precisamente aqueles que oferecem melhores condições para a pululação dos caramújos; desses lugares as bactérias vão sendo continuamente levadas pela água corrente. Quanto maiores as quantidades empregadas de cultura e de peptona, melhor será, pois não só poderá ser mais rápido o efeito do tratamento sobre as colônias de moluscos, como também aparentemente será mais duradoura a proteção contra a reinfestação. Para tratamentos intensivos, poderão ser empregados 5 a 10 kg de peptona, ou mais, em cada 200 litros de cultura, adicionados no momento do uso. Para tratamento de rotina é dispensável o cálculo dos volumes d'água, desde que se procure obter uma boa contaminação aparente do meio.

Passamos a dar alguns exemplos de focos grandes tratados, de acordo com os resultados disponíveis até o momento.

Foco 19 — No dia 8 de abril de 1953 foi feita a aplicação de 150 litros de cultura com 3 libras de peptona num poço (fig. 3) com cerca de 160.000 litros d'água e numa nascente que o abastece, a pequena distância dele. De 1.º de fevereiro a 7 de abril foram recolhidas no local 4.146 carapaças de planorbídeos para limpeza do foco; de 16 de abril a 30 de julho (112 dias após o tratamento), 14.878 mortos foram apanhados, sendo que na última data apenas 108 vivos foram contados, o que dá uma mortalidade de 99,1%. Muitas vezes foi observada a existência de incontáveis caramujos recém-nascidos mortos, fato este que não ocorria antes do tratamento. Os peixes permaneceram vivos.

Foco 26 — Uma vala em parte canalizada (figs. 4 e 5), com mais de 50.000 litros d'água recebeu em 7 de abril 150 litros de cultura e cinco quilos de peptona. Na ocasião, grande quantidade de caramujos vivos e raras cacas li existiam. De 16 de abril a 8 de agosto (134 dias) recolheram-se 4.311 planorbídeos mortos, sendo encontrados apenas 8 vivos a 8 de agosto de 1953 (mortalidade de 99,8%).

Foco 27 — Trata-se de um grande poço, ou açude (fig. 6), de 60 m. de comprimento por 30 m. de largura, alimentado por três nascentes situadas no fundo e com três saídas d'água, cujo volume foi calculado em 2.181.000 litros, com vazão de cerca de 600 litros por minuto pelas três saídas. Era este o mais intensamente infestado foco de Bambuí, vendo-se por toda parte número colossal de caramújos (na maioria *A. glabratus*), sendo que as margens eram especialmente ricas em recém-nascidos. Durante vários dias antes do tratamento, foi recolhido um total de 10.057 cascas antigas. Muito raros caramújos jovens foram encontrados mortos.

O tratamento foi feito no dia 19 de abril de 1953, sendo empregados 1943 litros de cultura e 15 quilos de peptona. As margens do açude, o fundo e a vegetação sobrenadante foram intensamente aspergidos. Os primeiros caramujos moribundos e mortos foram encontrados no 3.º dia, aumentando diariamente seu número. Foi começada a coleta de mortos no 11.º dia; após a contagem, eram envolvidos em gaze e deixados na água do poço e, depois que se tornaram numerosos, ficaram num tambor (fig. 7) perfurado semi-imerso na água. Isto foi feito para se evitar o desperdício de bactérias dos corpos em decomposição. A estimativa do número de caramujos vivos do foco era impossível no começo, e mais tarde ela foi considerada dispensável porquanto as observações seriam continuadas até o eventual desaparecimento de todos os moluscos. Caso o tratamento viesse a perder a eficácia, perceber-se-ia desde logo a re-população do foco, pois começariam a sobreviver e crescer os caramujos jovens, em vez de morrerem em poucos dias, como se verificava. Os resultados das contagens realizadas até agora são os seguintes:

FOCO 27

N.º de dias após o tratamento	N.º de caramujos mortos coletados	N.º total de mortos
11	942	942
12	1.305	2.247
13	1.558	3.805
14	1.820	5.625
15	2.607	8.232
25	5.406	13.638
41	8.916	22.554
48	7.213	29.767
55	6.914	36.681
62	9.097	45.778
69	11.616	57.394
76	10.901	68.295
83	13.853	82.148
90	7.862	90.010
97	10.563	100.573
104	10.526	111.099
111	13.753	124.852
118	14.771	139.623
125	15.879	155.502

Atualmente, dificilmente se vêem caramújos vivos no açude e os jovens que abundavam antes nas margens desapareceram completamente desde algumas semanas. Deve ressaltar-se que somente foram contados os mortos coletados; muitos outros devem ter morrido sem que fossem achados, especialmente jovens. Os peixes permaneceram vivos.

Um outro fato importante verificado é o de que os molúscos desapareceram dos pequenos cursos d'água que emanam do açude, embora eles não tenham sido diretamente tratados com cultura. Semelhante efeito à distância foi também observado em outros focos d'água corrente. Por muitas vezes o bacilo BET foi isolado de caramújos vivos e mortos do foco, bem como de peixinhos vivos. Além do *A. glabratus*, a ação letal do BET foi também observada em relação a outras espécies de planorbídeos, como *A. bahiensis* (Dunker), *Tropicorbis janeirensis* (Clessin), *Drepanotrema cultratum* (d'Orbigny), *D. cimex* (Moricand), *D. anatinum* (d'Orbigny) e outras.

Considera o autor que os resultados já conseguidos mostram que o combate microbiano aos planorbídeos constitui uma real possibilidade e deve ser tentado por toda parte e contra todas as espécies responsáveis pela transmissão das esquistossomoses humanas.

AGRADECIMENTOS

É com satisfação que o autor agradece: ao Dr. Mário Pinotti, pela constante ajuda e estímulo que dele tem recebido; ao Dr. Arlindo Vieira, pela classificação de caramújos de Bambuí; e ao Sr. J. Hill, pela correção da tradução ao inglês e pelas valiosas sugestões que apresentou.

BIBLIOGRAFIA

DIAS, E.,

1953. Estudos preliminares sobre a esquistossomose mansoni no município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. Rev. Brasil. Malariologia e D. Tropicais, 5 (3): 211-214.

DIAS, E.,

1953. Nova possibilidade de combate aos moluscos transmissores das esquistossomoses. Empresa Editora "O Éco", Bambuí, 22 pp., janeiro de 1953.

TRANSLATION

Bacteriological Warfare on the Intermediate Hosts of Human Schistosomiasis (*)

At a branch of the Institute in Bambuí, Minas Gerais, established in 1943 by order of Director H. Aragão with the special purpose of investigating the control of Chagas' disease, research work on schistosomiasis was started in August, 1952. Results of a preliminary survey were reported in October (1).

Some chemical and physical agents have been tried on *Australorbis glabratus*, but soon these experiments were discontinued and research on biological agents was taken up. A few strains of bacteria were isolated from snails and tried on these animals, with negative results.

Then it was assumed that, by means of uninterrupted passages from snail to snail, actually or potentially virulent microorganisms, if present, would be maintained, and their activity would possibly be increased through passages. On September 6, three series of passages were started, each with 5 living snails in 250 cc of water; to two, undetermined cultures were added, and to one nothing but 5 ground up snails. At first, every three days the molluscs were ground and suspended in 250 cc tap water with 5 fresh snails from natural colonies, later passages were made the same way every two days, but no more bacterial culture was added after the first passage. Later on, many other series of passages were made and it was noticed that some of them were more active than others, and that snails that are about to die sometimes showed certain typical signs. From the ovotestis of such snails

(*) Paper read before the V International Congresses on Tropical Medicine and Malaria, Istanbul, August 28 — September 4, 1953. (With 5 additional figures).

(picked out after transverse semi-section of the shell, the animal and the organ being several times washed in ether), bacteria have been isolated by cutting off the posterior extremity of the ovotestis, pressing the surface of section lightly on agar plate and streaking.

Since the bacteria thus isolated were apparently the first ones to penetrate the host's tissues, they were supposed to be responsible for death of the animals in the series of passages. They were cultivated in ordinary broth and tried in the field, with preliminary results that were considered very promising (2).

The species most frequently isolated is a non-pathogenic *Bacillus*, conventionally called BET (*bacilo de esporo terminal*), which has been studied in cooperation with Dr. O. Cruz Filho and that is apparently a new species. For now it will be sufficient to state that it is Gram variable, motile, and has a terminal spore (fig. 1); pleomorphic, aerobic, mesophylic; proteolytic, indol-forming; does not ferment ordinary carbohydrates; acetyl-methyl-carbinol, negativ; salt tolerant; optimum pH 7.0 to 7.2; not pathogenic for animals even at massive inoculations.

A few series continue to be maintained in order that an increased activity of BET may be obtained.

The first trials in the field were carried out in small pools, for materials necessary for preparing large amounts of culture were not then available. The results have been partially published (2); further observation showed that in 6 artificial pools into which living molluscs were introduced a mortality of 100 percent was reached, as well as in 6 additional similar pools. As to the first three natural foci, results so far are as follows.

Focus 1 — Volume 1,466 litres of water; treated with 5 litres of culture: after 214 days, 99.8% mortality (total dead counted 4,060, still living 8). Living newly born snails were seen many times, but they died in few days.



Fig. 1 — *BET bacillus*

Focus 2 — Volume 680 l., treated with 3.5 l. of culture: 100% mortality after 59 days (total dead 693); on the 69th day after treatment, fresh snails were introduced into the pool and 100% mortality was obtained on the 174th day after treatment. BET has been isolated from water and living snails over 6 months after treatment.

Focus 3 — Volume 260 l., 7 l. culture: 100% mortality on the 140th day.

The following example shows that mixing powdered peptone to cultures at the moment of use is quite effective:

Focus 25 — Volume 1,020 l., 15 l. culture plus 1 pound peptone: 100% mortality in 12 days (natural colony). Fresh snails were introduced on the 30th day and the mortality was 95.1% on the 106th day.



Fig. 2 — *Focus 25*, twelve days after it has been treated with culture and peptone (100% dead snails). Dr. Arlindo Vieira (center) and the writer.

Addition of peptone was made not only because it improves nutrient conditions of the medium, but also because whole proteins are probably not attacked by bacteria unless traces of peptone are present. Probably the effect of BET on molluscs depends upon the elaboration of proteolytic enzymes. Since proteolytic bacteria have been isolated from apparently normal living snails, the following experiment was made:

Focus 45 — Volume 185 l., treated with 1 kg peptone plus 100 ground up snails: 100% mortality in 8 days. Living snails introduced on the 12th day, 100% mortality on the 17th day; again fresh snails introduced on the 25th day, 100% mortality on the 28th day.

Pure peptone was added to two small natural breeding places. All molluscs were dead after 7 days, when the first examination was made. In the laboratory also the lethal effect of peptone upon snails is easily shown, death taking place in one or two days, according to concentration. On the other hand, BET's effect on snails is rather slow, the bacillus taking some-

times even 4 weeks and more to kill all the snails, if the dead ones are removed as soon as they die. But this process can be speeded up by increasing the concentration of bacteria.

In order to see the effect of pure peptone and of peptone plus BET upon *A. glabratus*, two similar series of dilutions, of 100 cc each, were made with peptone, from 1:100 to 1:102,400 at 50% intervals. In one of these series 1 cc of BET culture was added to each dilution. Three snails were placed in each flask of each series. In the peptone plus BET, they died in 2 to 7 days at all dilutions, but in the peptone alone this occurred only up to dilution of 1:3,200; higher dilutions taking from 11 to 30 days to kill all the snails, which were removed as soon as they died.

The following two experiments show that snails may be killed very simply, using nothing but water and snails:

Focus 16 — 81 living snails were collected from a breeding place in which a high rate of spontaneous mortality had been observed, and were placed in 1 litre of tap water. They were kept in the laboratory for three days, when 36 of them were dead. This litre of tap water containing 36 dead and 45 living molluscs was then added to an artificial pool containing 200 snails in 81 litres of water (2). At the end of 13 days all snails were dead. They were removed from the pool and 100 fresh snails were added. After 52 days only two living snails were found.

Focus 20 — 96 snails were collected from another breeding place and were kept in the laboratory in 1 litre of tap water as before. At the end of 6 days 73 of them were dead. This tap water plus the 90 snails was then thrown in an artificial pool containing 100 snails in 53 litres water. At the end of 45 days all the molluscs were dead. Of 100 fresh snails which were then added only three remained alive on the 185th day after treatment. These results would probably be improved if peptone and culture were added to the water containing the snails.

Large scale trials

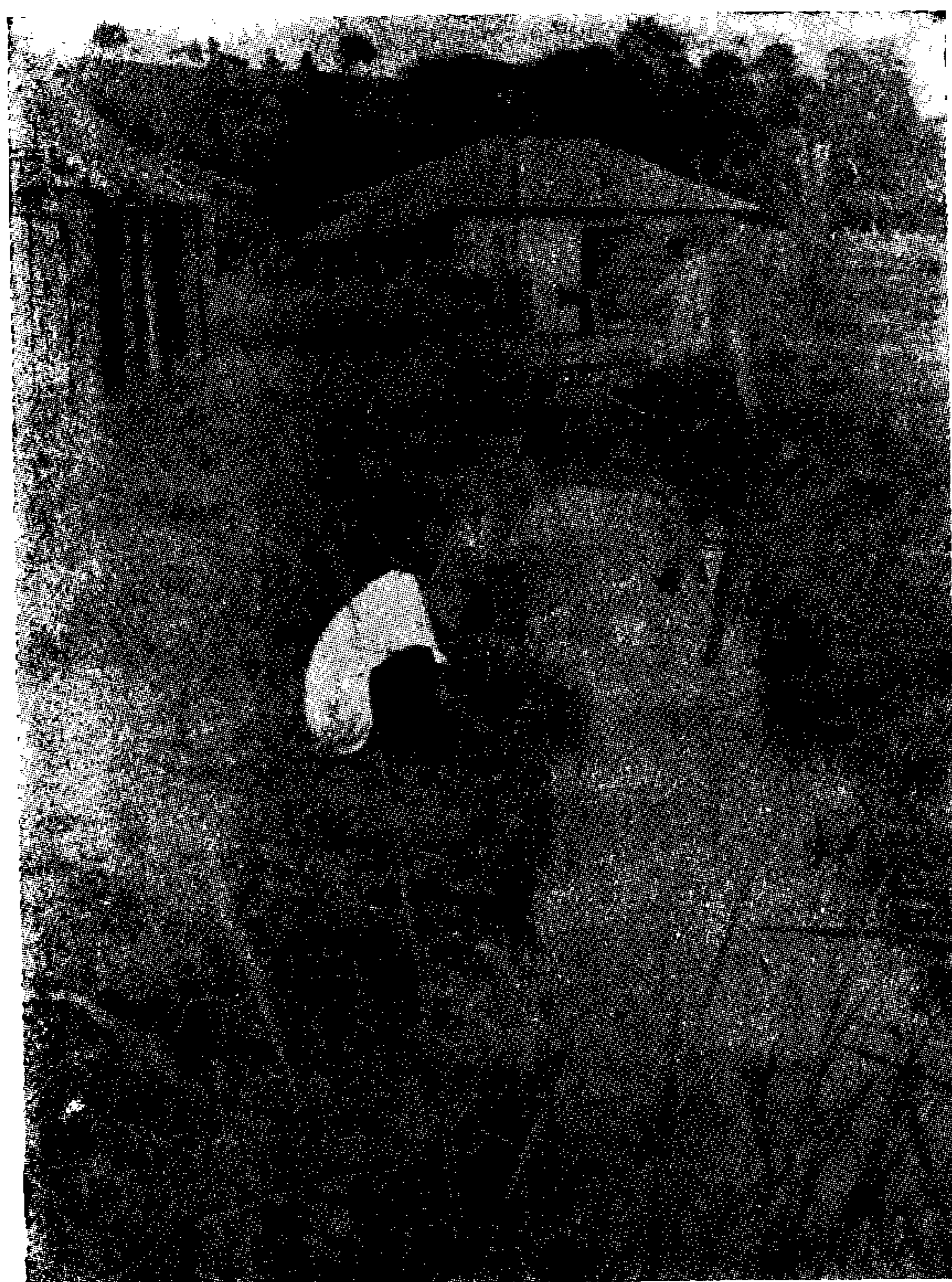
For practical purposes, large amounts of culture media (ordinary 1% peptone water or meat extract broth) may be conveniently prepared in drums of 200 l. capacity. Since perfect sterilization is not necessary, it is sufficient to boil the medium for a few minutes, then adjust pH to 7.2 to 7.4 and inoculate heavily with pure BET culture after cooling to 50 or 60°; incubation at 37° is not necessary. Good cultures have been made even without boiling the medium, just with moderate heating.

Treatment of large breeding places can be made by simply pouring the culture into the water but it is better to use water pumps or sprayers. Dams or large pools are best treated at borders, on the bottom and on the floating vegetation, if any. Ditches are treated all the way along. Streams should be heavily treated at several spots where there is more or less stagnant water, where conditions are most favorable for the breeding of snails; from such spots, bacteria keep continuously spreading into running water. The more culture and peptone that are used, the better, for not only will the colonies of molluscs be more quickly eradicated, but effective protection against re-infestation will apparently last longer. For intensive treatments, 5-10 kg or more of powdered peptone may be dissolved in each 200 l. drum of culture, just before use. For routine treatments calculation of water volumes is not necessary, provided the water is well infected.

A few examples of treated foci will now be given, from the results so far obtained.



Fig. 3 — Focus 19



Figs. 4 and 5 — Focus 26



Fig. 6— *Focus 27 on April 19th, 1953 while being treated*



Fig. 7 — *Barrel containing nearly 125,000 shells from Focus 27 (August, 1953)*

Focus 19 — A pond of 160.000 l. capacity, and the nearby spring from which it was fed were both treated on April 8, 1953 with 150 l. of culture and 3 pounds of peptone. Previously 4,146 shells were collected in 70 days, from February 1st to April 7th. But from April 16th to July 30th, 112 days after treatment, 14,878 dead snails were collected, and on July 30th only 108 living ones were found, a mortality rate of 99.1%. On several days innumerable dead young snails were observed, a fact that did not occur before treatment. The fish were all alive. (Fig. 3).

Focus 26 — A stream and a canal (fig. 4 and 5) with over 50.000 l. of water were treated on April 7th (150 l. culture and 5 kg peptone); very few shells and plenty of living snails were seen. From April 16 to August 8 (134 days), 4,311 dead were counted and only 9 were found alive on August 8 (99,8% mortality).

Focus 27 — A large pool (fig. 6), 60 m long and 30 m. wide, with an estimated capacity of 2,181,000 l., which was fed from 3 springs, had 3 outlets; the total loss of water from all three outlets was about 600 l. per minute. This was the most heavily infested focus at Bambui, and large numbers of snails, mostly *A. glabratus*, were seen everywhere, the edges especially being rich in newly hatched ones. For several days before treatment, old empty shells were collected, a total of 10,057 being obtained. Very few young snails were found dead. Treatment was carried out on April 19th, 1953 with 1,943 litres of culture in which a total of 15 kgms of peptone were dissolved. The borders of the pool, the peripheral water, bottom and floating vegetation were heavily sprayed. The first dead and dying snails were seen on the 3rd day and their numbers increased daily. On the 11th day the collecting of dead ones was begun; after being counted they were wrapped in gauze and left in the water. Then they became numerous and they were placed in a drum (fig. 7) pierced by a large number of small holes. This was done in order not to waste microbes from the dead bodies. Estimation of living snails was impossible at the beginning and later on it was considered to be unnecessary since the observations would be continued until no more living or dead snails were found; and if the treatment ceased to be effective, repopulation would soon be noticed, since the young snails would remain alive and would mature instead of dying in a few days. The results so far are as follows:

FOCUS 27

Nr. days after treatment	Nr. collected dead snails	Total dead snails
11	942	942
12	1,305	2,247
13	1,558	3,805
14	1,820	5,625
15	2,607	8,232
25	5,406	13,638
41	8,916	22,554
48	7,213	29,767
55	6,914	36,681
62	9,097	45,778
69	11,616	57,394
76	10,901	68,295
83	13,853	82,148
90	7,862	90,010
97	10,563	100,573
104	10,526	111,099
111	13,753	124,852
118	14,771	139,623
125	15,879	155,502

Living snails are now difficult to find in the pool, and the young ones that existed before in large numbers at the edges have entirely disappeared for several weeks. It should be borne in mind that only the collected snails have been counted, so many more must have died that have not been found, especially small ones. The fish all remain alive. Another important fact is that the snails also disappeared from the streams that arise from the pool, although they had not been treated directly. This effect at a distance in running water has also been observed in other treated foci. BET has been isolated many times from dead and living snails from the pool, as well as from the water and from living fish. Besides *A. glabratus*, the lethal effect of this bacterium has also been observed in other molluscs, such as *A. bahiensis* (Dunker), *Tropicorbis jancirensis* (Clessin), *Drepanotrema cultratum* (d'Orbigny), *D. cimex* (Moricand), *D. anatinum* (d'Orbigny) and others.

It is considered that the results so far obtained show that the bacteriological warfare on snails is a real possibility. It should be tried everywhere and on all species that are responsible for the transmission of human schistosomiasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Dr. Mario Pinotti for his help and encouragement during the course of the experiments, Dr. Arlindo Vicira for the classification of snails and Mr. J. Hill for his assistance with the translation and for his valuable suggestions.

BIBLIOGRAPHY

Turn back to end of Portuguese text.