

DA PREPARAÇÃO LABORATORIAL
DAS VACINAS ANTIGONOCÓICAS

166/1 FMP

FACULDADE DE MEDICINA DO PÔRTO

Da Preparação Laboratorial das Vacinas Antigonocóccicas

Trabalho do Laboratório Médico do Prof. Alberto de Aguiar

DISSERTAÇÃO INAUGURAL

DE

Vicente de Paulo de Moura Coutinho de Almeida de Eça



PÔRTO - 1915

166/1 FMP

Typ. a vapor da Casa do Povo
Rua de Camões, 360 — Porto.

Faculdade de Medicina do Porto

DIRECTOR

Cândido Augusto Correia de Pinho

PROFESSOR SECRETÁRIO

Alvaro Teixeira Bastos

CORPO DOCENTE

Professores Ordinários e Extraordinários

- 1.^a classe — Anatomia . . . { Luis de Freitas Viegas
Joaquim Alberto Pires de Lima
- 2.^a classe — Fisiologia e His- { António Plácido da Costa
tologia { José de Oliveira Lima
- 3.^a classe — Farmacologia . . Vaga
- 4.^a classe — Medicina legal e { Augusto Henrique de Almeida Brandão
Anatomia Patológica . . { Vaga
- 5.^a classe — Higiene e Ba- { João Lopes da Silva Martins Júnior
cteriologia { Alberto Pereira Pinto de Aguiar
- 6.^a classe — Obstetria e Gi- { Cândido Augusto Correia de Pinho
necologia { Alvaro Teixeira Bastos
- 7.^a classe — Cirurgia . . . { Roberto Belarmino do Rosário Frias
Carlos Alberto de Lima
António Joaquim de Souza Júnior
- 8.^a classe — Medicina . . . { José Dias de Almeida Junior
José Alfredo Mendes de Magalhães
Tiago Augusto de Almeida
- Psiquiatria António de Souza Magalhães e Lemos

Professores jubilados

José de Andrade Gramaxo
Pedro Augusto Dias
Maximiano Augusto de Oliveira Lemos

A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas
na dissertação e enunciadas nas proposições.

(Regulamento da Faculdade de 23 d'abril de 1840, art. 155.º)

A meus queridos Pais

a E.

*“Nom qu'on peut dire seulement
à genoux”.*

VICTOR HUGO.

A meus queridos Irmãos

e em especial ao António

.....
AOS MEUS

Ao meu particular Amigo e Condiscípulo

Francisco Augusto de Souza Sanches

AOS MEUS AMIGOS

Aos meus Condiscípulos e Contemporâneos

Ao Dr. Carlos Ramalhão

Ao Ilustre Corpo Docente

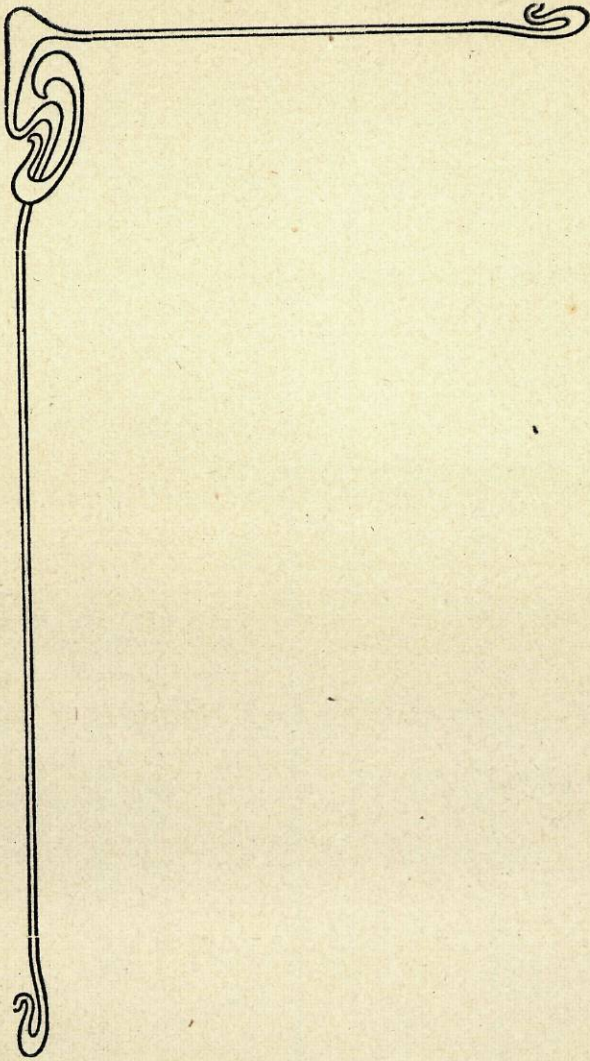
DA

Faculdade de Medicina do Pôrto

Ao Meu Ilustre Presidente

o Ex.^{mo} Senhor

Prof. Dr. Alberto Pereira Pinto de Aguiar



PRÓLOGO

*De todos os métodos terapêuticos preconizados até hoje para o tratamento das doenças infecciosas, nenhum mais do que a **Bacterioterapia** — ou **Vacino-terapia** como o uso consagrou, — tem agitado o espírito dos sciêntistas. Assentando sobre um princípio teórico sedutor, desde Wright que vem dando as suas provas práticas, e hoje, pode dizer-se afoitamente que a **Vacino-terapia** entrou definitivamente no domínio da clínica. Assim é que, é já de uso corrente mesmo entre nós, o emprego de vacinas anti-tíficas, anti-stafilocócicas, anticólicas, etc., e se se não generalizou ainda este uso relativamente a outros agentes microbianos, resulta isso, exclusivamente, da dificuldade maior em preparar as suas vacinas quer pela fragilidade das culturas, quer pela sua toxicidade que não foi ainda possível retirar-se-lhes em absoluto. É justamente o que tem sucedido com o **Gonococo**. Existe, é certo, no mercado um bom número de **Vacinas Antigonocócicas** de mais diversa origem. Todavia, dizem os experimentadores e nós próprios, que, tendo conhecido uma vacina inglesa (Wellcome), a francesa de Nicolle e o Gonargim alemão — o constatámos, que se os resultados curativos se mostram quasi sempre evidentes, não deixa isso de ser por vezes à custa de intensas reacções.*

Donde logicamente se conclui, que, talvez por deficiência de técnica, não foi ainda possível eliminar em absoluto a toxicidade das Vacinas Antigonocócicas, quer dizer, não existe ainda uma Vacina antigonocócica completamente atóxica.

O problema da preparação duma vacina atóxica estava, pois, em aberto.

Tendo de apresentar um trabalho original para completar o nosso curso, o problema era demasiado palpitante para nos não tentar, a nós que desde ha alguns anos vimos acompanhando com interesse a evolução da Vacinoterápia antigonocócica.

Não se vá, porém, julgar que uma louca vaidade nos tivesse cegado a ponto de não reconhecermos a enorme dificuldade do assunto que nos propúnhamos versar, e de não sentir a modéstia dos nossos recursos científicos. Não.

Logo, desde o começo reconhecemos uma e sentimos a outra, e teríamos certamente desistido do nosso intento, se a nossa proposta não tivesse tido tam benévolo acolhimento da parte do Ex.^{mo} Snr. Prof. Dr. Alberto de Aguiar, o eminente homem de ciência, brilho duma Faculdade e honra da nossa Terra, que não só pôs à nossa disposição o seu magnífico laboratório, onde realisámos a maior parte dos nossos tra-

balhos, mas ainda os seguiu e nos valeu em mais de uma circunstância com o seu mui sábio conselho.

Ao mesmo tempo obtivemos o auxílio do Dr. Carlos Ramalhão, talentoso 1.º assistente de Bacteriologia, que possuindo um notavel conhecimento da técnica laboratorial, e tendo já preparado Vacinas antiestafilocócicas e antitíficas, nos orientou e nos guiou em todos os trabalhos.

¿ Com tam poderosissimo auxílio como não havíamos de persistir e de vencer?

Assim é que, devemos dizê-lo, desde que iniciámos os nossos estudos até que os finalizámos, não tivemos um só momento de desânimo como não tivemos a menor hesitação de sacrificio de tempo e de trabalho. Bem pelo contrário, o nosso ardôr foi sempre **em crescendo**, ao vermos realisada a nossa íntima aspiração. É que um **nobre incentivo** alimentara o fogo sagrado do nosso entusiasmo — o de contribuir, embora modestamente, para a preparação de uma **Vacina antigonocócica absolutamente atóxica** e de reivindicar para a nossa terra a honra de a haver obtido pela primeira vez.

Nós julgamos que, a não ser algumas notas dispersas pelas revistas sciêntíficas estrangeiras, nada mais existe publicado ácerca propriamente do assunto da nossa tese — *Preparação laboratorial das vacinas antigonocócicas.*

Assim, é licito supôr que alguma coisa de útil dela possa resultar.

Todavia se tal não succeder, já nos damos por muito satisfeitos em ter concorrido para a preparação da 1.^a *Vacina Antigonocócica portugueza*, em a ter ensaiado e apresentado.

A nossa consciência exige que aqui deixemos significado o reconhecimento que devemos àqueles que mais directamente contribuíram para o feliz resultado dos nossos trabalhos.

Ao nosso ilustre Presidente, o Ex.^{mo} Snr. Prof. Dr. Alberto de Aguiar, por quem temos a mais funda admiração pelas suas qualidades de character como homem, pela sua proficiência como professor e pelo seu muito saber como sciêntista, — o preito da nossa mais respeitosa homenagem e gratidão.

Ao Dr. Carlos Ramalhão, o infatigavel estudioso cujo talento só é excedido pela sua modéstia, a quem

se deve a preparação das primeiras vacinas portugêsas, e a quem nós devemos tudo o que de interesse e útil possa haver neste trabalho, o nosso imperecível agradecimento.

Aos Ex.^{mos} Directores do Hospital Militar do Porto, os ilustres clínicos Drs. Júlio Cardoso e Joaquim Valente que permitiram a nossa entrada nas enfermarias daquele Hospital onde fizemos principalmente a nossa clínica vacinal, e a todos os Ex.^{mos} Clínicos do mesmo Hospital e do de Santo António que facilitaram as nossas *Observações*, os protestos da nossa indelével gratidão.

Dividimos o nosso trabalho em 3 partes:

Na 1.^a—**O Gonococo de Neisser**— estudamos os caracteres gerais deste agente, que mais directamente influem na preparação das vacinas. Compreende-se que, para preparar uma vacina dum certo agente microbiano, seja absolutamente indispensavel conhecer de perto, familiarisarmo-nos no laboratório com os seus caracteres fisicos e suas condições de vida. Assim, este capitulo não é uma mera transcrição do que dizem os tratados, mas sim os resultados dos estudos

que realisámos no Laboratório, com o fim de nos habilitarmos a entrar na preparação prática das vacinas.

Na 2.^a parte — **Vacinas Antigonocólicas** — entramos propriamente na técnica geral da preparação das *Vacinas Antigonocólicas*, indicando os métodos e processos que tem sido utilizados para realizar as diversas operações, descrevendo-os tal como os executámos, discutindo as suas vantagens e inconvenientes, e finalmente, apresentando aquêles que preferimos por mais fáceis, mais rápidos e mais exactos.

Como é de supôr, esta parte que constitui mais propriamente o fim que nos propuzemos atingir com este trabalho, foi a que nos mereceu maior desenvolvimento.

Na 3.^a parte — **Parte clínica** — apresentamos as **Observações** referentes ao emprego das nossas vacinas e as conclusões a que chegámos.

PRIMEIRA PARTE

O GONOCOCO DE NEISSER

CAPÍTULO ÚNICO

O Gonococo de Neisser

ESTUDO SUMÁRIO DOS SEUS CARACTERES MORFOLÓGICOS,
DE CULTURA E BIOLÓGICOS

O gonococo é o agente específico das manifestações blenorragicas. Assim, não só o encontramos, puro ou associado a outros micro-organismos, nas uretrites agudas ou crónicas, mas em todas as suas complicações: orqui-epididimites, prostatites, cistites, nefrites, vaginites, bartolinites, metrites, salpingites, ovarites, peritonites, rectites, artrites, endocardites, abscessos piémicos, ... e ainda nas conjuntivites blenorragicas e suas complicações: irites, queratites ...

E' perfeitamente intuitivo, que quem desejar preparar, isolar e conservar culturas puras de um determinado agente, necessita absolutamente conhecer não só os seus caracteres morfológicos, mas sobretudo os seus caracteres biológicos, isto é, as suas condições de vida, e os seus caracteres de cultura.

Do seu estudo prático, perfeitamente indispensável, tiram-se os maiores ensinamentos para nos sabermos conduzir.

Compreende-se, pois, que nós, antes de procedermos à preparação das vacinas antigonocócicas que envolve um certo número de delicadas operações, nos detivéssemos um pouco a estudar o gonococo que é, certamente, um dos agentes microbianos — mais difíceis de cultivar e conservar, e de vitalidade mais frágil.

O nosso estudo recaiu principalmente sobre os caracteres morfológicos, biológicos e de cultura. Eis do que, em seguida, vamos tratar.

Caracteres morfológicos

a) FORMA — E' bem conhecida a forma clássica com que se apresenta o gonococo no pus blenorragico ou nas suas culturas frescas — como um diplococo em forma de grão de café, tendo a concavidade dum voltada para a concavidade do outro. Todavia, o micrococo de Neisser, fácilmente degenera sobretudo quando é cultivado em meios impróprios, tomando então variadas formas de involução, degenerativas.

No pus e secreções blenorragicas ainda o gonococo apresenta dados morfológicos que nos habilitam não só a indentificá-lo, mas ainda a reconhecer o gráu da infecção: êstes dizem respeito às relações do micróbio com os leuco-

bitos. Assim, no começo da infecção o gonococo, ainda raro, é extracelular, num período agudo intenso torna-se intracelular, e no regresso da infecção ou nos casos crônicos, volta a ser extracelular, mas neste caso, dispõe-se em *amas* muito característico, na proximidade dos leucocitos;

b) COLORAÇÃO — O gonococo toma, como se sabe, intensamente as côres das soluções de anilina. Assim, é facilmente corado pelo azul de Loeffler, pelo de Kühne, pelo de Metileno, pelo violeta de genciana, fucsina fenicada, etc. Todavia, o carácter mais importante e o que o distingue **inconfundivelmente**, segundo asseveraram os tratadistas, das outras espécies similares, é o de não tomar o Gram. E tanto que se diz axiomáticamente: **Todo o diplococo intracelular ou em *amas*, com a forma de grão de café, que não toma o Gram, é um gonococo.**

Nós, que tivemos ocasião de fazer algumas centenas de exames microscópicos de secreções purulentas de vária origem — uretrais, vaginais, uterinas, oculares... — não só para a preparação das nossas vacinas mas ainda para indicar e conduzir as observações cujo conjunto constitui a parte clínica — Terceira parte. — do presente trabalho, notámos que em certos casos o gonococo não é descorado pelo Gram. Esta asserção não passaria de uma audaciosa e estulta *boutade*, se não tivesse a explicá-la e a compro-

vá-la, um conjunto de factos de observação pessoal, que seguidamente apresentamos.

Em março passado, tivemos ocasião de observar um adulto do sexo masculino portador duma conjuntivite purulenta cuja história, marcha clínica e natureza indicavam claramente ser de origem blenorragica. Procedendo cuidadosamente à colheita do pus conjuntival e à respectiva análise bacteriológica, esta revelou a existência de **numerosos diplococos em grão de café, intra e extra celulares, mas que não eram decolorados pelo Lugol**, o que nos fez pôr de parte a suspeitada causa etiológica da lesão. Nós que iniciávamos o estudo dos efeitos terapêuticos das vacinas que tínhamos preparado, perante a negatividade da análise, relativamente ao gonococo, abstinémo-nos de as empregar, do que, seja dito de passagem, nos viemos a arrepender.

A obs. VII diz respeito a um indivíduo portador duma blenorragia crónica a quem tinha sido feita por um especialista a análise do pus que **revelou gonococos**. Passado pouco tempo este doente procurou-nos para ser tratado pela Bacterioterapia.

Procedemos à colheita e análise do pus uretral, como de resto fizemos sempre antes de iniciar o tratamento vacínico, e ficámos surpreendidos ao encontrar **numerosos diplococos absolutamente semelhantes ao gonococo de Neisser**, mas que tomavam o Gram. A bacterioterapia

—injecções de culturas de gonococos mortos, emulsionadas— mostrou-se neste doente, notavelmente eficaz.

Nas obs. XIV e XVI trata-se de 2 casos de blenorragias crônicas em que, várias análises feitas revelaram sempre, como acima, a **existência dum agente microbiano parecido extraordinariamente com o gonococo, mas que tomava o Gram.** Ensaçada a bacterioterapia, mais uma vez se mostrou eficaz no doente A. T. enquanto que no C. T. teve como efeito melhorá-lo apenas.

Finalmente, nas obs. XXX e XXXI apresentamos duas crianças portadoras de vulvo-vaginites blenorragicas. A natureza blenorragica da lesão não pôde pôr-se em duvida, porque, tratando-se dum caso médico-legal em que as duas crianças foram contagiadas por um indivíduo do sexo masculino portador dum corrimento purulento uretral, lhes foi feita a colheita do pus e respectiva análise pelo Prof. Alberto de Aguiar, **revelando a existência de gonococos em todos os três casos.**

Pois bem. Estas crianças foram tratadas durante mais ou menos 1 mês na consulta J do Hospital de Santo António com lavagens de permanganato de potássio sem conseguirem curar-se. Foi então que nós nos propusemos empregar as nossas vacinas portuguesas, para o que começámos por fazer a investigação do gonococo no pus vaginal de cada uma das doen-

tes. Com justificada admiração da nossa parte, a análise bacteriológica revelou-nos a existência de numerosos gonococos intra e extra celulares, em *amas*, não tomando o Gram, no pus da A. S. J., enquanto que no da M. R. P. apareciam numerosos diplococos com a forma clássica do gonococo, em *amas* juxta-celulares mas tomando o Gram.

Êste contraste absolutamente nítido entre as análises de 2 amostras de pus, macroscopicamente idênticos, fez-nos repetir por várias vezes o exame, mostrando-se o resultado sempre constante. Ensaiado o tratamento pelas injeções de gonococos mortos, mais uma vez os seus efeitos curativos se manifestaram duma maneira irrefutável.

Em muitos outros casos em que o exame clínico indicava tratar-se dum processo blenorágico, o exame bacteriológico não revelou mais do que diplococos suspeitos, porém, nestes, a bacterioterapia, embora mostrando-se activa, não foi dum efeito tam rápido como nos que apresentamos.

Eis os resultados das nossas observações.

¿ Como explicar, porém, o caso?

As considerações várias que a questão nos sugere, por qualquer ponto que a encaremos, levar-nos-iam longe e far-nos-iam sair fora do assunto que neste modesto trabalho nos propusemos tratar. Entretanto, não podemos dei-

xar de apresentar algumas reflexões que expliquem o que mais acima deixamos dito.

‡ Tratar-se-á dum defeito de técnica, ao estender ou corar a preparação, ou da existência real dum agente microbiano absolutamente semelhante nos seus caracteres morfológicos ao gonococo de Neisser e diferindo dele unicamente **em tomar o Gram**, ou ainda duma das apregoadas raças do gonococo?

Quanto à 1.^a objecção é insustentável desde que se considere que os resultados foram absolutamente constantes repetindo numerosas vezes o mesmo exame.

Pelo que diz respeito à 2.^a, basta atentar nas obs. XXX e XXXI para reconhecermos que lhe falta fundamento seguro. Depois, temos a ajuntar o argumento da positividade do tratamento pelas vacinas **preparadas com gonococos**.

Isto, apesar de não ignorarmos que várias comunicações sôbre a existência dum **pseudo-gonococo que toma o Gram**, tem sido apresentadas às sociedades científicas.

Quanto á 3.^a objecção, ainda a não consideramos suficientemente fundamentada, para a aceitarmos, embora alguns autores, atendendo ao que se passa, por exemplo, com o estafilococo ou com o estreptococo, que apresentam diferenças de raças, indiscutíveis, escrevam que **tudo leva a crer que com o gonococo se dê o mesmo**.

Demais, temos ainda uma razão para não aceitar a tam apregoada existência de diferen-

ças de raças de gonococos e vem a ser um facto da nossa experiência pessoal: — **uma vacina monovalente** (preparada com uma cultura de gonococos de qualquer origem) **pode ter propriedades curativas tam notáveis como uma vacina polivalente ou melhor, polimicrobiana.**

Relativamente ao «Sinococo» — **coco tomando o Gram e desprovido de toxicidade** — que Nicolle e Blaizot viram **acompanhar sempre o gonococo**, temos a confessar que nunca o identificamos em nenhuma das nossas culturas.

Depois do que deixamos dito, relativamente à interpretação a dar à asserção, que acima apresentámos, não podemos deixar de emitir a nossa maneira pessoal de explicar o caso.

Nós pensámos, embora isto não passe da teorização dum facto que não pudémos até agora explicar, — **que o diplococo muito semelhante ao gonococo, mas tomando o Gram, que encontrámos por várias vezes, não é mais do que o proprio gonococo de Neisser que por circunstâncias especiais que nos escapam, se tornou Gram-resistente ou melhor Lugol-resistente.**

Para cimentar esta maneira de pensar, exigiam-se, estudos muito mais aprofundados, que não só não estão no nosso programa, mas necessitavam dum tempo de que infelizmente não dispomos.

Tratando o assunto, foi nosso propósito único mostrar uma das indicações da vacinoterapia antigonocócica.

Caracteres biológicos

Sabe-se dos tratados e conhece-se pela experiência a extrêma fragilidade do gonococo de Neisser, à acção dos agentes físicos e químicos. Todavia, esta sensibilidade não exclui dum modo absoluto a possibilidade de o conservar. Não. O gonococo é susceptível, como qualquer outro agente, de passar por todas as operações necessárias para se obter uma boa vacina, desde que, conhecidas as condições óptimas da sua vitalidade, as respeitemos e favoreçamos.

Façamos, pois, um breve estudo sobre as condições de vida do gonococo, dizendo aquilo que das nossas experiências concluimos.

O micrococo de Neisser é sobretudo sensível à acção da dessecação, do calor, do frio, do ar, dos antissépticos e das exotoxinas.

a) **DESSECAÇÃO** — Colocâmo-la em primeiro lugar, porque, na verdade, o gonococo lhe é particularmente sensível. A **privação de humidade é para o gonococo absolutamente fatal**. Assim, abandonado ao ar e às condições do meio ambiente do laboratorio morre em pouco tempo (20 a 30 minutos) e para o cultivarmos e conservarmos exigem-se meios de cultura mais ou menos **húmidos**.

b) **AR** — Relativamente à acção do ar, dizem os tratados que o gonococo é exclusivamente

aeróbio. Sucede, porém, que tem sido possível cultivá-lo no vacuo em meios apropriados (1) Assim, êle é facultativamente anaeróbio.

c) FRIO — Pelo que diz respeito à acção de baixas temperaturas, também o gonococo era considerado incapaz de conservar a sua vitalidade depois da permanência de 1 hora na geleira a 0°. Estudos recentes vieram mostrar que ainda neste caso a qualidade do meio influia duma maneira capital na sensibilidade do agente, pois que conseguiu-se conservar-lhe todas as suas propriedades, depois de uma acção de — 37° C. durante 10 dias. (2)

d) CALOR — O gonococo suporta muito mal a acção do calor. Não se desenvolve, em cultura, acima de 42°; e a acção da temperatura de 45° c. durante 1 hora, é suficiente para destruir completamente a sua vitalidade. A 50° morre rápidamente, em 5 a 10 minutos.

(1) M. M. Auguste Lumière et Jean Chevrotier. «Quelques considérations nouvelles à propos des cultures de gonocoques». C. R. Acad. Sciences de Paris. T. CLVIII. 4 Mai 1914. Pg. 1287.

«L'Avenir Médical» 11.º année n.º 6. Pg. 2545.

(2) it. «Sur la résistance du Gonocoque aux basses températures». C. R. Acad. Sciences de Paris. T. CLXIII. 12 Janvier 1914. Pg. 139.

«L'Avenir Médical». 11.º année. N.º 2. Pg. 2463.

e) **ANTISSÉPTICOS** — São para o microorganismo que vimos estudando absolutamente fatais.

d) **EXOTOXINAS** — Notava-se que as culturas de gonococos se conservavam mal, sendo necessario para as conservar, renová-las frequentemente por repicagens. Experiências várias demonstraram que a substância nociva que dificulta a conservação das culturas e as torna muitas vezes estéreis, é constituída por um producto de oxidação das exotoxinas segregadas pelo próprio agente. ⁽¹⁾

Caracteres de cultura

O gonococo é um dos microorganismos que mais exigentes se mostram para se cultivar em meios nutritivos artificiais. Não se desenvolve nos meios habitualmente empregados no laboratório, tais como caldo, gelose, gelatina, etc., **necessita de meios mixtos, de composição muito complexa.**

A grande dificuldade em cultivar o gonococo tem incitado um grande número de microbiologistas a procurar meios favoráveis ao seu

(1) M. M. August Lumière et Jean Chevrotier «Sur la vitalité des cultures de gonocoques». C. R. Académie Sciences. T. CLVIII 15 Juin 1914 pag. 1820.

«L'Avenir Medical» 11.º année n.º 7 pag. 2567.

desenvolvimento. Assim, o sôro humano (Wertheim, Bum), o sôro de animais (Wassermann, Christmas...), serosidades orgânicas patológicas, tais como líquido ascítico (Kiefer), quístico (Menge), pleurítico (Heiman), orquítico (Kraal), o sôro de leite (Sabouraud) a albumina do ovo (Besredka), o môtto de cerveja (Lumière) e muitas outras substâncias, cuja enumeração nos levaria longe, empregadas como *base* e associadas à gelose, à glicerina, a peptonas, açúcares, ureia e variados caldos, tem sido até hoje, sucessivamente utilizadas para a cultura do gonococo.

De todos êstes meios, preparámos e dirigimos particularmente o nosso estudo sôbre os que tem como base serosidades orgânicas patológicas, e ainda sôro de leite, albumina do ovo e môtto de cerveja, tendo-nos ficado a convicção de que os primeiros — **base-serosidades patológicas, isto é, albumina orgânica são os que mais conveem**, reconhecendo entretanto aos restantes, magníficas qualidades.

De todos êstes meios, uns são exclusivamente semi-sólidos (1), outros são facultativamente líquidos ou semi-sólidos segundo se lhes adiciona caldo ou agar-agar.

¿ Quais dêstes, porém, semi-sólidos ou lí-

(1) Mixtos ou sólido-líquidos como lhe chamam alguns autores (Miquel, Nicolle).

quidos, são mais favoráveis ao desenvolvimento do gonococo?

Pelo que nós próprios tivemos ocasião de observar durante os nossos estudos no laboratório, podemos tirar as ilações seguintes:

a) O gonococo vive indiferentemente nos meios líquidos e nos semi-sólidos, (com tanto que, bem entendido, a sua composição seja conveniente) na certeza de que nos *meios líquidos se conserva durante muito mais tempo (15 a 20 dias) sem ser necessário repicá-lo, enquanto que nos semi-sólidos o seu desenvolvimento é muito mais exuberante, mas torna-se urgente repicá-lo mais a miúdo (todos os 3 ou 4 dias).*

b) Em qualquer dos casos, as condições óptimas em que o gonococo se desenvolve nos meios, são:

presença de albumina não coagulada

presença de ar (já vimos que não é indispensavel)

presença de humidade

reacção fracamente alcalina

temperatura de 36° a 37° C.

c) Quando se pretende fazer o isolamento do agente afim de obter uma cultura pura, ou recolher esta para a emulsionar, os meios semi-sólidos são exclusivamente os que conveem.

Pôsto isto, digamos qual o aspecto das colónias do gonococo nos meios de cultura.

O aspecto das colónias gonocócicas é muito característico, mas notavelmente diferente segundo se desenvolvem em meio semi-sólido ou líquido.

Nos meios semi-sólidos apresentam-se, normalmente, antes de decorridas 24 horas depois da sementeira, e tem os caracteres seguintes :

MACROSCÓPICOS — do tamanho duma pequena cabeça de alfinete, superficiais, finamente granuladas, pouco espessas, nitidamente circunscritas, de contornos regularmente arredondados, acimentadas, translúcidas **de consistência mucilaginosa e muito viscosas.**

MICROSCÓPICOS — de bordos ligeiramente sinuosos.

Nos meios líquidos, o gonococo produz uma ligeira turvação no líquido, e ao fim de 24 a 48 horas, vê-se aparecer uma massa finamente granulada formando um ténue veu à superfície do líquido, que acaba por cair no fundo do tubo onde constitui uma leve mancha esbranquiçada.

SEGUNDA PARTE

YACINAS ANTIGONOCÓCICAS

CAPÍTULO I

Vacinas antigonocólicas

Considerações gerais.—Técnica geral da preparação das vacinas antigonocólicas

O PRINCÍPIO DE WRIGHT. TEMPOS PRINCIPAIS DA PREPARAÇÃO DAS
VACINAS: COLHEITA DO MATERIAL, PREPARAÇÃO DAS CULTURAS,
PREPARAÇÃO DA EMULSÃO, CONSERVAÇÃO DAS VACINAS.

Se o nosso modesto trabalho não tivesse uma feição essencialmente prática, ficaria bem, neste lugar, fazer uma resenha histórica da evolução da Vacinoterapia Antigonocólica e dos processos laboratoriais de preparação das vacinas antigonocólicas, desde Wright, que é considerado sem contestação o iniciador da Bacterioterapia, até aos nossos dias.

A tarefa não seria, de resto, muito árdua, visto como muito pouco se tem feito e ainda muito menos escrito, sobre o assunto. Porque, e pesar é dizê-lo, enquanto que a vacinoterapia

se tem desenvolvido e aperfeiçoado dum modo notabilíssimo relativamente a certos agentes microbianos, tais como, por exemplo, o bacilo tífico, o estafilococo, o pneumococo, pelo que diz respeito ao gonococo de Neisser, ela tem sido quasi completamente posta de parte.

Êste abandôno a que foi votada a Bacterioterapia antigonocócica derivava, sem dúbida, não só da extrêma fragilidade do gonococo e da grande dificuldade da sua cultura e isolamento, mas ainda e sobretudo, da sua notável toxicidade que, devida à deficiencia dos métodos empregados, lhe não era possível retirar.

Últimamente, alguma coisa se tem tentado a êste respeito. E, mercê de aturados estudos a que se tem dedicado alguns bacteriologistas, tem-se conseguido vencer, quasi em absoluto, os obstáculos que até aqui se erguiam no campo da Vacinoterapia Antigonocócica. Assim, a vitalidade e a conservação do gonococo estão perfeitamente asseguradas devido à preparação de meios de composição apropriada, e à custa de processos laboratoriais de extrêma delicadeza — que são artificios, tem-se conseguido diluir, atenuar e até mesmo retirar a grande toxicidade das suas emulsões.

E' por isso que nos últimos tempos não só a bibliografia científica regista numerosíssimos casos da utilização da Bacterioterapia Antigonocócica, mas entraram no mercado vacinas antigonocócicas inglesas (Wright, Wellcome),

francesas (Nicolle, Renaud...), americanas (Hamilton, C. W.), alemãs (o chamado Arthingon, o Gonargin, que há pouco foi ensaiado entre nós por um aluno desta Faculdade ⁽¹⁾) e algumas outras, entre as quais uma de origem brasileira cujo nome ignoramos.

Todavia, nem por isso os progressos científicos da técnica da preparação das vacinas antigonocócicas correspondem absolutamente ao impulso que todos êstes produtos pareceriam ter vindo dar-lhe, porque no 1.º caso — comunicações e notas publicadas em revistas científicas — a clínica é tudo e a técnica laboratorial quási nada, porque os experimentadores usando a maior parte das vezes uma vacina preparada duma maneira primitiva, sem estudos previos e por isso mesmo, sem rigor científico algum, dirigem a sua atenção unicamente para os resultados terapêuticos, que diga-se de passagem, como se concebe, atenta a deficiência de preparação das vacinas que empregam, não podem ser extraordinariamente lisongeiros, e no 2.º caso — vacinas industriais — o espírito mercantil que acompanha êstes produtos, envolvendo-os no *segredo*, e renegando todo o espírito científico mantém inéditas as manipulações íntimas da sua preparação.

(1) Armando Gomes de Almeida e Silva. «Vacina Antigonocócica». Dissertação inaugural apresentada á Faculdade de Medicina do Porto. 1915.

* * *

São decorridos 13 anos desde que Sir Alm. roth Wright, depois de ter procedido a profundos estudos sôbre as propriedades de defesa do sangue, teve a ideia de, com o fim de curar uma doença produzida num indivíduo por um agente micobriano, lhe injectar uma cultura pura do mesmo agente, esterilizado pelo calor. A experiência foi coroada de êxito. — Estava estabelecido o princípio da bacterioterapia. — Novos ensaios se seguiram, a técnica aperfeiçoou-se, e em 1903, Wright exprime numa definição que é um postulado, o princípio fundamental da preparação das vacinas: «A vaccine is a sterilised suspension of bacteria of known strength». (1)

«Vacina é uma suspensão de bactérias esterilizadas, de poder activo conhecido».

Toda a técnica da preparação laboratorial das vacinas, que aliás é minuciosa e de mui delicada execução, deriva imediatamente dessa definição. Assim, para preparar uma vacina dum certo agente microbiano, obtem-se uma cultura pura dêsse agente, emulsiona-se, doseia-se, isto é, determina-se o seu poder activo e esteriliza-se.

Compreende-se que, assentando num prin-

(1) D. W. «Introduction to therapeutic inoculation» Carmalt Jones.

cípio comum, todas as culturas vacinais tenham, para a sua preparação, uma técnica geral comum, admitindo, bem entendido, variadas modificações consoante os caracteres particulares de cada agente microbiano.

Pelo que diz respeito especialmente ao gonococo de Neisser, desde que se conhece a sua extrêma fragilidade, dificuldades de cultura e de conservação, fácilmente se depreende quão numerosos sejam os embaraços na execução das diversas operações necessárias para preparar as respectivas vacinas.

* * *

A preparação laboratorial das vacinas antigonocócicas compreende um certo número de operações que vamos em seguida enumerar, e que em capítulos especiais descreveremos minuciosamente, tais como as praticámos. Temos a considerar:

Colheita do material; seu transporte para o laboratório.

Preparação das culturas	{ Meios: sua preparação, esterilização e distribuição. Sementeira. Isolamento. Cultura pura.
-------------------------	--

Preparação da emulsão; seu doseamento e esterilização.

Conservação das vacinas.

Cada uma destas operações pode ser executada por diferentes métodos, a maior parte dos quais ensaiámos, e que por êsse motivo, discutiremos com o fim de apreciar as suas qualidades e defeitos, as suas vantagens e inconvenientes, segundo a nossa própria experiência.

CAPÍTULO II

Colheita do material

ESCOLHA DO GONOCOCCO. PRINCÍPIOS ORIENTADORES DA COLHEITA.
PRECAUÇÕES A TOMAR. PUS URETRAL, VAGINAL, VESICAL, DA
CAVIDADE UTERINA E DA MUCOSA OCULAR.

Como se compreende, e óbvio seria dizê-lo, a primeira e mais essencial condição a requerer para a preparação duma vacina anti-gonocócica é a existência do gonococo comprovada pelo exame bacteriológico.

¿ Pode, porém, qualquer *amostra* de gonococos ser utilizada indiferentemente para a preparação das emulsões vacinais ?

Eis um ponto que tem sido motivo de controvérsias entre os vários experimentadores, dos quais, uns, lhe não ligam a menor importância, enquanto que outros, o consideram absolutamente digno de atenção. Esta divergência resulta, segundo cremos, unicamente do modo como a questão é encarada. Assim :

a) para Wright e para os que, admitindo a existência de diferentes raças de gonococos,

são apologistas do emprêgo exclusivo de **vacinas monovalentes usadas autogênicamente**, isto é, vacinas em que os elementos microbianos foram obtidos a partir da lesão do próprio indivíduo que se pretende tratar, não há hesitação na escolha do gonococos — **é o que se colhe no próprio indivíduo, qualquer que seja a localização da lesão** — mucosa uretral, genital, ocular etc., e **quer seja recente quer antiga;**

b) para alguns autores americanos que não admitem a existência de diferenças de raças do gonococo, e, tendo comparado os efeitos curativos de vacinas polimicrobianas e monomicrobianas, dão a preferência a estas últimas que empregam heterogênicamente, isto é, vacinas cujo gonococo foi colhido num indivíduo e são injectadas em outros, — **a escolha do elemento microbiano é indiferente, podendo utilizar-se qualquer, desde que seja cuidadosamente cultivado e isolado;**

c) finalmente, para aqueles que, — e são o maior número — admitindo ou não a existência de diferenças de raças do gonococo, optam pelo emprêgo de vacinas polivalentes, isto é, contendo gonococos de proveniências diversas, **a escolha do agente microbiano não é indiferente.**

Como se sabe, o gonococo pode ter múltiplas e variadas localizações; todavia, encontra-se de preferência no pus das afecções blenorragicas da uretra no homem, e da vagina na mulher. Assim é que, quando pretendemos

obtê-lo para o cultivar e isolar, e juntamente com outras amostras de diferentes origens, igualmente cultivadas e isoladas, preparar uma emulsão vacinal polimicrobiana, preferimos, como é intuitivo, procurá-lo e colhê-lo nas suas fontes mais abundantes, tendo sempre em vista o seguinte princípio: «quanto mais nos aproximamos do início da lesão supurativa, mais probabilidades temos de encontrar o gonococo em maior quantidade, mais virulento e mais livre de associações.»

Dito isto, vamos passar a indicar como se procede praticamente à *Colheita do material infectante*.

* * *

Como dissemos, é no pus uretral e vaginal que mais vulgarmente se procura o gonococo. Pode, porém, encontrar-se na bexiga, na cavidade uterina, na mucosa ocular, etc., e assim, passaremos em revista o método especial de colheita para cada uma destas regiões.

Antes, porém, diremos as condições gerais em que a colheita deve ser feita e quais as precauções a tomar.

a) Antes de fazermos a colheita definitiva para proceder às sementeiras e culturas, devemos fazer umas preparações com o pus que desejamos colher, afim de ao microscópio identificar o gonococo.

b) E' necessário ter em vista que a colheita

deve ser feita o mais assépticamente possível, afim de evitar o risco de inquinações estranhas. Para isso emprega-se material operatório esterilizado, como pipetas de Pasteur, cateter, algodão...

c) A colheita do pus e outras secreções faz-se a maior parte das vezes por meio da pipeta de vidro de Pasteur, que como se sabe não é mais dó que um delgado tubo de vidro tendo uma das extremidades arrolhada com algodão e a outra afunilada em ponta fechada à lâmpada. Estas pipetas fazem-se mesmo no laboratório e esterilizam-se em seguida ao calor sêco.

d) **Aspira-se o pus lentamente** seguindo com atenção a sua ascensão, tendo o cuidado de evitar que o pus aspirado rápidamente venha macular o algodão da extremidade superior da pipeta ou chegue mesmo à boca do operador.

e) E' necessario que o **material recolhido fique suficientemente distante da ponta afilada** afim de não ser destruído pelo calor da chama da lâmpada quando se fecha o tubo.

Eis como se procede:

PUS URETRAL

Posta a descoberto a glande o mais possível, é cuidadosamente friccionada, bem como o meato urinário, com alcool absoluto e enxutos com uma pelota de algodão esterilizado; em seguida passam-se com sôro fisiológico. Depois,

espreme-se a uretra suavemente, por pequenas massagens centrífugas feitas na face inferior do pénis, da raiz para a glande e com algodão esterilizado limpa-se a primeira gota de pus que aflora ao meato. Toma-se agora a pipeta de Pasteur, flameja-se, quebra-se-lhe a extremidade afilada, flameja-se novamente, e enquanto o vidro arrefece, vai-se fazendo de novo a expressão da uretra e desde que o pus aparece no meato, aspira-se lentamente com a pipeta, observando-se todas as precauções já indicadas, em seguida ao que se fecha à lâmpada com cuidado.

Esta colheita deve fazer-se de preferência, de manhã, antes de o doente urinar, ou então passadas algumas horas depois da micção, afim de que o jacto da urina não arraste o material purulento a colher.

PUS VAGINAL

Procede-se neste caso similarmente como fizemos para o pus uretral. Assim, com uma pedreta de algodão embebida em alcool absoluto limpam-se com cuidado os grandes e pequenos lábios até ao nível da fúrcula e fosseta navicular. Passa-se em seguida com sôro fisiológico, e enxuga-se com algodão esterilizado. Agora, prepara-se a pipeta como foi já dito, e entreaberta a vagina com os dois dedos da mão esquerda, aspira-se o pus contido na vagina, observando to-

dos os cuidados apontados, e por fim, fecha-se a pipeta à lâmpada.

Colhe-se em qualquer ocasião.

PUZ DA CAVIDADE UTERINA

Quando se pretende retirar o pus directamente da cavidade uterina, torna-se necessário proceder à preparação prévia do colo do útero. Esta preparação não é mais do que uma cuidada limpeza afim de assegurar quanto possível a ausência de contaminação do espécime a recolher. Nós procedemos assim: na véspera do dia da colheita ou, não sendo possível, algumas horas (4 ou 5) antes, faz-se uma abundante irrigação vaginal fracamente antisséptica, tépida, enxuga-se completamente a vagina — paredes, fundos de saco, — e a porção vaginal do útero, com algodão esterilizado; em seguida introduz-se na vagina um tampão simples, sêco, de gaze esterilizada que se tem de antemão preparado, de modo que fique perfeitamente em contacto com o colo do útero.

No dia seguinte de manhã ou passadas 4 a 5 horas, retira-se o tampão que traz sempre alguma porção de pus que pode aproveitar-se para fazer algumas preparações microscópicas, e, em seguida, introduzindo na vagina um espéculo ou melhor, uma ou duas valvas, procura-se pôr à vista o colo do útero. Depois do que, tomando a pipeta convenientemente pre-

parada, se aspira lentamente o pus que aflora à abertura externa do canal cervical, podendo, em casos em que o pus é pouco abundante, fazer através do ventre massagens no útero. A pipeta é então fechada como se sabe.

PUS CONTIDO NA URINA

Para proceder a esta colheita é necessário um cateter esterilizado. Começa-se por lavar cuidadosamente o meato com álcool absoluto, e depois com sôro fisiológico ou água destilada e pode fazer-se, mas não é indispensável, uma injeção fracamente antisséptica na uretra e em seguida uma de sôro. Então introduz-se o cateter na uretra, e por meio dele recolhe-se a urina contida na bexiga, recebendo-a num recipiente esterilizado — um balão de Erlenmeyer, v. g. — Este é deixado em repouso, depois retira-se a maior parte do líquido por meio duma pipeta vulgar, centrifuga-se a parte restante em tubos esterilizados e o sedimento é aproveitado para fazer a sementeira.

SECREÇÃO OCULAR

Lavam-se cuidadosamente o globo ocular, as pálpebras, as conjuntivas, com água destilada ou sôro fisiológico. Coloca-se uma pequena compressa de gaze esterilizada sobre o globo ocular e cobre-se com uma pala.

Passadas 1 ou 2 horas, levanta-se a compressa, e mesmo sem abrir as pálpebras, procede-se à colheita do pus acumulado no ângulo interno do olho, usando o processo já descrito.

Transporte do material infectante para o laboratório

Colhido pois, o material infectante com todos os cuidados de assepsia e mais precauções, afim de assegurar quanto possível a ausência de contaminações, em uma pipeta de Pasteur que se fecha convenientemente à lâmpada, trata-se de o transportar para o laboratório.

Houve tempo em que os bacteriologistas quando pretendiam obter uma cultura do gonococo, se colocavam e ao paciente numa câmara-estufa, onde procediam à colheita do agente e à sua imediata sementeira. A insuficiência dos meios de cultura reclamava êstes cuidados.

Hoje, porém, depois de profundos estudos, verificou-se que, apesar da extrêma sensibilidade do micrococo de Neisser às diferenças de temperatura, se consegue fácilmente entreter a sua vitalidade desde que a sementeira se faça — dentro de certos limites de tempo, em meios apropriados.

Por certo, o ideal seria que a colheita do material infectante fôsse feita no laboratório.

Isto, porém, não é prático, e em muitos casos é mesmo inexecutável. Assim, é mister sujeitarmos à força das circunstâncias. De resto o transporte do gonococo para o laboratório faz-se sem conseqüências funestas para a sua vitalidade, debaixo de certas condições.

A maior parte do material infectante empregado na preparação das nossas vacinas foi colhido mais ou menos longe do laboratório e transportado em seguida para ali, em várias condições de temperatura e de acondicionamento.

Os primeiros transportes que fizemos do Hospital Militar cercávamos-os de certos cuidados. Assim, não só fazíamos o percurso em 15 minutos, mas colocávamos a pipeta contendo o pus blenorragico dentro dum tubo de ensaio encerrando água mais ou menos quente.

Algumas das sementeiras feitas com o material conduzido nestas condições ficaram estéreis, isto é, o gonococo não resistiu. Por investigações feitas, concluímos que a causa da morte do agente era o elevado grau de temperatura da água em que mergulhávamos a pipeta. Outras, porém, deram magníficas culturas, uma das quais é a amostra n.º 11.241 do Laboratório do Prof. Alberto de Aguiar.

Depois, começamos a experimentar conduzir o material sem resguardo algum, isto é, sem preocupações de defesa. Dum ligeiro envolvimento em algodão, passámos a trazer a pipeta, simplesmente, numa algibeira interior, até que

por fim a transportávamos na mão, e sempre, nestas condições, a sementeira foi positiva. Pertence a êste último, pelo processo de transporte, a amostra n.º 11.311 do Laboratório do Prof. Alberto de Aguiar que serviu não só para a preparação da vacina monovalente registada com o mesmo número (11.311) e que nós empregámos autogénicamente (Obs. I), mas também para uma das polivalentes.

E' para notar que os transportes se fizeram, a maior parte pelo menos, nos meses de Fevereiro e Março em que a temperatura atingiu por vezes uma baixa cifra. Registamos por duas vezes, na ocasião do transporte, temperaturas de 11° e 14° C. Relativamente ao tempo que mediou entre a colheita e o transporte foi variável com uma máxima de 45 minutos.

De todas estas considerações resulta, duma maneira evidente, a superioridade dos nossos meios de cultura. E, como consequência prática que — o transporte do material infectante (pus blenorragico) pode fazer-se simplesmente, sem a menor preocupação de defesa, a qualquer hora do dia, podendo gastar-se no trajecto 45 minutos e possivelmente mais (mas não o afirmamos porque o não experimentámos) — com tanto que a sementeira se faça em meios próprios.

E' conveniente, sempre que se não procede à sementeira imediatamente após a chegada ao laboratório, colocar a pipeta contendo o material colhido, na estufa a 37°.

CAPÍTULO III

Preparação das culturas

- A — Meios: sua preparação, esterilização e distribuição.
- B — Sementeiras.
- C — Isolamento. Cultura pura.

A preparação da cultura é, sem dúvida, a operação mais delicada e mais difícil da preparação das vacinas. Por isso nos mereceu o estudo mais minucioso, e, agora mesmo, ao descrevê-la, nos propomos fazê-lo com a maior latitude e claresa possíveis, embora não desçamos àquela minudência de detalhes que só teria desculpável cabimento num Manual de Laboratório.

Sabe-se que, para obter uma boa emulsão bacteriana, se exige uma cultura exuberante em que o agente não só esteja absolutamente puro (sem a menor inquinação) mas na posse de todas as suas propriedades biológicas e de virulência. E para conseguir uma cultura exube-

rante é necessário fazer uma cuidada sementeira em um meio de escôlha, rodeando-a de todas as condições óptimas do seu desenvolvimento.

Eis o assunto que seguidamente vamos versar :

MEIOS DE CULTURA:

SUA COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO; ESTERILIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO
EM PLACAS E TUBOS

Quando estudámos na Primeira parte dêste trabalho, os caracteres de cultura do Gonococo de Neisser, deixamos bem expressa a sua notável fragilidade, e a grande dificuldade da sua cultura e conservação. No que até agora temos dito, procurámos sempre frisar bem que, a circunstância da qual depende principalmente a conservação da sua vitalidade e virulência em culturas, é a existência dum meio apropriado do que se chama — um bom meio. Um bom meio caracteriza-se pela existência das seguintes qualidades principaes :

- a) dar culturas abundantes
- b) conservar durante bastante tempo a vitalidade do micróbio, sem necessitar de passagens muito freqüentes
- c) conservar os caracteres morfológicos ao agente mesmo depois de numerosas repicagens
- d) reconquistar a vitalidade do agente quando êste sofreu a acção de condições desfavoráveis à sua vida (secura, calor...)

e) ser económico e de facil preparação.

Dos nossos estudos concluimos que o gonococo não só se não desenvolve nos meios usualmente empregados no laboratório, mas exige meios, líquidos ou semi-sólidos (excluídos os sólidos) **duma composição muito complexa**. Dêstes, vimos que os *líquidos* podem ser considerados como *conservadores*, por isso que neles as sementes se conservam durante muito tempo em perfeito estado de vitalidade, enquanto que os *semi-sólidos* fornecem culturas mais ricas, mais exuberantes. Além disso, só êstes últimos se prestam para fazer o isolamento dos agentes microbianos, como em breve veremos.

Donde se conclui que os meios semi-sólidos são os de maior utilização na preparação das vacinas antigonocócicas.

Ainda do nosso estudo concluimos que de todos os meios que teem sido preconizados para a cultura do gonococo (e segundo Dujol conhecem-se quasi 60 fórmulas diferentes para tal ⁽¹⁾) os únicos que se podem considerar como, realmente, os de escolha são os que teem como **base serosidades orgânicas patológicas** (líquido ascítico, pleurítico, de hidrocele, de quisto...), sôro de leite, albumina de ovo, mosto de cerveja, adicionados à glicerina, à ureia, a açúcares, à peptona e ao caldo ou ao agar-agar.

(1) Dujol.—Thèse de Lyon. 1913.

Todos êstes meios foram por nós preparados para os nossos estudos, e assim, vamos indicar o processo prático (1) de preparação de cada um deles, dizendo ao mesmo tempo as conclusões a que, pela experiência, nós chegámos.

O caldo-ôvo — Gelose-ôvo (2)

MEIO DE BESREDKA ET JUPILLE

O caldo-ôvo (*bouillon au blanc-jaune*) é um meio constituido pela adição da clara e gema (*blanc et jaune*) do ôvo, convenientemente preparadas ao caldo de carne ordinario, nas seguintes proporções:

Clara de ôvo (sol. ao décimo).	4 partes
Gema " "	1 "
Caldo ordinário	5 "

(1) Como já tivemos ocasião de dizer, a nossa descrição pelo que se refere à preparação prática dos meios, não pode deixar de ser *esquemática*. Fazer aqui uma descrição minuciosa de tudo quanto se faz ao executar as diferentes operações seria fastidioso e descabido. Assim, pois, apenas indicaremos os tempos principais, entrando apenas em detalhes no que nos parecer absolutamente necessário.

(2) A. Besredka et F. Jupille — «Le bouillon à l'œuf». *Annales de l'Institut Pasteur*. T. xxvii 1913. Pg. 1009.

— It. «La Gélose à l'œuf», *Ann. de l'Inst. Pasteur*. T. xxviii. Juin 1914. Pg. 576-578.

A preparação de cada um destes componentes faz-se separadamente e do modo seguinte:

CLARA DO ÔVO

a) Toma-se um ou mais ovos frescos de galinha e depois de os ter lavado com água destilada, procede-se à separação da clara da gema. A operação é muito facil: fazendo um pequeno orificio em cada um dos polos do ovo, agita-se este dando-lhe pequenas sacudidelas; isto basta para a clara sair completamente, recolhendo-se em uma proveta graduada passada previamente por água destilada, onde se mede em volume.

b) Em seguida a clara é batida ou simplesmente agitada com 10 volumes de água destilada que se lhe vai juntando a pouco e pouco. Obtêm-se assim um líquido opalescente, tendo em suspensão uma grande quantidade de pequenos flocos brancos, de que facilmente nos desembaraçamos fazendo

c) passar a emulsão através dum filtro que pode mesmo ser constituído por uma delgada camada de algodão hidrófilo entre duas lâminas de gaze, como nós fizemos. Depois desta filtração, o líquido, embora livre dos flocos, conserva ainda uma certa turvação.

d) Aquece-se em seguida no autoclave a 100° c. afim de activar a precipitação das substâncias precipitáveis, e filtra-se novamente, mas desta vez, empregando o papel Chardin.

e) Depois destas operações, o líquido que se obtêm, agora duma bela côr de opala, é repartido em balões de Erlenmeyer, convenientemente arrolhados,

f) e pôsto a esterilizar no autoclave a 115°, durante 20 minutos.

GEMA DO ÔVO

a) Depois de esvaziado completamente o ôvo da clara, pelo processo que indicámos, procede-se à colheita da gema para o que basta continuar a sacudir o ôvo, agora com mais vigor. Recolhida toda a gema, mede-se em volume em uma proveta graduada, tal como fizemos para a clara e, ainda, do mesmo modo se desfaz, isto é,

b) se **emulsiona**, agitando-a com 10 volumes de água distilada, adicionada por pequenas fracções.

c) A emulsão resultante apresenta-se fortemente opaca e com o fim de a clarificar junta-se-lhe um soluto normal de soda. Esta é a parte mais delicada da preparação e de que depende muitas vezes a inutilização do meio. A junção do soluto normal de soda à gema de ôvo emulsionada, tem como efeito imediato clarificá-la quási completamente. Todavia, porque um excesso de soda prejudica as qualidades nutritivas da gema de ôvo, há toda a conveniência em não atingir a sua completa solubilização: **a emulsão deve ficar levemente opaca. Para rea-**

lizar o grau de solubilização requerido, é necessário adicionar a soda com todo o cuidado, tendo presente que a quantidade de soluto de soda a empregar é muito diferente para cada ôvo.

Nós obtivêmo-lo gastando em geral 1 cc. de soluto normal de soda por cada 100 c. c. da emulsão. Clarificada pois a solução da gema de ôvo, é tratada como a clara:

d) aquecida no autoclave a 100°

e) filtrada no papel Chardin, repartida em balões, que se arrolham convenientemente.

f) Finalmente, esterilizada a 115° durante 20 minutos.

CALDO DE CARNE ORDINÁRIO

Êste caldo que é muito freqüentemente empregado no laboratório por isso que serve de subtracto principal da maior parte dos meios nutritivos, prepara-se do seguinte modo:

a) Põe-se a macerar dentro dum balão de vidro contendo 1 litro de água, 500 ou 750 gramas (segundo se pretende um caldo mais ou menos forte) de carne de vaca, livre o mais possível de gordura e reduzida a pequenos fragmentos, adicionando-lhe ao mesmo tempo 10 a 20 gramas de péptona Chapoteau. (1) A macera-

(1) Alguns bacteriologistas entre estes o autor do meio, preferem a peptona Martin. Nós, porém, damos a preferência á peptona Chapoteau que empregamos de todas as vezes.

ção é levada ao calor: primeiramente a 50° durante 30 minutos, depois à ebulição durante 30 a 45 minutos.

b) Retiram-se os pedaços de carne maiores, e filtra-se o macerado através dum pano molhado, que retém completamente todas as partículas de gordura.

c) Em seguida, neutraliza-se o caldo com uma solução normal de soda, ao tornesol, até que apresente uma reação francamente alcalina.

d) Aquece-se de novo no autoclave a 120° afim de activar a formação do precipitado.

e) Mais uma vez se filtra, porém agora no papel Chardin duplo, ficando o caldo com uma magnífica limpidez.

f) Reparte-se em balões que se arrolham e esteriliza-se no autoclave a 115° durante 25 minutos.

* * *

Preparados, pois, pelo modo como deixamos dito, os 3 componentes, trata-se agora de os juntar nas proporções indicadas, afim de obter o CALDO-ÔVO.

Esta junção que não envolve técnica especial, é feita a frio. Pode proceder-se assim: em um balão esterilizado de 1000 a 1200 c. c., contendo 500 c. c. do CALDO DE CARNE esterilizado deitam-se por meio duma pipeta esterilizada primeiramente 400 c. c. da CLARA DE ÔVO esterilizada (solução ao décimo) e depois 100 c. c. da

GEMA DE ÔVO igualmente esterilizada (sol. ao décimo).

O conjunto ou se conserva no próprio balão em que se fêz a mistura, para ulterior distribuição, ou se distribui imediatamente em tubos e em caixas de Pétri, segundo o processo geral de distribuição dos meios que mais abaixo indicaremos.

E' conveniente colocar o CALDO-ÔVO na obscuridade e à temperatura do laboratório afim de conservar inalteradas as suas propriedades nutritivas.

* * *

M. M. Besredka e Jupille ⁽¹⁾ experimentaram cultivar no CALDO-ÔVO vários agentes patogénicos dos mais exigentes e cuja vitalidade é mais exígua nos meios ordinários — entre os quais o gonococo. E, pelo que diz particularmente respeito a êste agente, notaram que as suas culturas (em fôrma de teia de aranha) além de muito abundantes, se desenvolviam rapidamente (em 24 horas) exigindo apenas para conservar a vitalidade da semente passagens de 22 em 22 dias.

Nós preparámos por mais duma vez êste caldo com o fim de servir de base à GELOSE-ÔVO. Abstemo-nos de fazer considerações sôbre as

(1) Ut supra.

suas propriedades nutritivas, além das que os próprios autores lhe atribuem, porque o não ensaiámos visto que, como já dissemos, os meios líquidos não conveem como os semi-sólidos na preparação das culturas vacinais. Todavia, convem dizê-lo, **não só a sua preparação não tem dificuldades, mas é bastante economica**, pois que 1 ovo encerra pouco mais ou menos 20 cc. de gema e 30 cc. de clara que, diluídas ao décimo, dão um total de 500 cc. de líquido, e assim, para preparar 1000 cc. de CALDO-ÓVO, além do CALDO DE CARNE, bastam 2 ovos.

Gelose-ovo (1)

M. M. Besredka e Jupille tendo notado pela experiência que as culturas nos meios semi-sólidos eram muito mais exuberantes do que nos líquidos, tiveram a ideia de juntar o CALDO-ÓVO à GELOSE que, como se sabe, goza da propriedade de transformar os meios líquidos em meios sólidos, constituindo assim a GELOSE-ÓVO.

Por conseguinte, a GELOSE-ÓVO, tendo como base o CALDO-ÓVO, não é mais do que a combinação dêste com a GELOSE ORDINÁRIA.

Do caldo-ovo, já indicámos no capítulo anterior o modo como se obtem; vamos, agora dizer como se procede para a preparação da GELOSE que tam utilizada é no laboratório.

(1) It.—T. XXVIII. Juin 1914. Pag. 576 578.

GELOSE-ORDINÁRIA

a) A 1 litro de caldo de carne ordinário, preparado como acima vimos, contido em um balão de vidro, juntam-se 20 gr. de agar-agar cortado em pequenos pedaços, e agita-se o balão, afim de tornar a mistura o mais homogênia possível.

b) Como o agar é difícil de se dissolver, coloca-se o balão no autoclave a 120° durante 40 a 60 minutos.

c) Neutraliza-se a massa nutritiva com o soluto normal de soda (a 10 %) ao tornesol ou a fenoltaleína. Se se juntar muito álcali, corrige-se juntando-lhe algumas gotas de ácido clorídrico. Todavia, um leve excesso de álcali não é prejudicial.

d) Leva-se o balão ao autoclave afim de precipitar todos os elementos que não tenham sido ainda precipitados.

e) Prova-se ao tornesol, e corrige-se eventualmente a reação do líquido.

f) Procede-se à sua filtração. Como a gelose solidifica abaixo de 40°, torna-se necessário filtrá-la a quente. Para isso usa-se um funil de vidro com papel Chardin, dentro do autoclave a temperatura superior a 65°.

g) Corrige-se novamente a reação se fôr necessário. E, se o filtrado não fôr claro, repete-se a filtração.

h) O líquido obtido é distribuído em balões

pequenos que se arrolham convenientemente, ou imediatamente em tubos e placas de Pétri, seguindo o método de distribuição que em breve indicaremos, que em seguida são postos no autoclave a 120° durante 20 minutos, e deixados depois a solidificar. (1)

Tendo pois, tubos e placas de GELOSE solidificada (nos tubos a superfície é oblíqua) e CALDO-ÔVO preparados previamente, procede-se à junção dos dois. A operação é muito fácil, mas requiere certos cuidados da parte do operador. Eis como se executa: com uma pipeta graduada esterilizada, toma-se uma certa quantidade de CALDO-ÔVO e, com segurança mas com ligeireza afim de evitar inquinações do meio, à medida que se desarrolha cada tubo e se soergue a tampa de cada caixa de Petri, vão-se-lhe deitando sucessivamente 4 c. c. do caldo. Depois com pequenos movimentos de inclinação em todos os sentidos, espalha-se êste a toda a superfície da gelose.

Esta junção que como se acaba de vêr exige certa delicadeza na execução, só se faz na véspera do dia da sementeira, e os tubos e placas são em seguida colocados na estufa de 37°, onde permanecem pelo menos 24 horas, afim de tornar completa a impregnação da GELOSE pelo CALDO.

(1) Algumas vezes junta-se ao meio, antes da ultima esterilização, 20 a 40 gr. de glicerina purissima, afim de lhe aumentar as suas qualidades.

Apesar de todos os cuidados, a inquinação do meio é muito freqüente, e por isso nós devemos preparar sempre 4 a 5 tubos e outras tantas placas, para que tendo de rejeitar alguns por estarem inquinados nos restem ainda os suficientes para a sementeira.

* * *

O gonococo semeado, começa rapidamente a desenvolver-se, dando, passadas 24 horas, culturas bastante ricas, com os caracteres morfológicos clássicos.

Dos inúmeros ensaios a que os seus autores procederam, (1) puderam concluir que a GELOSE-ÔVO pela abundância e rapidez do desenvolvimento das colônias, pode ser considerado como **um meio de escolha** para a cultura do gonococo. Nós não podemos infelizmente confirmar estas conclusões dos seus autores, visto que os ensaios que fizemos com a GELOSE-ÔVO e simultaneamente com outros meios semi-sólidos, além de pouco numerosos, **resultaram** (talvez por deficiência de técnica da nossa parte), **pouco animadores** sobretudo, se se estabelece o confronto com os resultados obtidos com alguns dos outros meios.

(1) Ut supra.

Gelose-leite ou Meio de Sabouraud (1)

Êste meio tem por base o sôro de leite, e, além do agar-agar, contém 1^{gr} % de peptona e de glucose ou sacarose, e 0,30 % de ureia ou, em vez desta, V gotas % de ácido acético.

Prepara-se do seguinte modo:

a) Leva-se à ebulição num balão de vidro, 1 litro de leite fresco e puro, de vaca.

b) Adicionam-se-lhe 2 c. c. de ácido clorídrico afim de precipitar a caseína, agita-se durante 2 minutos e filtra-se em seguida através dum pano molhado.

c) Ao sôro obtido, pouco mais ou menos 700 c. c., junta-se metade do seu volume de água, de modo a completar o litro, e neutraliza-se o todo com o soluto normal de soda (a 10 %) ao tornesol.

d) Leva-se ao autoclave a 120° durante 10 minutos, e filtra-se de novo.

e) Juntam-se-lhe então

A) v gotas de ácido acético.

B) 10 gramas de peptona Chapoteau.

C) 10 gramas de sacarose ou glucose.

D) 18 gramas de agar-agar finamente fracionado.

(1) R. Sabouraud et H. Nciré.— «Milieu rendant facile la culture du gonocoque». Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie.—5.ª série—Tomo iv-1913—Pag. 486.

Agita-se o balão afim de misturar o melhor possível o conteúdo.

f) A mistura é levada ao autoclave a 120° durante 20 minutos e filtrada a quente. (1)

g) Reparte-se o meio em pequenos balões ou logo em tubos, (pelo processo clássico) (2) que são postos a esterilizar no autoclave a 110° durante 20 minutos, depois do que se deixam em repouso afim de solidificar.

* * *

O gonococo semeado largamente neste meio apresenta-se passadas 24 horas em colónias muito nítidas, com os caracteres clássicos. As culturas não são, porém, muito ricas, e, para as conservar com vitalidade, torna-se necessário repicá-las de 3 em 3 dias.

O autor, como é natural, considera a GELOSE-LEITE eminentemente própria para a cultura do gonococo, nós, porém, preferimos-lhe qualquer dos outros meios que aqui apontámos.

(1) Já vimos como se procede a esta filtração quando tratámos da gelose-ovo. V. pag. 69.

(2) V. pag. 83.

Gelose-cerveja (1)

MEIO DE LUMIÈRE E CHEVROTIER

Este meio, como o título deixa entrever, tem como base essencial o **mosto de cerveja**, e é adicionado, além de agar-agar, de albumina de ovo e ainda de sôro de burro (10 %) mas a junção dêste último produto não é indispensável, e nós nunca a fizemos.

Prepara-se do seguinte modo:

a) A 1000 cc. de mosto de cerveja (só a parte líquida se aproveita) contidos em um balão de vidro, juntam-se 6 gr. de albumina de ovo e 20 gr. de agar-agar reduzido a pequenos fragmentos. Agita-se o balão para homogeneizar o mais possível a mistura.

b) Leva-se ao autoclave a 115° durante 30 minutos afim de dissolver o agar-agar.

c) Alcaliniza-se a mistura empregando o soluto normal de soda, ao tornesol (gastam-se em geral, 4 cc. do soluto).

d) Filtra-se a quente no autoclave (funil de vidro com papel Chardin, como já vimos).

(1) August Lumière et J. Chevrotier. «Sur un nouveau milieu de culture éminemment propre au développement du gonocoque».

C. R. Acad. Sciences de Paris. t. CLVII 1^{er} Déc. 1913. pg. 1097.

It. «L'Avenir Médical», 4^o an. n.º 1. 1^{er} Janvier 1914. pg. 2441.

e) Prova-se a reacção e corrige-se sendo necessário.

f) Leva-se novamente ao autoclave a 110° durante 15 minutos para esterilizar.

g) Distribui-se em balões ou em tubos pelo processo clássico.

* * *

Para que este meio dê os resultados desejados — boas culturas — é indispensável que na sua preparação se satisfaçam os seguintes preceitos:

1.º — Que o mosto de cerveja empregado não encerre senão farinha de cevada, com ou sem lúpulo, mas isento de qualquer outra matéria amilácea ou açucarada ⁽¹⁾ ou de quaesquer outros produtos químicos.

2.º — Que o meio seja cuidadosamente alcalinizado, porque a sua reacção desempenha um importante papel. ⁽²⁾

Nós preparámos por diversas vezes este meio, seguindo todas as indicações e observando todas as precauções aconselhadas pelos autores.

(1) Dando-se este caso dilui-se o mosto ao $\frac{1}{2}$ ou ao $\frac{1}{4}$ afim de reduzir a percentagem dessas substâncias.

(2) Ut supra. — «Quelques considérations nouvelles à propos des cultures de gonocoques.» C. R. Acad. Sciences de Paris. T. CLVIII 4 Maio 1914. Pag. 1289.

— «L'Avenir Médical» 11.º année n.º 6. 1^{er} Juin 1914. Pg. 2545.

Empregámos como base, um mosto de cerveja, cedido pela Fábrica da Piedade, que era constituído por uma parte sólida (farinha de cevada) e outra líquida, tendo um forte cheiro a lúpulo. Não continha substâncias açucaradas nem amiláceas como vimos pela reacção de Fehling e do iodo. No 1.º ensaio, utilizámos uma parte do elemento sólido e outra do líquido. Porém, o meio ficou pouco homogéneo, de côr fortemente carregada, e quási opaco.

Nas experiências seguintes aproveitámos apenas a **parte líquida**, colhida por decantação, e então, não só o meio se apresentava homogéneo, mas translúcido e duma bela côr.

* * *

Os autores foram induzidos à utilização do mosto de cerveja como base de meio, pelo facto de observação corrente de que no decurso duma blenorragia em regressão ou com tendência à cronicidade, a ingestão de cerveja provoca uma exacerbação do processo. Assim, era natural supor que aquela bebida contivesse elementos que favoreçam o desenvolvimento do gonococo.

Depois de várias experiências e tentativas, os autores julgaram poder concluir que, efectivamente, o meio tendo como base o mosto de cerveja era eminentemente próprio para a cultura do micrococo de Neisser desde que êste fôsse largamente semeado e pôsto em boas condições de temperatura e humidade.

Nós experimentámo-lo também, simultaneamente com outros meios. E, do que observámos, resultou a impressão de que o meio **GELOSE-CERVEJA** tem boas qualidades nutritivas e é de fácil **preparação**, todavia não podemos partilhar da exaltação dos seus autores, que aliás muito bem compreendemos...

Propositadamente deixámos para o final a descrição da técnica de preparação dos meios que tem por base **serosidades orgânicas patológicas**. Destas, embora todas possam ser empregadas estando, bem entendido, absolutamente estéreis, são mais comumente utilizadas e foram as que nós próprios usámos,— o **líquido ascítico**, o **pleurítico**, o de **hidrocele**, e o de **quisto**, na certeza de que, contendo todas, **albumina animal em diversa proporção**, são mais convenientes aquelas em que a taxa dêste elemento fôr superior.

Na preparação dêstes meios, a serosidade orgânica é adicionada à gelose convenientemente preparada, segundo uma técnica absolutamente idêntica, qualquer que seja o líquido orgânico empregado.

Assim, a **gelose-ascíte** (meio de Kiefer) a **gelose-líquido pleurítico** (meio de Heiman) a **gelose-líquido de hidrocele** (meios de Kraal e de See) e a **gelose-líquido de quisto** (meio de Menge) preparam-se perfeitamente do mesmo modo. E'

por isso que, descrevendo o método de preparação de um dêles, o de qualquer dos outros fica indicado.

Gelose-ascite

MEIO DE KIEFER

Na preparação dêste meio entram, como deixámos dito, o LÍQUIDO ASCÍTICO e a GELOSE. Começaremos por descrever a maneira como se obtêm ou se prepara cada um dêstes componentes, para em seguida dizer como se juntam.

LÍQUIDO ASCÍTICO

Evidentemente, para se obter êste líquido (ou o pleurítico, o de hidrocele, etc.) é necessário antes de tudo, ter um doente com ascite (com pleurisia, com hidrocele, etc.) aonde possamos colhê-lo. Esta colheita tem como 1.º tempo a punção cirúrgica (paracentese, toracentese, etc.) feita segundo as regras de assepsia.

Segue-se agora o 2.º tempo da colheita que consiste em recolher directamente em recipientes de vidro (garrafas ou balões de Erlenmeyer) esterilizados, o líquido puncionado, depois do que se arrolham.

Apesar de todos os cuidados de assepsia empregados na colheita do líquido orgânico —

nêste caso o líquido ascítico—nunca êste se obtêm absolutamente isento de inquinação. Torna-se, pois, necessário esterilizá-lo, e para isso, como a albumina coagula a 70°, e o líquido não pode por conseguinte ser levado ao autoclave, é submetido, distribuído em pequenos balões, ao aquecimento descontínuo, durante 6 dias a 58° no tinalizador — querê dizer é **tinalizado**.

GELOSE

A gelose empregada na preparação do Kiefer difere um pouco da que foi utilizada na preparação da GELOSE-ÔVO.

Esta diferença está na **qualidade do caldo de carne empregado, na quantidade do agar-agar e no modo de o dissolver**. Assim, a preparação da gelose aqui empregada, difere da da gelose ordinária unicamente nos dois primeiros tempos *a)* e *b)*.

Eis como se procede:

a) A 1 litro de caldo de carne ordinário (500 gr. de carne para 1 l. de água) **fortemente peptonado** pela adição de **50 gr.** de peptona Chapoteau, juntam-se **35 gr.** de agar-agar finamente reduzido. Agita-se o balão para homogeneizar a mistura.

b) A dissolução da gelose é, neste caso, feita a frio, e assim, a mistura é levada à geleira onde se conserva durante **24 horas em maceração**.

c) d) e) f) e g) Como na preparação da gelose ordinária sendo neste caso obrigatória a junção de 30 gr. de glicerina puríssima antes da última esterilização.

Preparados, pois, os componentes do meio de Kiefer — líquido ascítico e gelose — pelo modo como acabamos de mostrar, torna-se necessário juntá-los afim de se poder utilizar o meio. Esta junção na proporção de 3 de líquido ascítico para 7 de gelose só é feita na véspera do dia em que se procede à sementeira do agente; executa-se do seguinte modo:

Temos um balão de Erlenmeyer contendo líquido ascítico tindalizado;

Temos igualmente tubos com 7 c. c. (pouco mais ou menos) de gelose solidificada.

a) Começa-se por colocar êstes ultimos no autoclave a 100°, até fundir a gelose, que como se sabe só se liquefaz acima de 65°.

b) Em seguida transportam-se os tubos de gelose, agora fundida para um banho-maria mantido a 57°, em que nós temos já a aquecer o líquido ascítico. A mistura da gelose e do líquido ascítico não póde fazer-se senão a quente para que êste não solidifique imediatamente aquela.

c) Com uma pipeta esterilizada aspira-se do respectivo balão uma quantidade arbitrária de líquido ascítico, e vão-se distribuindo sucessi-

vamente 3 cc. em cada tubo de GELOSE, o que prefaz 10 cc.

d) Imediatamente depois de juntos os líquidos e antes que a gelose solidifique, fázem-se pequenos movimentos de inclinação a cada tubo de per si, afim de tornar a mistura o mais perfeita possível.

e) Depois disto, alguns dos tubos colocam-se obliquamente em repouso, para a gelose solidificar, e outros são cuidadosamente esvaziados em caixas de Petrí que se deixam igualmente em repouso em lugar fresco.

Todas estas operações se conduzem de forma a evitar toda a inquinação dos meios.

* * *

Resta-nos falar das qualidades nutritivas e de conservação dos meios que teem como base uma serosidade orgânica patológica.

Dum modo geral, podemos dizer que êstes meios são os mais convenientes para a cultura e conservação do gonococo.

As nossas experiências assim nos levam a crêr. Pois que, tendo feito por diferentes vezes, sementeiras de gonococos, simultâneamente em GELOSE-ÔVO, GELOSE-CERVEJA, GELOSE-LEITE E GELOSE-SEROSIDADES ORGANICAS, e colocados sob as mesmas condições, de todas as vezes êstes últimos meios se mostraram, duma maneira evidente, superiores a qualquer dos outros,

e possuidores de todas as qualidades que num bom meio se exigem: **culturas ricas, facilidade em conservar as sementes durante meses (embora para isso exijam passagens feitas de 3 em 3 dias), não modificar os caracteres morfológicos do agente ainda mesmo depois de numerosas passagens e de fácil preparação.**

¿ Todavia, poder-se-há empregar indiferentemente qualquer das serosidades orgânicas que apontámos?

Julgamos que sim, atendendo a que qualquer delas satisfaz dum modo semelhante ás condições necessarias para a boa constituição dum meio.

De resto, tendo nós acentuado, ao falar das exigências do gonococo em cultura, a necessidade da **existência de albumina não coagulada no meio**, é lícito supor que a riqueza das culturas é proporcional à quantidade de albumina contida no meio.

E, como esta quantidade é muito variável para cada serosidade, podemos tirar a seguinte ilação: **o meio mais favoravel para o desenvolvimento do gonococo, será aquele em que a albumina existir em maior proporção.**

Na prática, porém, há um factor a que é preciso atender: **a facilidade em obter a serosidade orgânica.**

De todas, são mais fáceis de obter as provenientes de ascite e de pleurisia com derrame, porque não só estas doenças são mais vulgares

do que o hidrocele e o quisto, mas ainda a quantidade de líquido fornecido por elas é maior.

E' por isso que na prática o líquido ascítico é de todos o mais utilizado, e foi aquele de que fizemos maior uso.

* * *

Distribuição dos meios em tubos e em placas

Como a distribuição dos meios se executa segundo uma técnica de certo modo delicada e que exige alguns cuidados, propositadamente deixámos só para agora a sua descrição detalhada.

Antes de proceder à distribuição dos meios, torna-se necessario:

1.º *Preparar tubos e placas de Petri* — Para isso lavam-se uns e outros, enxugam-se, (arrolham-se os tubos) e levam-se a esterilizar a sêco na estufa a 120°, durante 30 minutos.

2.º *Preparar o aparelho distribuidor* — Êste é um dispositivo ao mesmo tempo simples e cómodo, compreendendo um funil de vidro no bico do qual se adapta um pequeno tubo de cauchu terminado inferiormente por um tubo de vidro afilado na extremidade inferior. A meio do tubo de cauchu applica-se uma pinça compressiva de Mohr. E todo o aparelho se coloca no autoclave a 120° durante 20 minutos a esterilizar.

3.º *Fundir os meios sólidos* — no autoclave a 100º.

Depois de tudo preparado, trata-se de realizar a distribuição. Eis como se opera :

a) Retira-se do autoclave o aparelho distribuidor e coloca-se num suporte conveniente.

b) Em seguida deita-se no funil uma quantidade do meio fundido, e, tomando sucessivamente cada um dos tubos esterilizados,

c) desarrolha-se, adapta-se ao tubo de vidro afilado por que termina inferiormente o aparelho distribuidor, e abrindo a pinça de Mohr, deixam-se correr pouco mais ou menos 10 c. c. em geral (para os tubos de Kiefer só 7 c. c.) do meio, tendo o cuidado de não humedecer a margem superior do tubo, depois do que se arrolha com algodão.

d) Então os tubos e as caixas de Petrí são deixados em repouso, num lugar fresco a solidificar, podendo os tubos ficar desde logo convenientemente inclinados afim de que a gelose solidifique segundo um plano inclinado mais propício para a sementeira.

SEMENTEIRAS

Preparado, pois, convenientemente o meio, e distribuído em placas de Petrí e em tubos que se deixaram em repouso a solidificar, e, por outro lado, obtida uma amostra de pus

blenorrágico a que préviamente se tem feito análise microscópica e procurado identificar o gonococo, torna-se mister proceder à sua sementeira.

Como se sabe, os agentes microbianos podem semear-se em meios líquidos ou em meios semi-sólidos. Todavia, quando é necessário isolar o agente que, em regra, vem mais ou menos associado a outros, os meios líquidos são absolutamente excluídos, sendo os semi-sólidos os únicos utilizados.

Esta conveniência dos meios semi-sólidos (gelose como substrato) resulta do seguinte:

- a) verifica-se melhor a pureza dos meios,
- b) evita-se a acção tóxica das peptonas dissolvidas, (1)
- c) as culturas praticadas em gelose são mais diferenciais da espécie microbiana que se cultiva, e basta muitas vezes a simples inspecção para as identificar.

* * *

As sementeiras podem praticar-se, segundo diversos métodos. Nós empregámos de todas as vezes o método por diluição e fraccionamento

(1) Charles Nicolle. «De la supression de la peptone dans les milieux de culture communs» C. R. Soc. Biol. 26 oct. 1912. T. LXXLIII. Pg. 403.

— «Biologica», n.º 24. T. II. Pg. 373.

que consiste em diluir préviamente a *amostra* do agente a semear para que a sementeira nos não venha de tal modo exuberante que cubra completamente toda a superfície do meio, e em distribuir nos meios quantidades da diluição **microbiana** assim feita sucessivamente menores, de tal forma que nas últimas placas ou tubos semeados, as colónias se apresentem suficientemente distintas para poderem ser examinadas e facilmente identificadas pelos seus caracteres macroscópicos.

* * *

Feitas estas ligeiras mas indispensaveis considerações, vamos passar a dizer como se executa praticamente a primeira sementeira.

Para facilidade de exposição dividiremos a operação em duas partes principais:

na 1.^a prepara-se o material infectante para poder ser semeado,

na 2.^a procede-se propriamente à sementeira.

1.^a PARTE

a) Toma-se a pipeta contendo o material infectante que depois da colheita se colocou na estufa a 37°, passa-se rapidamente pela chama do bico de Bunsen, quebra-se-lhe a extremidade afilada, passa-se esta de novo pela chama e

b) introduz-se num pequeno tubo de ensaio esterilizado contendo uma pequena quantidade de caldo ordinário estéril, e, por aspirações e

expulsões sucessivas feitas na extremidade superior da pipeta, procura-se desagregar e dissolver no caldo o material contido na pipeta, depois do que se enrolha imediatamente o pequeno tubo e se coloca num suporte.

2.^a PARTE

Dispõem-se na nossa frente de forma a poderem ser sucessivamente semeadas as placas e os tubos que desde a véspera do dia da operação tem estado na estufa a 37° (afim de o meio adquirir as propícias condições de humidade), numeram-se 1, 2, 3 e procede-se assim :

— Para as placas (*processo de Lindener modificado*).

a) Com uma pipeta de Pasteur esterilizada e convenientemente preparada aspira-se um pouco da diluição que fizemos do material infectante, e, rápidamente, afim de evitar o mais possível inquinações estranhas, soergue-se a tampa da placa 1 e deixam-se cair à sua superfície II gotas ⁽¹⁾ da diluição do material infectante e seguidamente, soerguendo do mesmo modo a tampa da placa 2, deixa-se cair apenas I gota da mesma diluição.

b) Tomando agora um sacaneador esterilizado e soerguendo a tampa da placa 1, espalham-se suave mas rápidamente em toda a superfície do meio as gotas da diluição do ma-

(1) Ou mais, se a concentração da diluição é pequena.

terial infectante que nós nele tínhamos deixado cair; e tomando um outro sacaneador esterilizado executa-se na placa 2 o mesmo que fizemos na 1, na certeza de que, êste último sacaneador, em vez de se rejeitar como o primeiro, é utilizado para, com o material infectante que ainda contém, fazer a sementeira e espalhá-la na placa 3. Compreende-se que, dêste modo, as três placas não só fiquem suficientemente semeadas, mas e sobretudo, sendo o material infectante tam fraccionado, as colónias se mostrem com a necessária independência afim de serem identificadas e picadas para novos meios, para isolar o agente.

— Para os tubos (*Processo de Veillon e Roux combinados*).

a) Com a ansa de platina estéril toma-se um ou mais *oices* da diluição do material infectante e tendo-o mergulhado no líquido de condensação do tubo 1, semeia-se em estrias à superfície do meio, conservando sempre o tubo inclinado para evitar as inquinações.

Do mesmo modo se procede para com o tubo 2, e para com o 3 em vez de tomar novo *oice* de material, utiliza-se o que resta ainda na ansa de platina depois da sementeira no tubo 2.

Semeados, como fica indicado, as placas e os tubos são colocados na estufa a 37° durante 24 horas.

Em regra, não há necessidade de fazer uma tam larga sementeira e por isso mesmo, um tam grande gasto de meio nutritivo, porque bastam algumas colónias, picadas e semeadas novamente, para fornecer material bastante para as emulsões.

Póde pois, reduzir-se a 3 o número de placas ou tubos para proceder à 1.^a sementeira, desde que, é claro, se esteja absolutamente senhor da técnica.

¿Será indiferente empregar nesta 1.^a sementeira placas ou tubos?

No principio dos nossos trabalhos empregámos indiferentemente uns e outros, todavia a prática bem cedo nos ensinou, e permite-nos responder sem hesitar que neste caso as **placas de Petri são muito mais convenientes que os tubos**, e por isso as empregámos sempre, desde então, para as 1.^{as} sementeiras. Eis as principais razões da preferência:

a) Porque se semeiam e distribuem melhor e mais facilmente;

b) Porque são menos fáceis de se inquinarem no momento da sementeira;

c) Porque nelas se reconhecem mais facilmente por transparência, as colónias do micróbio que se cultiva;

d) Porque, necessitando fazer o isolamento do agente, as colónias nas placas *picam-se*, isto é, tomam-se com a ansa ou com a espátula de platina, com mais facilidade.

* * *

E' absolutamente raro que o gonococo se encontre no pus inteiramente puro, sem inquinações.

Já vimos que quanto mais no início da lesão nos encontramos mais facilmente se consegue obtê-lo menos associado, e, conseqüentemente, quanto mais afastada do início da doença é feita a colheita, mais inquinado se mostra pelas diferentes espécies microbianas: estafilococos, estreptococos, coli, cocos vários, etc.

Compreende-se pois, que sendo condição capital para a preparação duma emulsão vacinal, a existência duma **cultura pura** do agente, — seja necessário proceder, depois da 1.^a sementeira do micróbio ao seu **isolamento**.

E' justamente o que vamos em seguida versar.

ISOLAMENTO — CULTURA PURA

Temos, pois, as placas de Petrí (admitindo que só placas se utilizaram) em que fizemos a sementeira, na estufa a 37°.

Em regra, só passadas 24 horas as colónias microbianas atingem o seu completo desenvolvimento e se mostram com os seus caracteres clássicos de grandeza, de fôrma, de espessura, etc. Todavia, algumas vezes, antes mesmo de decorrido aquele praso de tempo, as colónias

apresentam-se já com caracteres que as tornam diferenciáveis pela simples inspecção.

Mas isto não é muito vulgár, e não se dá senão excepcionalmente com o gonococo, cujas colónias são pouco características.

Como quer, porém, que seja, desde que as colónias aparecem à superfície do meio, examinam-se cuidadosamente por transparência (uma das conveniências das placas), com uma lente ou com o microscópio, para o que se coloca na platina do aparelho a placa com o fundo voltado para a objectiva que deve ser fraca, ou ainda, quando o simples aspecto da colónia não bastou para o identificar e sempre como meio de confirmação o mais seguro, faz-se uma preparação com a colónia suspeita, isto é, com um fio ou ansa de platina retira-se parte da colónia, estende-se numa lâmina e examina-se ao microscópio.

Se a colónia é do agente em estudo, e aparece pura, e se nada permite suspeitar da existência de inquinação por um micróbio estranho, repica-se imediatamente para tubos frescos previamente preparados, isto é, deixados desde a véspera na estufa a 37°.

No caso contrário, porém, a repicagem é repetida tantas vezes quantas forem necessarias para que as colónias se mostrem puras — inteiramente livre de inquinação. Estas repicagens não são mais do que novas sementeiras que se fazem sempre com os mesmos cuidados, mas

agora em tubos deferindo unicamente da 1.^a sementeira no material que se semeia : ali, era o próprio material infectante diluído, aqui é uma colónia ou parte dela, resultante já duma sementeira.

Êste isolamento do gonococo é, por vezes, duma grande dificuldade, porque, em regra, embora nos tenhamos cercado de todas as precauções e cuidados ao proceder à colheita do material infectante, à sua diluição e à sua sementeira, a cultura mostra-se mais ou menos inquinada, por diversos agentes cujas colónias por vezes muito semelhantes às do gonococo, (que, como vimos, apesar de apresentarem caracteres bastante nítidos não são comtudo absolutamente características e específicas), — se prestam á confusão.

Assim, para obter uma cultura pura é necessário, geralmente, fazer mais do que uma passagem.

Estas, bem entendido, praticam-se sempre segundo a técnica que indicámos, atendendo aos seguintes princípios :

1.^o— Para fazer as **repicagens** convêm mais empregar tubos (em regra 3).

2.^o— Para êstes estarem aptos a ser semeados é necessário que tenham permanecido 24 horas antes, na estufa.

* * *

¿ Obtida a cultura pura do agente, estará esta imediatamente apta a ser emulsionada ?

Outrora julgava-se que o agente microbiano empregado como antigénio devia ser muito virulento e extraído recentemente do doente. Hoje alguns autores pensam diferentemente. Assim :

Leismann, Russel, H. Vincent, (1) dizem que é preferível escolher um micróbio de fraca virulência, isolado desde muito tempo do organismo humano e tendo sofrido numerosas repicagens em meios próprios.

Hamilton, Irons e outros autores americanos concluem que a aplicação de material fresco de cultura para a preparação das vacinas é desfavorável e que é preciso, para a obtenção de preparados activos, cultivar o gonococo durante longo tempo em meios apropriados e só então fazer uso do agente para a preparação das emulsões a empregar terapêuticamente. (2)

Todavia, a maioria dos experimentadores preferem para preparar as emulsões vacinais

(1) O Prof. Vincent utiliza para a preparação das suas vacinas antitíficas, bacilos primitivamente muito virulentos mas atenuados e *domesticados* desde alguns annos (plusieurs années) pela cultura laboratorial.

J. Louís et E. Combe — «La vaccination antityphique» — Le Monde Médical — 22.º année n.º 451 pag. 453.

(2) Armando Gomes de Almeida e Silva — Vacina antigonocócica. Tese apresentada á Faculdade de Medicina do Pôrto. 1914, Pg. 102.

culturas frescas dum agente colhido pouco antes do individuo, porque pensam que, justamente, a actividade da vacina depende da virulência do agente e assim, as passagens sucessivas tendo como resultado atenuá-la, são condenáveis.

A priori, pareceria razoável pensar que com efeito as passagens sucessivas dos micróbios além de lhe atenuarem a virulência,—procurando *aclimata-lo*, o alteravam, o modificavam nas suas propriedades, todavia na prática isto não sucede completamente.

O agente microbiano cultivado longamente nos meios **perde com efeito parte da sua virulência** mas este facto é até de todo o ponto favorável; por outro lado, porém, **a vitalidade do micróbio**, isto é, a sua aptidão a desenvolver-se vae aumentando, cresce rapidamente a cada nova sementeira, e esta é uma circunstância altamente apreciável.

Para a preparação das nossas vacinas, utilizamos sempre culturas de algumas semanas,—colónias repicadas 3, 4 ou mais vezes,—na certeza de que para a preparação da emulsão se emprega uma cultura proveniente de uma repicagem feita na véspera — 24 horas antes.

CAPÍTULO IV

Preparação da emulsão

Emulsão propriamente dita. Doseamento.

Esterilização.

A preparação da emulsão vacinal não é, como á primeira vista se poderia julgar, uma operação breve e de fácil execução. Pelo contrário, compreende um certo número de operações parciais de factura por vezes muito trabalhosa.

Uma vacina não é mais do que, em resumo uma emulsão microbiana, doseada e esterilizada. Assim, esta parte da preparação das vacinas está por sua natureza dividida em 3 partes —
PREPARAÇÃO DA EMULSÃO PROPRIAMENTE DITA.—
SEU DOSEAMENTO.—SUA ESTERILIZAÇÃO.

É, pois, segundo essa ordem que as vamos apresentar:

Preparação da emulsão propriamente dita

Depois de termos obtido uma cultura pura do gonococo, e praticado algumas passagens com o fim de o adaptar ao meio **diminuindo a sua virulencia e aumentando a sua vitalidade**, fazemos uma última repicagem para alguns tubos de meio que colocamos na estufa a 37°. Passadas 24 horas as colónias mostram-se exuberantes e próprias para serem **emulsionadas**.

A operação da EMULSÃO consiste essencialmente em *dissolver* em sôro fisiológico o producto das culturas, isto é, as **colónias microbianas desenvolvidas**. Em sôro fisiológico, dissemos nós, não porque seja esse o único líquido próprio para a emulsão, mas porque é a solução clássica, a que foi usada por Wright e tem sido empregada pela maior parte dos *preparadores* de emulsões microbianas. Ultimamente, M. M. Nicolle e Blaizot ⁽¹⁾ de Tunis, tendo utilizado em vez da solução fisiológica de cloreto de sódio, uma solução idêntica de fluoreto de sódio a 7 ‰, depois de cuidados estudos, reconheceram nesta última a propriedade de evitar a

(1) Charles Nicolle et L. Blaizot — «Les vaccins fluorés dans les vaccinations préventives et le vaccinothérapie» Archives de l'Inst. Pasteur de Tunis. t. ix f. 1. 1914. Pag. 1 a 29.

Bul. de l'Inst. Pasteur de Paris.—N.º 2—30. t. 1915. Pag. 53.

autolise, conservando o agente num estado sensivelmente vizinho ao do microbio vivo. Assim, começaram a empregar sistematicamente para a preparação da emulsão vacinal a solução fluoretada.

Nós usámos uma e outra, comparámo-las, e em verdade, a solução fluoretada pareceu-nos a mais propícia para a conservação do agente, assegurando-lhe o mínimo de alteração, e por isso a preferímos e a aconselhamos.

Eis como procedemos para a preparação prática da emulsão:

a) Colocam-se os tubos de cultura, de que previamente se verificou a pureza, em um suporte de madeira.

b) Com uma pipeta graduada, esterilizada, toma-se uma porção da solução fluoretada (ou da cloretada) e gota a gota vão-se juntando 3 c. c. da solução a cada um dos tubos.

c) Toma-se agora cada tubo de per si, e com a ansa ou a espátula de platina estéril, procura-se destacar suavemente as colónias da superfície do meio. Como já dissemos, estas são muito viscosas e aderentes, e assim, é necessário usar de uma grande delicadeza **afim de não levantar e destacar também partículas do meio**. As colónias soltas, descem ao fundo do tubo onde formam uma pequena mancha esbranquiçada.

d) Em seguida, com uma pipeta de Pasteur de médio calibre, esterilizada, retira-se o con-

teúdo líquido de cada tubo, tendo o cuidado de recolher todo o *culot* microbiano, e junta-se num frasco de rolha esmerilada, esterilizado.

Para Wright e para a maior parte dos autores, a operação da EMULSÃO devia considerar-se terminada por aqui, e, depois de uma agitação manual ou mecânica procediam imediatamente ao seu doseamento e esterilização. Era isso um grave defeito, donde resultavam notáveis inconvenientes: 1.º a grande toxicidade da vacina; 2.º não só a dificuldade do DOSEAMENTO, mas ser motivo de grandes erros; 3.º contribuir para a turvação da emulsão.

¿ Por que era um grave defeito?

Porque, como se compreende, por mais bem conduzida que tenha sido a *grattage* das colónias da superfície do meio, nunca se consegue deixar de levantar algumas partículas da gelose, que facilmente são arrastadas com o líquido. Dêste modo, estas partículas embora finíssimas, além de turvarem o líquido e dificultarem a sua titulação, dada a toxicidade dos meios peptonados — eram motivo, ao serem injectadas, de intensas reacções. Era a presença destes *restos* do meio que, para nós, mais contribuía para a grande toxicidade das vacinas.

Hoje, desde Nicolle, evitam-se facilmente estes inconvenientes — desde que se proceda á LAVAGEM DOS MICRÓBIOS, operação que tem como resultado eliminar toda a *trace* das substâncias do meio.

Esta operação, relativamente simples, realiza-se assim:

a) Distribui-se, por meio de pipetas esterilizadas, a emulsão microbiana que obtivemos, em tubos de centrifugação esterilizados, e colocam-se êstes em seguida no respectivo aparelho que se faz accionar. Alguns minutos bastam para fazer a separação entre o elemento líquido inútil e o *culot* microbiano.

b) Por meio de pipetas retira-se o parte líquida que se rejeita, e junta-se ao *culot* de cada tubo de centrifugação alguns c. c. de soluto fluoretado, procurando por uma pequena agitação que pode ser auxiliado com uma vareta de vidro esterilizada, dissolver novamente o *culot*.

c) Procede-se em seguida a nova centrifugação, rápida, podendo ainda fazer-se uma terceira, na certeza de que se rejeita de todas as vezes a parte líquida e se aproveita só o depósito microbiano.

Assim, pois, por meio de lavagens sucessivas se consegue—*lavar* o agente, e obtê-lo absolutamente isento de substâncias estranhas e nocivas.

E' nesta ocasião que M. M. Nicolle e Blai-zot (1) procedem, para preparar as suas vacinas

(1) It «Un vaccin antigonococique» et «Vaccins stables et atoxiques à propos d'un vaccin antigonococique».

C. R. Acad. Sciences T. CLVII. 6 oct. 1913. pag. 551 et 24 nov. 1915. pag. 1009.

antigonocócicas, à junção do **sinococo**,— ao gonococo, na proporção de 9 partes do primeiro para 1 do segundo.

A esta associação atribuem os autores a pouca toxicidade das suas vacinas e as suas propriedades curativas.

Nós usámos de todas as vezes para a preparação das nossas emulsões exclusivamente de culturas puras de gonococos e nem por isso os efeitos curativos das vacinas foram menos notáveis ou a sua toxicidade se mostrou maior.

Lavados, pois, como ficou dito, os agentes microbianos, torna-se necessário doseá-los, e é agora que intervem a operação do DOSEAMENTO, notando que, segundo se segue um ou outro método para realizar esta operação, assim se trata diferentemente o *culot* microbiano.

Doseamento (1)

Uma vacina define-se pelo seu poder activo. O poder activo de uma emulsão vacinal é definido pelo seu grau de concentração em elementos microbianos, isto é, pelo número de micróbios existentes em cada unidade de volume — o centímetro cúbico — da mesma. O DOSEAMENTO das vacinas tem por fim determinar justamente o seu **poder activo**.

(1) Standardisation, *ingl.*; numération, dosage, *fr.*; valutazione, *ital.*

Compreende-se que esta determinação não só seja indispensavel, mas careça ainda de ser feita com um cuidado e rigor absolutos.

«This research has been undertaken because de believe it is the duty of the bacteriologist to standardise and dispense his vaccines with the same accuracy and care as that exercised by the pharmacist in standardising and dispensing his drugs.» (1)

Com efeito. ¿ Porque, exigindo do farmaceutico que nos dê os medicamentos rigorosamente doseados, não havemos de ter igual exigência para com o bacteriologista que nos prepara as emulsões vacinais? ¿ Não são uns e outros empregados com um mesmo fim curativo, e não sabemos nós que é justamente na dose que reside em grande parte a eficácia da terapêutica medicamentosa?

Alguns autores e notavelmente Allen (2) consideram **uma das mais notaveis causas de insuccesso da Bacterioterapia** — ou ineficácia absoluta, ou excesso de reacção — **a falta de exatidão no DOSEAMENTO das emulsões.** Os inglêses teem mes-

(1) Ernest E. Glynn, Liverpool. «Improved methods of standardising bacterial vaccines in haemocytometer chambers».

The Lancet. April. 11. 1914. Pg. 1028.

(2) R. N. Allen, Lond. «Vaccine Therapy. Its Theory and Practice» 1912. Pg. 122.

mo como principio — «Scientific vaccine therapy will be advanced by scientific exactness.»

É por todos estes motivos que os bacteriologistas teem procurado o processo de tornar ao mesmo tempo rigorosa e prática a determinação do poder activo das vacinas, quere dizer,— de proceder ao seu DOSEAMENTO.

Podem resumir-se a tres os principais métodos empregados até hoje para o DOSEAMENTO das emulsões vacinais antigonocócicas: (1)

O método de Wright, o dos hematímetros e o das pesagens

Método de Wright

O método clássico por excelência, o primeiro e aquele que mais tem sido utilizado até hoje, é certamente o que Sir. Alm. Wright apresentou em 1902. Êste autor, depois de ter procedido a numerosos estudos relativos ao método de contagem dos glóbulos sanguíneos existentes em uma certa quantidade de sangue, teve a ideia de aplicar o mesmo método à contagem dos microorganismos existentes numa emulsão va-

(1) O método da *ansa titulada de Buchner*, que se emprega usualmente para o Doseamento das vacinas anties-tafilocócicas, não póde ser utilizado no nosso caso, por ser muito inexato.

cinal. Este método que exige a prévia emulsão do agente, consiste essencialmente em determinar o número relativo de microorganismos e de glóbulos rubros contidos em uma mistura em partes iguais de emulsão vacinal e de sangue humano. Desde que o número de globulos rubros existentes normalmente no sangue é conhecido — 5 milhões por mm. c. — o número de bactérias contido em 1. c. c. de emulsão póde ser facilmente deduzido.

O método de Wright consiste pois, em uma contagem de microbios por comparação.

A sua execução prática compreende vários tempos que podemos para maior facilidade de exposição, dividir em 3 partes :

1.^a parte — Preparação dos elementos indispensáveis :

a) A pipeta de Wright, que não é mais do que uma pipeta vulgar de Pasteur, terminada inferiormente por um tubo capilar bastante extenso, e tendo adaptada na extremidade superior uma *tétine* de cauchu. Na extremidade afilada marca-se, a uma pequena distância da ponta — 1 a 2 cm. — um traço de tinta, o que constituirá a unidade de volume.

b) Lâminas de vidro para preparações microscópicas, perfeitamente polidas, desengorduradas e secas.

Para assegurar o que, se procede assim :

a) lavam-se as lâminas em uma solução de

ácido clorídrico a 20 0/0, durante 8 minutos, em seguida

b) lavam-se em agua distilada, depois deixam-se durante 5 minutos em acido sulfúrico afim de destruir toda a substância orgânica,

c) e conservam-se depois de as ter lavado com agua distilada, em uma mistura de alcool e eter, em partes iguaes. A perfeita e completa polidês das lâminas, tem uma importância máxima, pois que é primacial condição para a distribuição uniforme dos microorganismos e para a sua contagem exacta.

d) Uma solução de citrato de sodio a 2 0/0 para juntar ao sangue e evitar a sua precipitação rápida ao misturá-lo com a emulsão.

d) Córante de Leishman que é de uso corrente em qualquer laboratório.

e) Um microscópio, sendo a ocular marcada por dois diâmetros em angulo recto.

f) Finalmente, uma pequena quantidade de sangue humano que pôde ser obtido na ocasião por meio de picada num dedo, e um frasco esterilizado contendo a emulsão microbiana cujo

(1) Almroth E. Wright—«Method of Determining under the Microscop the number of micro-organismes contained in a Bacterical culture».

The Lancet. July. 5. 1902. II Pg. 11.

R. W. Allen. (Lond.) «Vaccine Therapy its theory and practice.» *The stardardization of the vaccine.* P. 96.

D. W. Carmalt Jones «Therapeutic. Inoculation.»

DOSEAMENTO se pretende fazer. Esta emulsão não é mais do que o *culot* microbiano obtido como já indicamos, adicionado de uma determinada quantidade de soluto de fluoreto de sódio e submetido em seguida a uma agitação manual ou mecânica durante 1 hora, afim de facilitar a homogenização.

2.^a parte — Execução de mistura :

a) Com a pipeta capilar de Wright passada rapidamente pelo bico de Bunsen, e exercendo uma ligeira pressão na *tétine* e descomprimindo-a em seguida a pouco e pouco, aspira-se, 1 ou 2 volumes (medidos pela unidade de volume marcada na pipeta) do soluto de citrato de sódio, depois uma pequena bôlha de ar, seguidamente 1 volume de sangue, nova bôlha de ar e finalmente 1 volume da emulsão.

b) O todo é expulso sobre uma das lâminas de vidro, e bem homogeneizado por sucessivas aspirações e expulsões feitas com a pipeta.

c) Executada o melhor possível a mistura dos 3 componentes, dividimo-la em 2 partes sensivelmente iguais, e estendêmo-las cuidadosamente em 2 lâminas, passando-as uma pela outra.

d) As 2 preparações mais ou menos uniformes, secam-se ao ar, coram-se com o Leishman durante 3 minutos, e em seguida, cobrem-se com água destilada que se rejeita ao fim de 15 minutos.

e) As preparações são agora lavadas com

água destilada e enxutas com papel de filtro. E só agora se procede à

3.^a parte — Contagem propriamente dita.

a) Coloca-se uma das preparações na platina do microscópio. Como a ocular tem gravados 2 diâmetros em ângulo recto, o campo microscópico aparece-nos dividido em 4 quadrantes. Assim, a contagem é muito simplificada. Mentalmente, divide-se a superfície da preparação em 9 áreas iguais como facilmente se percebe pela figura junta:

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16

Em seguida conta-se um campo microscópico em cada um dos ângulos indicados, e assim é contado um total de 16 campos.

b) O número de glóbulos rubros contados em cada ângulo é apontado em uma coluna vertical, e o de microorganismos em outra. Soma-se cada coluna e assim se obtém o número de glóbulos e de bactérias contados em 16 campos microscópicos.

c) Isto mesmo é executado com a outra preparação e os dois resultados são somados. Estes 32 campos contados podem ser considerados

suficientes para dar uma conta bastante exacta.

O cálculo faz-se assim: Suponhamos que a soma dos glóbulos rubros contados nos 32 campos é igual a 555, e a dos gonococos contados nos mesmos 32 campos é igual a 60, logo 555 glóbulos rubros correspondem a 60 gonococos. Mas se 1 mc. c. de sangue contem 5000.000 de glóbulos rubros, e nós tomámos para fazer a preparação volumes iguais de sangue e de emulsão, a 5000.000 corresponderão X gonococos — $X = \frac{5000.000 \times 60}{555} = 540.540$. por mc. c., portanto a 1 c. c. correspondem — 540.540.000, isto é, 1 c. c. da emulsão bacteriana examinada contem aproximadamente (despresando as fracções) 500 milhões de gonococos.

Como se vê, o método de Wright é muito engenhoso e aparentemente simples. Todavia na prática, torna-se por vezes de mui difícil execução. Entretanto, foi durante alguns anos o único utilizado para o doseamento das vacinas, porém, desde que se reconheceu a irregularidade dos seus resultados e os erros grosseiros a que por vezes conduzia foi quasi completamente pôsto de parte e substituído por outros de mais confiança e mais simples, e hoje, apenas por curiosidade é empregado.

É sobretudo a Harrison e a Leishman ⁽¹⁾ que se devem os estudos sobre o método de Wright, e o conhecimento dos resultados inexactos a que o seu emprego conduz. Êstes autores examinando a mesma preparação por diferentes vezes chegaram a obter diferenças de 50 a 100 %!

Os principais factores que parecem intervir na inexactidão do método, são :

1.º— A dificuldade em conseguir uma perfeita preparação, em que a relação dos glóbulos e dos germenés seja uniforme.

2.º— A aglutinação que freqüentemente ocorre e que leva a grandes diferenças na numeração dos microorganismos.

3.º— A parte representada pela acção bacteriolítica do fluido sanguíneo que conduz quasi sempre a uma baixa do número de germens.

4.º— A possibilidade de, ao proceder à coração e às lavagens da preparação uma parte das bactérias ser arrastada, e ainda os glóbulos ficarem à superfície e occultarem os microbios.

Por todas estas razões, o método de Wright não merece uma grande confiança, e por isso mesmo é substituído com vantagem por qualquer dos que vamos apresentar em seguida.

(1) W. S. Harrison. — Maj. Leishman. — «The blood changes following typhoid Inoculations.»
Journal Royal Army Medical Corps. 1905. v P. 1.

Pelo que diz respeito ao seu emprego com o fim de dosear os gonococos existentes nas vacinas que preparámos, devemos dizer que o tentámos, mas com tal insucesso, que renunciámos absolutamente a seguí-lo.

Método dos hematímetros

O método mais simples e mais sciéntifico de doseamento das emulsões vacinais é o da contagem directa dos microorganismos por qualquer dos hematímetros.

Este método é perfeitamente similar ao que é utilizado para a contagem dos glóbulos do sangue e além de se fundar nos mesmos principios, emprega-se o mesmo instrumental que tão conhecido é.

Por isso, não nos deteremos em supérfluas explicações teóricas e descritivas. Apenas diremos que para executar o método são necessários os seguintes elementos:

1.º— Uma solução corante para, corando os germenés, os fazer sobressair de modo a poderem ser contados.

2.º— Uma pipeta capilar de vidro destinada a fazer os transportes dos líquidos que entram na operação.

3.º— Uma câmara de contagem com a respectiva lamela.

4.º— Um microscópio completo.

Como no MÉTODO DE WRIGHT, exige-se aqui

igualmente a emulsão prévia do agente. Já indicámos como se preparava.

Este método foi apresentado pela 1.^a vez, em 1908, por Mallory e Homer Wright que empregaram como câmara de contagem um hematómetro de $\frac{1}{100}$ mm. (altura da câmara), uma lamela plana, uma ocular a sêco, e sem solução corante.

Tambem em 1908 Leth Murray usou o hematómetro comum ou conta-glóbulos Thoma-Zeiss de $\frac{1}{10}$ mm., uma lamela ordinária que apesar de escolhida não era ópticamente plana, e uma solução de Giemsa fraco.

Para diminuir os defeitos que estes processos apresentavam, Glynn e Cox em 1911 utilizaram a câmara Helber de $\frac{2}{100}$ mm., com uma lamela especial ópticamente plana e rígida, e uma solução fraca de carbol-tionina.

Em 1912, os irmãos Scott ⁽¹⁾ empregaram uma câmara parecida com a de Thoma-Zeiss, mas diferindo desta em ser de $\frac{1}{100}$ mm. de altura em vez de $\frac{1}{10}$ mm., o objectivo de imersão e uma solução de Giemsa.

Ainda em 1914 Glynn introduziu algumas modificações, mas estas só na espessura da lamela e na sua distância á objectiva.

(1) T. Rodley Scott and G. Rodley Scott. «Standardisation of Vaccines».

The Lancet. 1.^o vol. 1912. Pg. 880.

Como se vê, várias câmaras de contagem tem sido utilizadas e bem assim várias soluções corantes.

Das câmaras, temos a de Toma-Zeiss de $\frac{1}{10}$ mm., a de Helber de $\frac{2}{100}$ mm. e a de Scott de $\frac{1}{100}$ mm.

¿ Qual destas será a mais conveniente?

Difícil será dizer porque todas elas são muito próprias. Glynn (1) afiança que a de Helber de $\frac{2}{100}$ mm. deve ser a preferida pois que facilita muito a contagem, porque, além de outras razões, utiliza menos quantidade de fluido, e devido à menor altura da câmara, as bactérias não só conservam os seus movimentos brownianos durante menos tempo, mas aderindo mais facilmente à face inferior da lamela, fixam-se, e contam-se assim mais facilmente.

Todavia exige uma câmara especial, o que não sucede empregando, por exemplo, o contaglôbulos Thoma-Zeiss que existe em todos os laboratórios, e que por isso, é muito mais económico.

Quanto à de Scott (2) de $\frac{1}{100}$, possuindo as vantagens da de Helber, tem ainda sobre esta a conveniência de facilitar os cálculos e também a de ser muito mais barata.

(1) Ernest E. Glynn. «Standardising of vaccines by Haemocytometer Methods». The Lancet. April-11-1914. Pg. 1028.

(2) G. Rodley Scott, ut. supra.

Afigura-se-nos a mais conveniente de todas, e por isso descreveremos em breve o seu emprego.

Relativamente às soluções corantes, a qual das que tem sido indicadas — giemsa, carbol-tionina, violeta de genciana, azul de metileno, etc., devemos preferir?

A de carbol-tionina dilui muito bem, é isenta de precipitado, e cora mais intensamente, mas determina quasi sempre a aglutinação das bactérias.

A de violeta de genciana e a de azul de metileno são recomendadas por Allen, (1) mas tem o defeito de precipitarem muito rapidamente e embarçarem a contagem. Depois, conservam-se mal.

Resta-nos a de Giemsa, que, se precipita algumas vezes, e neste caso filtra-se, em compensação, não aglutina os micro-organismos. É por isso a que preferimos, aconselhando todavia também a de carbol-tionina que é igualmente muito útil.

A pipeta que se utiliza é a mesma qualquer que seja o processo empregado.

Eis, como na prática se executa; mas antes, temos de considerar o material operatório:

1.º — Uma câmara de contagem de $\frac{1}{100}$ mm. de altura, e a respectiva lamela ópticamente plana e rígida.

(1) R. W. Allen. Ut. supra. Pg. 99.

2.º— Solução corante:

Giemsa — Giemsa 5 p. Cloreto de sódio 0, 1 p. Formalina 4 p. Água destilada 100 p. Filtra-se e esteriliza-se.

ou *Carbol-tionina* — Sol. Mãe A — Tionina (Grubler) saturada em álcool absoluto. Sol. Mãe B — soluto a 1 % de ácido carbólico em água.

Antes de usar toma-se 1 p. da solução A para cerca de 40 p. da sol. B. A concentração varia de resto para cada agente. Para o gonococo é de $\frac{1}{40}$.

3.º— Uma pipeta capilar ordinária de vidro, esterilizada, marcada com um traço de lápis a uma certa altura — é a unidade do volume.

4.º— Dois vidros de relógio, esterilizados e secos.

E' claro, todo este material absolutamente lavado e enxuto, e isento o mais possível de poeiras.

Posto isto, passa-se à operação propriamente dita:

a) Filtram-se pelo papel Chardin algumas gotas da solução corante para um dos vidros de relógio.

b) Com a pipeta toma-se 1 vol. da emulsão bacteriana previamente agitada, e 1 vol. da solução corante e misturam-se no outro vidro de relógio.

c) Toma-se uma gota desta mistura, e coloca-se na câmara de contagem, tendo o cuidado em que o líquido a ocupe completamente.

A seguir, cobre-se com a lamela que deve ser absolutamente pulida.

d) Coloca-se na platina do microscópio, deita-se uma gota de óleo de cedro, foca-se com o objectivo de imersão e examina-se.

e) Contam-se os gonococos existentes, por exemplo, em 50 quadrados. Suponhamos que a soma dos micróbios contados é igual a X: multiplica-se por 2 da diluição, por 40.000 da área do quadrado em mm. e por 1000 para referir o resultado ao mm. c.—o total divide-se por 50. Assim, temos $X \times 2 \times 40.000 \times 1.000 \div 50 = 1.600.000 X$ por c. c. Assim, se obtem facilmente o número de gonococos por c. c.

O método é, como se vê, muito fácil e rápido e o resultado bastante rigoroso e uniforme.

Todavia requiere o agente microbiano absolutamente independente, não aglutinado, o que muitas vezes não succede, por exemplo, com o gonococo, e assim o resultado é menos exacto.

Entretanto é muito empregado, e sobretudo quando o agente se emulsiona bem e não aglutina, os resultados obtidos pela contagem são dignos de confiança.

Pode utilizar-se também o conta-glóbulos de Thoma-Zeiss (1), e a operação realisa-se simi-

(1) D. Leith Murray. «The Standardisation of Vaccines». British Medical Journal. 1908. I. Pg. 685 e 1913. I. Pg. 717.

The Lancet. 1908. I. Pg. 790 e 915. I. 894.

larmente, a diferença está sómente nas contas, mas o processo a seguir,— igual ao que se utiliza para contar glóbulos de sangue é já sufficientemente conhecido, para o não repetirmos aqui.

Merece ainda ser mencionado um processo muito seguido em Itália e devido ao Prof. Valagussa (1) de Roma, que utiliza uma câmara de contagem comum, e ao mesmo tempo uma ansa de platina calibrada.

Método das pesagens (2)

Êste método de doseamento das emulsões vacinais, de todos o mais moderno, não exigindo a emulsão prévia do agente, e podendo aplicar-se a todos os micro-organismos, foi ideado e empregado pela primeira vez por Wilson e Dickson.

Consiste essencialmente em determinar com todo o rigor o pêso do *culot* microbiano, isto é, do resíduo lavado das colónias microbianas, obtido como a pg. 99 deixámos dito, e aplicando uma tabela própria que nos dá a correlação entre o número de microorganismos e o pêso em miligramas do resíduo microbiano, facilmente

(1) Francesco Valagussa. «Un metodo di rapida valutazione del contenuto in germi dei vaccini».

Il policlinico—25 out. 1914. Fasc. 43. Pg. 1505.

(2) Gravimetric method *ingl.*

se calcula o número total de agentes microbianos contidos num certo pêso de *culot*.

Êste método tem, como vemos, por base indispensável uma tabela que se deve aos próprios autores do método, para a composição da qual se entregaram a delicados estudos comparando os resultados obtidos doseando uma mesma emulsão de cada microorganismo pelos 3 métodos de doseamento. Pelo que diz respeito ao gonococo de Neisser os referidos autores chegaram à conclusão de que 1 mgr. de resíduo sêco corresponde a 4.500 milhões de gonococos, enquanto o mesmo pêso de resíduo húmido corresponde apenas a 500 milhões.

Como dissemos determina-se o pêso do *culot* microbiano.

Ora este pêso pode referir-se ao *culot* húmido ou sêco que, como vimos, apresentam diferenças de pêso muito notáveis.

Assim, o método de doseamento por pesagens tem diferente execução segundo se utiliza o resíduo sêco ou não.

Eis como praticamente se executam :

1.º — CASO EM QUE SE UTILIZA O RESÍDUO SECO:

Ê o método de Wilson e Dickson (1) na sua pureza. Para a sua execução necessita-se do seguinte material.

(1) W. James Wilson and Charles Dickson. «A rapid gravimetric method of standardising vaccines.»

Journal of Hygiene, May 3-1912. T.º 1. vol. XII. P. 56.

1.º) Uma lâmina de platina de forma quadrangular, medindo 3×5 cm. de lado.

2.º) Um pequeno tubo de vidro, arrolhado de algodão, esterilizado.

3.º) Uma câmara especial de dessecação que consiste em uma garrafa ou balão de larga abertura, a qual é obturada por uma rôlha de cauchu atravessada por 2 tubos de vidro um dos quais se liga a uma bomba aspiradora Sprengel ou directamente, ou por intermédio do condensador Liebig, enquanto que o outro, tem uma torneira, e está ligado a uma ampula terminal contendo algodão hidrófilo que actua como filtro quando, no fim da operação, o ar é admitido no dessecador.

Pôsto isto trata-se de operar.

a) Por meio de pinças toma-se a lâmina de platina e aquecendo-a à chama de um bico de Bunsen, leva-se ao rubro. Depois do que se enrola e se introduz no tubo de vidro que se enrolha.

b) Em seguida pesam-se cuidadosamente numa balança de precisão, levando o cálculo até às centésimas.

c) Passado o tempo suficiente para a lâmina de platina arrefecer completamente, retira-se do tubo de vidro, desenrola-se, e tomando com uma espátula de platina o *culot* microbiano, espalha-se à superfície da lâmina de platina. Depois do que se enrola novamente e se introduz no tubo de vidro.

d) O tubo é então colocado no aparelho de dessecar e este, por sua vez coloca-se ou numa estufa de ar quente, ou melhor em banho maria a 50° c., enquanto que a bomba Sprengel é posta a funcionar.

e) A dessecação completa é obtida em menos de 15 minutos; então abre-se cautelosamente a torneira que interceptava a comunicação com o exterior, e o ar é admitido a pouco e pouco no balão de dessecação a fim de arrefecer o tubo e a lâmina nêle contidos.

f) Estes últimos são novamente pesados com todo o cuidado em uma balança muito sensível, e o valor da produção bacteriana é rigorosamente determinado pela diferença entre o pêso agora obtido, e o que foi achado na primeira pesagem. (b)

g) Depois de determinado o pêso do resíduo microbiano, sêco, a lâmina de platina é retirada do tubo, desenrolada, e colocada em uma pequena *cuvette* de porcelana, esterilizada. Com um pequeno pilão humedecido na extremidade inferior com água distilada, ou mesmo com uma simples vareta de vidro, esterilizada, fricciona-se, procura-se desagregar o resíduo sêco, e vae-se juntando a pouco e pouco sôro fisiológico ou melhor, soluto de fluoreto de sódio até obter uma emulsão uniforme. Em menos de 5 minutos a emulsão está perfeita e completa.

A quantidade total de solução cloretada ou

fluoretada empregada não é arbitrária; depende do grau de concentração que nós queremos dar à emulsão vacinal mãe. Em regra, juntam-se primeiramente, gôta à gôta 5 c. c., e depois é que se adiciona a quantidade necessária para que o grau de concentração corresponda a 500 ou 1000 milhões de gonococos por c. c.

2.º— CASO EM QUE SE UTILIZA O RESÍDUO HÚMIDO:

Neste caso não se necessita de material operativo especial, a não ser 1 ou mais (conforme a quantidade do *culot*) pequenos e finos tubos de centrifugação com rôlhas de cauchu.

Iniciá-se a operação a partir do *culot* microbiano que obtivemos depois de sucessivas lavagens e centrifugações.

a) Toma-se o *culot* por meio de uma pipeta de médio calibre esterilizada, e *dissolve-se* mais uma vez em alguns c. c. fluoretada contidos no tubo de centrifugação de que falámos, e coloca-se êste no respectivo aparelho que se faz accionar. Esta centrifugação deve ser um pouco demorada — 15 minutos, afim de que a separação da parte líquida da sólida, se faça mais nitidamente.

b) Depois disto, rejeita-se por meio duma pipeta fina toda a parte líquida separada, auxiliando a sua exclusão por meio de papel de chupar.

c) Procede-se agora à pesagem na balança de precisão do tubo contendo o *culot*, isento o

mais possível de liquido, e o resultado é cuidadosamente registado.

d) Seguidamente, com uma pipeta de médio calibre esterilizada retira-se do tubo de centrifugação todo o *culot* microbiano, e dilui-se em uma pequena mas certa quantidade de solução fluoretada (5 c. c.) contida em um frasco de rolha esmerilada, esterilizado.

e) Livre do *culot*, o tubo de centrifugação é agora novamente pesado com todo o cuidado, e, pela diferença entre o pêso agora obtido e o que obtivemos na 1.^a pesagem c), se determina o pêso em mgr. da massa microbiana e do liquido que ainda conserva.

f) Em seguida, ajunta-se à emulsão obtida d), a quantidade de sol. fluoretada suficiente para prefazer o grau de concentração exigido.

Nós dissemos que a 1 mgr. de *culot humido* correspondem 500 milhões de gonococos. Admitindo que o pêso do *culot* foi de 150 mgr., nós temos, para obter uma emulsão cujo doseamento seja de 500 milhões por c. c., de lhe juntar 150 c. c. de sol. fluoretada.

O método das pesagens tem, como do que se acaba de vêr, facilmente se depreende, muitas vantagens sobre os outros métodos.

Eis as principais:

a) Com uma balança sensível, obteem-se resultados constantes.

b) É mais fácil e mais rápido do que qualquer dos outros, e não envolve esforço dos olhos.

c) Pode ser aplicado a culturas de todas as bactérias desenvolvidas em meios sólidos, quer deem emulsões uniformes quer não. Sendo a precaução principal a tomar neste método a de retirar as colónias da superfície dos meios sem raspar, e depois passá-las por sucessivas lavagens.

d) Ele reúne na mesma linha o doseamento das nucleo-proteínas com os outros medicamentos.

¿Qual dos processos devemos, porém, preferir — o do doseamento do resíduo sêco ou do húmido?

O 1.º — resíduo sêco — é talvez mais rígoroso, mas é mais difícil e demanda um instrumental especial e mais complicado e por isso mesmo mais caro.

Quanto ao 2.º — resíduo húmido — os seus resultados são muito suficientemente regulares, e é muito mais fácil, mais rápido e mais económico do que o 1.º É por conseguinte o que mais convêm para o DOSEAMENTO das emulsões vacinais em geral — sobretudo em grande escala — e particularmente para as antigonocócicas em que não tem aplicação fácil os outros métodos. É o que a nossa experiência permite aconselhar. A não ser nas primeiras vacinas que pre-

parámos, e em que empregámos os outros métodos de doseamento, o de Wright e o dos hematímetros, sómente a titulo de estudo, nas restantes — 2 monovalentes e 2 polivalentes, empregámos sempre este 2.º processo — o das pesagens do *culot* húmido, e os resultados que obtivemos foram esplêndidos.

Devemos acrescentar que somos os primeiros a empregar este processo para o doseamento das vacinas antigonocócicas.

Como se concebe a adição duma certa quantidade de soluto fluoretado ao *culot* microbiano, não basta para produzir uma boa emulsão. Torna-se necessário homogeneizar a mistura, e para isso procede-se à sua **agitação**.

Esta pode ser manual, mas isso é além de moroso, pouco prático; assim, usam-se aparelhos especiais — *agitadores*, mais ou menos engenhosos. Nós usámos o *agitador* pertencente ao Laboratório Nobre, de construção nacional. É muito simples e muito prático, e os resultados são perfeitos pois imprime ao frasco que contém a emulsão um conjunto de movimentos eminentemente favoráveis para produzirem uma boa homogeneização. A duração da agitação não se pode fixar — mas pode dizer-se que, em geral, 2 a 4 horas bastam.

ESTERILIZAÇÃO

Doseada e agitada, pois, a emulsão vacinal, resta proceder à sua esterilização, visto que, em uma emulsão assim preparada os gonococos **teem** ficado vivos e como as únicas vacinas antigonocócicas empregadas com o fim curativo exigem a morte ou esterilização do agente — torna-se necessário matá-los, isto é, esterilizá-los.

Por conseguinte, a operação da esterilização tem por fim destruir por completo a vitalidade do agente.

Esta destruição, é preciso dizê-lo, limita-se apenas à vitalidade do agente; todas as suas outras propriedades celulares se devem poupar, pois a elas se deve sobretudo o poder curativo das vacinas em que o agente microbiano está morto.

Ha muitíssimos processos para realizar a esterilização. Desde Wright que se **teem** reconhecido e experimentado variadíssimos processos para efectuar a esterilização e ainda hoje, é uma questão muito controvertida pelos bacteriologistas.

Todavia, para sintetisar, podemos reunir em 2 grandes grupos os agentes até hoje utilizados para esterilizar os microorganismos:

Agentes físicos (calor, frio, electricidade...) e **agentes químicos** (antissepticos principalmente). Vamos apresentá-los:

CALOR

A esterilização pelo calor ou melhor pelas altas temperaturas foi o 1.º processo a ser utilizado, e foi Wright quem o preconizou.

Na infância da *Bacterioterapia* em que a técnica da preparação laboratorial não estava mais do que em estado embrionário, para produzir a ESTERILIZAÇÃO o agente era submetido a uma temperatura de 100° em que o agente morria com certeza, mas com a vida, destruíam-se todas as propriedades histoquímicas em que residem sobretudo as propriedades curativas das emulsões vacinais.

Mais cuidados estudos mostraram que é prejudicial atingir tam elevadas temperaturas, e que basta elevar ligeiramente a temperatura além do grau a que o agente perece, para que a sua esterilização seja assegurada.

Assim, o gonococo morre a 50°. Para o esterilizar basta submetê-lo à temperatura de 58° durante 30 a 45 minutos. Praticamente a esterilização realiza-se mergulhando o frasco contendo a emulsão em um banho maría mantido à dita temperatura (58°) e durante 45 minutos.

FRIO

A acção do frio não tem sido muito aproveitada para a esterilização do gonococo, o que está, aliás, de acordo com a sua pequena sensibilidade a acção das baixas temperaturas.

Todavia Nicolle e Blaizot usam para a esterilização das suas vacinas a permanência na geleira a 0° durante 48 horas, afirmando que é o suficiente para se realizar a destruição completa da vitalidade do gonococo. Esta asserção briga um pouco com o conhecido facto que acima apontámos — pois, em verdade, o gonococo resiste admiravelmente às baixas temperaturas.

Que nós saibamos, a acção do frio não foi utilizada por outros bacteriologistas.

ELECTRICIDADE — RAIOS ULTRA-VIOLETAS

M. Maurice Renaud⁽¹⁾ depois de interessantes experiências chegou à conclusão de que as bacterias expostas às radiações duma lampada de quarto com desprendimento de vapores de mercúrio, durante 30 minutos, ficavam privadas das suas propriedades biológicas, enquanto que se conservavam intactas as suas propriedades histoquímicas e em particular a sua toxicidade.

As bactérias assim submetidas, injectadas a indivíduos portadores da infecção respectiva, tinham a propriedade de determinar a aparição de anticorpos em altas doses, e assim, o poder

(1) Maurice Renaud. Communication à l'Académie des Sciences. Seance du 21. VII 1913.
La Semaine Médical, 1913. P. 333.

curativo de tais injeccões era considerável. Esta constatação levou o autor a fazer submeter á mesma acção emulsões vacinais e os resultados foram, segundo afirma, admiráveis, muito superiores mesmo, aos que se obteem com as vacinas esterilizadas pelo calor.

Em França, com efeito as vacinas irradiadas gozam de certa fama.

Nós não experimentámos este processo de esterilização, e assim, coisa alguma afirmamos.

ANTISSEPTICOS

Depois da acção do calor, é a acção dos antissepticos que mais tem sido utilizada para a esterilização das vacinas. Levar-nos-ia longe a enumeração de todos os productos químicos que tem sido preconizados. Eis alguns: acido fénico, fenol, toluol, lisol, formol, cresol, timol, glicerina, tintura de iodo, eter sulfúrico, cloroformio, benzina, várias essencias, etc.

É claro, cada substância tem os seus adeptos; em todo o caso, pode dizer-se que o seu emprego tende a diminuir porque vários inconvenientes do seu emprego como esterilizantes, se tem registado. Destes, os mais notáveis são:—1.º o tornar muito dolorosa a injeccão, e 2.º atenuar á *la longue* o valor curativo da vacina.

Compreende-se que a presença do antisseptico no líquido vacinal determine os maus efei-

tos que lhe atribuem. Êstes são já evitados quando se emprega um antisseptico volátil, como, por exemplo, o **eter sulfúrico**.

Êste foi utilizado com grande sucesso pelo Prof. Vincent para a esterilização das vacinas antitíficas e o seu emprego rapidamente se generalizou a outras vacinas. Nós tivemos também a ideia de o empregar para a esterilização das nossas emulsões e com muita vantagem, devemos dizê-lo.

O eter têm, com efeito, a propriedade de esterilizar uma emulsão bacteriana quando permanece durante algum tempo em contacto com ela, depois, não só favorece a emulsão, mas é de emprego fácil e o que mais é, parece dar logar a combinações bastante estáveis, pois que, evaporado com cuidado, a vacina conserva ainda um leve odor, embora o princípio antisseptico tenha desaparecido. A persistência desta *trace* de eter pareceu-nos tornar as vacinas particularmente assimiláveis, indolores, e assegurar ao mesmo tempo a conservação da vacina. Depois, **o eter respeita integralmente as propriedades curativas das vacinas**. Donde se vê que o seu emprego é muito útil.

Praticamente a esterilização pelo eter realiza-se assim :

a) A emulsão vacinal é colocada em um frasco com rôlha esmerilada, e provido de uma tubuladura lateral.

b) Adiciona-se-lhe **o seu volume** de eter sul-

fúrico puro e abandona-se a si mesmo durante 24 horas, tendo o cuidado de agitar o frasco de tempos a tempos. Ao juntar o eter à emulsão, aquele por ser menos denso ocupa a parte superior do frasco, sem se misturarem. Agitando a mistura, os *grumos* microbianos que ocupavam o fundo do vaso antes da junção do eter, veem à superfície e conservam-se na zona de limitação dos dois líquidos, ficando assim submetidos os gonococos à acção directa do antiseptico, o que é de grande vantagem.

c) Passadas as 24 h. retira-se por decantação a maior parte do eter e o resto é evaporado por meio duma máquina pneumática, tendo o cuidado de mergulhar o frasco em água morna para evitar a congelação. A operação deve considerar-se terminada quando se vê destacarem-se grandes bôlhas da emulsão, o que significa que o eter está todo evaporado e a máquina aspira o ar dissolvido na emulsão. É, como se vê, um processo muito fácil de realizar.

De todos êstes processos de esterilização, experimentámos o da acção do calor e o dos antissepticos.

As vacinas monovalentes n.^{os} 11.075 e 11.300 do registo do Laboratório do Prof. Alberto de Aguiar, foram esterilizadas pelo calor, e bem assim a polivalente A, ao passo que a monovalente registada com o n.^o 11.311 e a poliva-

lente B foram esterilizadas pelo eter. Em qualquer dos casos o resultado foi excelente e comquanto não possamos afirmar que um é superior ao outro, porque as nossas *Observações* não puderam, infelizmente, ser mais numerosas, — pareceu-nos que as vacinas esterilizadas pelo eter são particularmente assimiláveis, absolutamente isentas de reacção e perfeitamente indolores.

Qualquer dos dois processos é recomendavel. Nós, apesar de tudo, preferimos o do eter.

O efeito da esterilização deve ser sempre *controlado*, praticando para isso uma sementeira de algumas gotas da emulsão em um ou dois tubos de meio proprio, que devem ficar absolutamente estéreis.

CAPÍTULO V

Conservação das vacinas

Depois de terminada a esterilização, a emulsão microbiana deve considerar-se já **uma vacina**. Torna-se necessário assegurar a esta não só a conservação das suas propriedades, mas ainda preservá-las de toda a contaminação acidental ulterior por qualquer micróbio banal. É agora que as substâncias antissepticas tem emprego conveniente. Assim, a emulsão vacinal é adicionada dum pequena quantidade ou de toluol, ou de lisol (Wright-Leishman) ou de ácido fénico (Kolle) ou de tricresol ou qualquer outro.

Nós preferimos usar o lisol a 0,4 % ou o tricresol a 0,25 %, tendo sido êste último o que mais empregámos.

Depois da adição do antisseptico conservador deve dar-se uma agitação manual à emulsão vacinal. Feito isto, a vacina está preparada para ser injectada na certeza de que para

produzir os vários graus de concentração requisitados para a clínica, se procede às diluições **que se fazem agora em soro fisiológico**. A emulsão mãe é conservada em frasco de rolha esmerilada, na geleira.

É de toda a conveniencia distribuir desde logo o líquido vacinal em ampolas esterilizadas em vária concentração. Nós fizémo-las de 5, de 10, 15, 25, 50, 100, 100 e 1.000 milhões por cc., que são as doses que vulgarmente se utilizam na clínica.

TERCEIRA PARTE

PARTE CLINICA

CAPÍTULO VI

Parte clínica

Independentemente da inocuidade e da sua estabilidade, qualidades indispensáveis sobre que seria supérfluo insistir, a qualidade primordial de uma vacina é a sua *eficácia*.

Esta qualidade só pode ser apreciada pelos resultados experimentais do seu emprego: é o único processo de julgamento capaz de nos autorisar a ter uma convicção definitiva.

Foi por isso que, comquanto o nosso trabalho tivesse uma feição essencial de estudo de investigação laboratorial, achámos conveniente fazer nós próprios a clínica das vacinas que preparámos. Dedicámos-lhe todo o nosso cuidado e atenção e todo o tempo que tínhamos disponível. As observações pessoais foram feitas e redigidas com toda a minudência, todavia, vemo-nos obrigados para não estendermos demasiadamente o nosso trabalho, a apresentá-las aqui em resumo.

— Todas as secreções dos nossos doentes foram cuidadosamente analisadas ou nos laboratórios da Faculdade de Medicina, ou no do Prof. Alberto de Aguiar ou ainda no do Hospital Militar. Assim, não especificando o resultado, deve julgar-se que foi positivo, quere dizer, que a análise revelou a existencia de gonococos.

— Todas as injeções foram praticadas na região nadegueira nos pontos clássicos.

— As vacinas foram injectadas nas diversas doses que vão indicadas e sem adição alguma, a mais, de soro fisiológico.

— Ao mesmo tempo que se fez o tratamento vacinal — o tratamento interno por assim dizer, não deixou de fazer-se também o tratamento local pelos antissepticos.

— As injeções foram praticadas com intervalos variaveis que só o exame do doente podem marcar.

OBSERVAÇÕES

Uretrites agudas e crónicas

OBSERVAÇÃO I

M. A. D., 23 anos, sold. Hospital Militar. Bul. 6.798.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 5 a 21-IV — 5 injeccões de
autovacina. (N.º 11.311. Lab. Aguiar).

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Injecções indolores. Sem reacção alguma.
Total de gonococos injectados — 80 milhões.

OBSERVAÇÃO II

J. M., 22 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.355.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 4 a 25-III — 5 injeccões da
vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Injecções indolores. Cura obtida depois de
injectados 65 milhões de gonococos. Sem reacção.

OBSERVAÇÃO III

R. S. M., 22 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.608.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 8 a 23-III — 4 injeções da vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Sem reacção alguma. A cura foi obtida depois de um total de 50 milhões de gonococos injectados.

OBSERVAÇÃO IV

M. F. P., 21 anos, sold. H. Militar. Bul. 7.007.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 13 a 24-IV — 4 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Sem reacções. Soma dos gonococos injectados — 55 milhões.

OBSERVAÇÃO V

M. B. C., 26 anos, sold. H. Militar. Bul. 7.108.

Diagnóstico — Uretrite gonocócica aguda.

Tratamento — Desde 22-IV a 8-V — 5 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma dos gonococos injectados — 100 milhões.

OBSERVAÇÃO VI

A. P. P., 26 anos, sold. H. Militar. Bul. 7.157.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 22-IV a 3-V — 4 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma de gonococos injectados — 80 milhões.

OBSERVAÇÃO VII

J. P., 26 anos, estudante.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica (?) aguda.

Bacteriologia — Numerosos diplococos tomando o Gram.

Tratamento — Desde 2 a 9-IV — 3 injeções.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma de gonococos injectados — 30 milhões.

OBSERVAÇÃO VIII

L. J. G. C., de 29 anos, 1.º cabo. H. Militar. Bul. 7.214.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 30-IV a 18-V — 6 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Leve reacção geral á 7.ª inj. — Soma de gonococos injectados — 405 milhões.

OBSERVAÇÃO IX

A. C., 21 anos, sold. H. Militar. Bul. 7.219.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 29-IV a 12-V — 5 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma de gonococos injectados — 105 milhões.

OBSERVAÇÃO X

M. M. O., 30 anos, sold. H. Militar. Bul. 7.322.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 8 a 21-V — 5 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma de gonococos injectados — 130 milhões.

OBSERVAÇÃO XI

A. C., 22 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.013.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 24-II a 4-III — 3 injeções da vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Dose total de gonococos injectados — 30 milhões.

OBSERVAÇÃO XII

J. P., 27 anos. Doente e Obs. a Dr. Castro Henriques.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica crónica.

Tratamento — Desde 23-IV a 6-V — 6 injeções da vacina polivalente A.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma dos gonococos injectados — 200 milhões.

OBSERVAÇÃO XIII

J. A. G., 21 anos, sold. H. Militar. Bul. 5.662.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica crónica.

Tratamento — Desde 4 a 15 III — 4 injeções da vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma dos gonococos injectados — 50 milhões.

OBSERVAÇÃO XIV

A. R. C., 23 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.012.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica crónica.

Tratamento — Desde 9 a 19-III — 3 injeções da vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Soma de gonococos injectados — 30 milhões.

Cistites. Orqui-epididimites. Prostatites.

OBSERVAÇÃO XV

J. S., 23 anos, 1.º cabo s. Hospital Militar. Bul. 6867.

Diagnóstico — Uretrite e cistite agudas.

Tratamento — Desde 12 a 29-IV — 5 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Cura da cistite e da uretrite.

Obs. — Sintomas febrís cederam á 2.ª inj. A cistite curou primeiro que a uretrite. Total de gonococos 105 milhões.

OBSERVAÇÃO XVI

M. F. G., 21 anos, sold. Hospital Militar. Bul. 7005.

Diagnóstico — Uretrite crónica. Cistite aguda.

Tratamento — Desde 12-IV a 4-V — 6 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Cistite e uretrite curadas.

Obs. — A febre desceu depois da 1.ª inj. O estado geral melhorou depois da 3.ª. A cistite curou depois da 4.ª. Soma de gonococos injectados — 120 milhões.

OBSERVAÇÃO XVII

G. T. B., 22 anos, barbeiro. Obs. do Dr. Castro Silva.

Diagnóstico — Uretrite e cistite crônicas.

Tratamento — Desde 30-IV a 20-V — 7 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Muito melhorado.

Obs. — A 1.^a inj. determinou imediatas melhoras que se acentuaram depois. Contudo a cura completa não foi obtida.

OBSERVAÇÃO XVIII

A. L., 24 anos. Doente. Obs. do Dr. Castro Henriques.

Diagnóstico — Uretrite blenorrágica aguda e orqui-epididimite direita.

Tratamento — Desde 28-IV a 27-V (orquite desde 26) — 5 injeções da vacina polival. A — Total de gonococos — 65 milhões.

Resultado — Uretrite curada e a orquite *abortada*.

Obs. — A uretrite mostrou-se a principio persistente, depois, desde que se declarou a orquite com sintomas agudos, foi feita a 6.^a inj. que não só curou a uretrite, mas *abortou* por completo a orquite.

OBSERVAÇÃO XIX

J. P. M., 20 anos, estudante. Doente. Obs. do Dr. R. Seixas.

Diagnóstico — Uretrite gonocócica crônica e orqui-epididimite aguda unilateral.

Tratamento — Desde 19 a 30-III — 6 injeções da vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Orquite curada e a uretrite melhorada.

Obs. — As 1.^ª injeções influenciaram manifestamente a febre e as dores. A orquite curou depois da 4.^ª inj. Soma de gonococos injectados — 440 milhões.

OBSERVAÇÃO XX

A. B. M., 19 anos, emp. comercial. Doente e Obs. do Dr. R. Seixas.

Diagnóstico — Blenorragia aguda e orqui-epididimite unilateral.

Tratamento — Desde 23 a 29-III — 4 injeções de vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Curado da uretrite e da orquite.

Obs. — A 1.^ª injeção determinou uma diminuição sensível das dores que se acentuou depois da 2.^ª inj. Soma dos gonococos injectados — 220 milhões.

OBSERVAÇÃO XXI

M. M., 27 anos, emp. comercial. Doente e Obs. do Dr. R. Seixas.

Diagnóstico — Uretrite gonocócica crónica e orqui-epididimite bilateral.

Tratamento — Desde 22 a 30-V — 5 injeções da vacina polivalente A.

Resultado — Cura radical da orquite e da uretrite.

Obs. — A 1.^ª inj. fez baixar a temperatura a 37° e diminuir as dôres e o corrimento uretral. *Em 8 dias o doente considera-se curado da orquite e tambem da uretrite que tinha ha 8 anos.*

OBSERVAÇÃO XXII

A. S. A., 23 anos, sold. H. Militar. B. 6.301.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda e orqui-epididimite aguda esquerda.

Tratamento — Desde 2 a 20-III — 4 injeções da vacina monovalente n.º 11.075.

Resultado — Orquite e uretrite curadas.

Obs. — A extinção das dôres espontaneas foi obtida em menos de 24 h. A febre desceu a 37°. Depois da 2.ª inj. as dores á pressão diminuiram notavelmente. A cura da orquite operou-se depois da 3.ª inj. Total de gonococos inj. — 40 milhões.

OBSERVAÇÃO XXIII

C. F. O., 23 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.478.

Diagnóstico — Uretrite e orqui-epididimite blenorragicas agudas.

Tratamento — Desde 2 a 7 III — 2 injeções da vacina monovalente n.º 11.075 — 15 milhões de gonococos.

Resultado — Orquite abortada e uretrite curada.

Obs. — Ligeira reacção focal. Dores espontâneas e á pressão desaparecidas dois dias depois da 1.ª inj. Temperatura descida á normal. Cura em 8 dias.

OBSERVAÇÃO XXIV

M. B. S. A., 21 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.487.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica crónica e orqui-epididimite aguda direita.

Tratamento — Desde 2 a 20 III — 3 injeções da

vacina monovalente n.º 11.075.—N.º de gonococos inj. 30 milhões.

Resultado — Orquite curada e uretrite melhorada.

Obs.— A orquite foi rapidamente influenciada pelo tratamento vacínico. A uretrite mostrou-se mais rebelde.

OBSERVAÇÃO XXV

F., 25 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.511.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica crónica e orqui-epididimite aguda direita.

Tratamento — Desde 2 a 8-III — 2 injeções da vacina monovalente 11.075. Gonococos inj.—15 milhões.

Resultados — Orquite e uretrite curadas.

Obs.— A 1.ª inj. determinou a baixa da temperatura e o desaparecimento das dores espontâneas. Passados 5 dias o testículo e epidídimo entraram em franca regressão. Cura obtida em 10 dias.

OBSERVAÇÃO XXIV

A. T., 20 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.523.

Diagnóstico — Uretrite, cistite e orqui-epididimite blenorragicas agudas.

Tratamento — Desde 4 a 19-III — 4 injeções da vacina monovalente 11.075.

Resultado — Cura completa da uretrite, da cistite e da orquite.

Obs.— A temperatura e dores cederam logo às primeiras injeções. A cura da orquite foi obtida em 11 dias, a da cistite e a da uretrite em 13 dias. Soma de gonococos injectados 50 milhões.

OBSERVAÇÃO XXVII

A. C., 23 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.526.

Diagnóstico — Uretrite blenorrágica crônica e orqui-epididimite aguda direita.

Tratamento — Desde 2 a 8-III — 2 injeções da vacina monovalente n.º 11.075. — N.º de gonococos inj. — 15 milhões.

Resultado — Cura completa da uretrite e da orquite.

Obs. — Nêste caso a uretrite curou primeiro do que a orquite, que aliás cedeu rapidamente também.

OBSERVAÇÃO XXVIII

A. C., 23 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.666.

Diagnóstico — Uretrite aguda e orqui-epididimite direita.

Tratamento — Desde 13 a 26-III — 3 injeções da vacina polivalente B. Total de gonococos inj. — 30 milhões.

Resultado — Uretrite e orquite curadas.

Obs. — Leve reacção à 1.ª injeção. Depois da 2.ª a febre cedeu e as dôres extinguiram-se.

OBSERVAÇÃO XXIX

A. T., 22 anos, sold. H. Militar. Bul. 6.914.

Diagnóstico — Uretrite blenorrágica crônica e prostatite aguda.

Tratamento — Desde 12 a 24-IV — 3 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Uretrite e prostatite completamente curadas.

Obs. — A temperatura e dores baixaram depois da 1.^a injeção. Soma de gonococos igual a 30 milhões.

Vulvo-vaginites infantis

OBSERVAÇÃO XXX

A. S. J., 6 anos. Doente da consulta J. do H. Santo Antonio.

Diagnóstico — Vulvo-vaginite blenorragica.

Tratamento — Desde 3 a 12-IV — 4 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curada.

Obs. — As injeções perfeitamente toleradas. Soma total de gonococos injectados — 180 milhões.

OBSERVAÇÃO XXXI

M. R. P., 8 anos. Doente da consulta J. do H. Santo Antonio.

Diagnóstico — Vulvo-vaginite blenorragica (?).

Bacteriologia — Numerosos diplococos tomando o Gram.

Tratamento — Desde 3 a 14-IV — 6 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curada.

Obs. — Sem reacção alguma. Soma de gonococos injectados — 235 milhões.

OBSERVAÇÃO XXXII

M. A., 7 anos. Doente da consulta J do H. Santo António.

Diagnóstico — Vulvo-vaginite blenorragica.

Tratamento — Desde 9 a 16-IV — 6 injeções da vagina polivalente B.

Resultado — Completamente curada.

Obs. — A ultima injeção determinou uma ligeira reacção. Cura obtida com 180 milhões de gonococos.

Endometrites. Metro-anexites.

OBSERVAÇÃO XXXIII

A. A., 15 anos, criada de servir. Enf. 8 do H. Santo Antonio.

Diagnóstico — Metro-salpingite de origem blenorragica.

Tratamento — Desde 23-IV a 10-V — 9 injeções de vacina antigonocócica B.

Resultado — Muito melhorada.

Obs. — As dores desapareceram depois das primeiras injeções. Soma de gonococos injectados — 20 milhões.

OBSERVAÇÃO XXXIV

J. de S. de 22 anos, criada de servir. Enf. 8 H. Santo Antonio.

Diagnóstico — Metro-anexite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 27-III a 26-IV — 6 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Curada da metro-anexite.

Obs. — Pelo Prof. Roberto Frias, foi dito que a doente já não necessitava de ser operada. Gonococos injectados — 680 milhões.

OBSERVAÇÃO XXXV

D. C., de 23 anos, doméstica. Enf. n.º 8 do H. S. António.

Diagnóstico — Metrosalpingite esquerda.

Tratamento — Desde 23 a 28-IV—2 injeções.

Resultado — Melhorada.

Obs. — O tratamento não pôde ser completo porque a doente desejou ter alta.

OBSERVAÇÃO XXXVI

M. C., 25 anos. Casada. Doente da consulta externa do Hospital de Santo Antonio.

Diagnóstico — Endometrite gonocócica.

Tratamento — Desde 3 a 21-V—6 injeções de vacina poliv. B.

Resultado — Muito melhorada.

Obs. — Soma de gonococos injectados—720 milhões.

Infecção gonocócica

OBSERVAÇÃO XXXVII

A. da C., 24 anos, fiandeira. Enf. n.º 12 do H. de Santo Antonio.

Diagnóstico — Gonococia puerperal.

Tratamento — Desde 24 a 29-IV — 3 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente curada.

Obs. — A temperatura e o pulso modificaram-se logo após a 1.^a injeção. O estado geral que era assustador ressentiu-se e beneficiou. A cura foi obtida á custa de 30 milhões de gonococos injectados.

Artrites

OBSERVAÇÃO XXXVIII

A. T., 44 anos. Doente e obs. do Dr. Couto Soares.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda e artrite blenorragica do joelho.

Tratamento — Desde 4 a 12 — 6 injeções da vacina poliv. A.

Resultado — Curado da uretrite e da artrite.

Obs. — A uretrite curada depois da 2.^a injeção, e o derrame articular estava reduzido a metade 8 dias depois do início do tratamento vacinal.

APÊNDICE — Uretrites agudas e crónicas

OBSERVAÇÃO XXXIX

C. T., 20 anos, estudante.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica (?) crónica.

Bacteriologia — Numerosos diplococos tomando o Gram.

Tratamento — Desde 10 a 26-V — 6 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Melhorado.

Obs. — A ardência desapareceu, porém, o corrimento resistiu. Depois da 6.^a injeção abandonou o tratamento. Total de gonococos injectados — 435 milhões.

OBSERVAÇÃO XL

J. M. B., 23 anos. Estudante. Auto-observação.

Diagnóstico — Uretrite blenorrágica crónica.

Tratamento — Desde 25 IV a 5 V.— 7 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Completamente nulo.

Obs. — Ligeira reacção à 6.^a inj. 500 m.— Soma de gonococos injectados 1.180 milhões.

OBSERVAÇÃO XLI

A. T., 27 anos. Ourives.

Diagnóstico — Uretrite blenorrágica crónica.

Tratamento — Desde 20-IV a 4-V— 6 injeções da vacina polivalente B.

Resultado — Curado.

Obs. — Soma de gonococos injectados—705 milhões.

OBSERVAÇÃO XLII

M. C. C., 20 anos. Corneteiro. H. Militar. B. 7.339.

Diagnóstico — Uretrite blenorrágica aguda.

Tratamento — Desde 12 a 17-V— 3 injeções da vacina poliv. B.

Resultado — Completamente curado.

Obs. — Cura realizada em 6 dias. Total de gonococos injectados — 30 milhões.

OBSERVAÇÃO XLIII

E. F. S., 21 ano, sold. H. Militar. Bul. 7317.

Diagnóstico — Uretrite blenorragica aguda.

Tratamento — Desde 9 a 25-V — 4 injeccões da vacina polivalente B.

Resultado — Curado.

Obs. — Soma dos gonococos injectados — 50 milhões.

Quadro geral da estatística

Doenças	Casos	Resultados			Porcentagem de curas
		Curados	Melhorados	Insucesso	
Uretrites agudas	20	20			100 %
Uretrites crónicas	13	8	4	1	61,53
Orqui-epididimites	11	11			100
Cistites	4	3	1		75
Prostatites	1	1			100
Endometrites	1		1		—
Metro-anexites	3	1	2		33,33
Vulvo-vaginites	3	3			100
Gonococia	1	1			100
Artrites	1	1			100
	58	49	8	1	

De todas as *Observações* que apresentámos em resumo, tiramos as seguintes conclusões:

a) As vacinas que nós preparámos tem

propriedades curativas admiráveis que as colocam perfeitamente a par das melhores que no mercado se encontram.

b) São absolutamente atóxicas e não determinam nunca reacção local o que as tornam superiores a quasi todas as vacinas estrangeiras conhecidas, e as reacções geral e focal que determinam, além de raras, são leves.

c) São duma grande estabilidade pois que conservam durante muito tempo todas as suas propriedades.

d) É sobretudo nos casos agudos e nomeadamente nas complicações da blenorragia que as vacinas que preparámos manifestam mais exuberantemente as suas propriedades curativas.

e) Os efeitos curativos manifestaram-se quer se empregassem as vacinas monovalentes quer as polivalentes.

f) As nossas vacinas acusam um tal valor curativo, que se obtem curas radicais com doses mínimas (15 milhões).

g) O método de esterilização utilizado na sua preparação, parece não influir grandemente nos resultados terapêuticos.

h) Em 58 casos clínicos que tivemos, a percentagem de curas foi de 84,48 %.

BIBLIOGRAFIA

- R. W. Allen.—Vaccine Therapy. 1912.
D. W. Carmalt Jones.—An Introduction to Therapeutic Inoculation. 1911.
Armando G. de Almeida e Silva.—Vacina Antigonocócica. Tese apresentada á Faculdade de Medicina do Pôrto. 1914.
Journal of Hygiene. Cambridge. Vol. XII. 1912.
The Lancet. Ano de 1902, 1908 a 1915.
The British Medical Journal. Ano de 1901, 1913 a 1915.
Journal Royal Army Medical Corps. Vol. V. 1915.
Le Journal Médical français. Paris. 1913 n.º 10.
Le Monde Médical. Paris. N.ºs 40, 451 e 499.
L'Avenir Médical. Lyon. 1913 n.º 7, 1914 n.ºs 1, 2, 6 e 7.
Annales de l'Institut Pasteur. Paris.
Buletin de l'Institut Pasteur. 1909 a 1915.
Il Policlinico. Roma. 1914. Fasc. 43.

Este trabalho ficou terminado em 5 - VII - 1915.

PROPOSIÇÕES

1.ª CLASSE

Anatomia descritiva.—A aponevrose próstato-peritoneal pode ser considerada como um prolongamento ascendente da aponevrose profunda do períneo.

Anatomia topográfica.—A Anatomia topográfica não é mais do que a descritiva — por regiões.

2.ª CLASSE

Histologia.—A forma pavimentosa estratificada que o epitélio uretral adulto apresenta, deve ser considerada como uma modificação estrutural consecutiva a lesões inflamatórias.

Fisiologia.—A glândula intersticial do testículo é uma glândula de secreção interna que preside ao desenvolvimento, e assegura a manutenção dos caracteres sexuais masculinos.

3.ª CLASSE

Farmacologia.—No tratamento das doenças infecciosas, a única medicação que merece o nome de específica é a bacterioterapia feita com o proprio agente da infecção.

4.ª CLASSE

Medicina legal.—A orquite blenorragica não arrasta consigo a supressão da espermatogenese.

Anatomia patológica.—O parênquima pulmonar paraes vezes se infecta directamente por via linfática.

5.ª CLASSE

Higiene.—A profilaxia das doenças infecciosas deve fazer-se utilizando a vacinoterapia preventiva.

Bacteriologia.—O meio da escolha para a cultura do gonococo de Neisser é o de Kiefer.

Patologia geral.—A bacterioterapia actua não só aumentando o poder bactericida do sôro, mas favorecendo a produção de anticorpos específicos.

6.ª CLASSE

Obstetricia.—Depois do estreptococo piogéneo, o agente que mais deve ser incriminado como autor das infecções puerperais é o gonococo.

Ginecologia.—Não se deve intervir cirurgicamente em um caso de anexite gonocócica, sem ter tentado a vacinoterapia específica.

7.ª CLASSE

Medicina operatória.—A uretrotomia interna está para a cirurgia da uretra, assim como a laparotomia está para a cirurgia abdominal.

Clínica cirúrgica.—Uma hemorragia hemorroidária só se deve suspender quando por si só constitui um perigo iminente para o doente.

8.ª CLASSE

Clínica médica.—Todas as vezes que uma afecção visceral não tem uma etiologia evidente e demonstrada, deve pensar-se na sífilis.

ESPECIALIDADES

Dermatologia.—A psoríasis é uma tuberculose cutânea.

—Uma lesão cutânea pruriginosa não deve fazer excluir em absoluto a ideia de sífilis.

Pediatria.—Justifica-se scientificamente o hábito popular de envolver as crianças variolosas em uma baeta vermelha.

Ortopedia.—O método mais fácil e mais rápido de consolidação de uma fractura da clavícula é o de Coutand.

Visto.

O PRESIDENTE,

Alberto de Aguiar.

Imprima-se.

O DIRECTOR,

Cândido de Pinho.