

ANTONIO LEBRE



DIAGNOSTICO DO
CARBUNCULO BACTERIDICO

PELA REAÇÃO D' ASCOLI



800

1911

ARRUMACÃO

Estante

Prateleira

N.º de Ordem

Maço de verbetes N.º

N.ºs DE REFERÊNCIA		LOCALIZAÇÃO	
Entrada	2991/75	E.	R
Invent.º	23691	P.	700
		N.º	

Teles Antigas FMV
1911, Oc. 14, n.º 186

23

R-700

~~196~~

ESCOLA DE MEDICINA VETERINARIA

~~2765~~

Diagnostico do Carbunculo bacteridico pela reacção d'Ascoli

DISSERTAÇÃO INAUGURAL

POR

ANTONIO TAVARES LEBRE

ESCOLA SUPERIOR DE
MEDICINA VETERINARIA

03 JUL 1975

BIBLIOTECA

N.º 2991

Trabalho do Instituto Bacteriologico Camara Pestana

Director Prof. ANNIBAL BETTENCOURT

NOVEMBRO DE 1911 — LISBOA

R-800-



ESCOLA DE MEDICINA VETERINARIA

DIRECTOR

JOSÈ VERISSIMO D'ALMEIDA

SECRETARIO

THEOTONIO JULIO PIMENTA RODRIGUES

CADEIRAS

PROFESSORES

Anatomia descriptiva e comparada, embryologia e teratologia.....	Joaquim Ignacio Ribeiro
Botanica.....	Antonio Pereira Coutinho
Physica agricola.....	Filippe de Figueiredo
Histologia e Physiologia comparada.....	José Antunes Pinto
Materia medica, chimica medica, pharmacologia e pharmacia....	Antonio Augusto dos Santos
Chimica agricola e analyse.....	Luiz A. Rebello da Silva
Pathologia geral e anatomia pathologica geral.....	João Sabino de Sousa
Pathologia interna.....	José M. Alves Tórgo
Agricultura geral e culturas arven- ses ..	Antonio C. da Silva Rosa
Pathologia externa, medicina ope- ratoria e obstetricia.....	João Ferreira da Silva
Zootechnia, exterior e hygiene dos animaes domesticos....	Antonio M. dos Santos Viegas
Pathologia das doenças contagio- sas e direito veterinario.....	João Viegas Paula Nogueira

Clinicas

Medica.....	José M. Alves Tórgo
Cirurgica.....	João Ferreira da Silva
Das doenças contagiosas.....	João Viegas Paula Nogueira

Cursos auxiliares

Microscopia.....	Miguel Augusto Reis Martins
Chimica geral.....	Cesar de Lima Alves
Zoologia.....	Godofredo da Silva Santos

Chefes de serviço

Manoel Diogo da Silva, Godofredo da Silva Santos,
Miguel Augusto Reis Martins,
José Miranda do Valle, Antonio Carvalho da Fonseca.

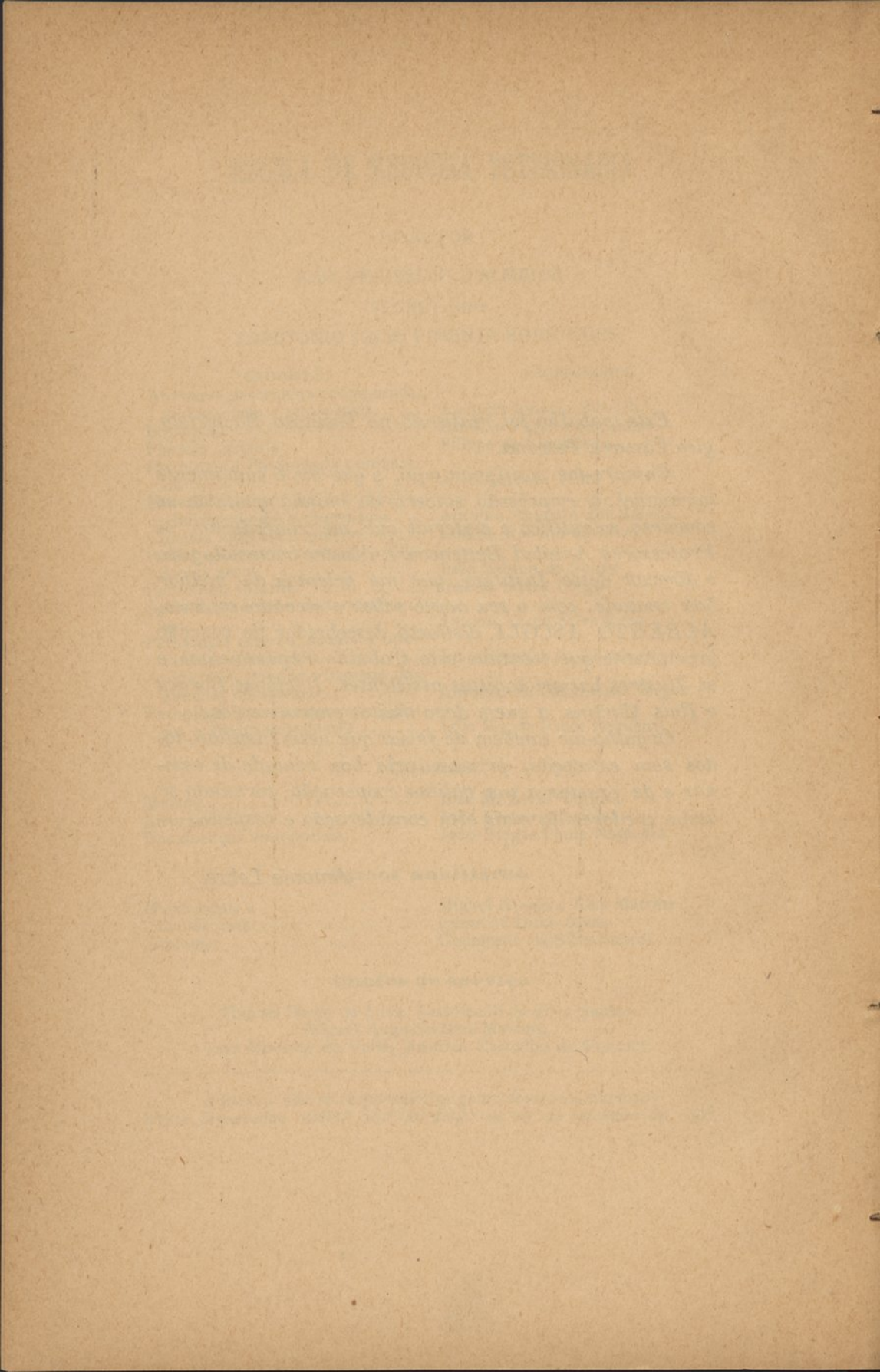
A ESCOLA não se responsabilisa pelas doutrinas expostas
n'esta dissertação. (Art.º 76.º do Reg.º de 10 de setembro de 1903)

Este trabalho foi realizado no Instituto Bacteriológico Camara Pestana.

Cumpre-me consignar aqui, o que me é sumamente agradável, a expressão sincera da minha gratidão ao concurso científico e material que me concederam os Professores Annibal Bettencourt, illustre bacteriologista e director deste Instituto, que me orientou da melhor boa vontade, com o seu muito saber e elevado espirito, ALBERTO ASCOLI, distincto descobridor da reacção precipitante que constitue este trabalho experimental e os illustres bacteriologistas assistentes, Idefonso Borges e Reis Martins, a quem devo muitos ensinamentos.

Orgulho-me tambem de frisar que neste Instituto, todos sem excepção, primam pela boa vontade de ensinar e de prestar a sua valiosa cooperação, tornando-se assim credores da mais alta consideração e respeito.

Antonio Lebre.



Considerações geraes

O carbunculo bacteridico, *carbunculo hematico*, *carbunculo essencial*, *carbunculo interno*, *carbunculo de Davaine*, *baceira* ou *febre carbunculosa* e *pustula maligna* no homem, é a doença local ou geral produzida por uma bacteria especifica, que foi descoberta por Pollender, Branell e Davaine. E', como muito bem diz Ascoli, uma infecção septicémica por excellencia, não produzida por productos toxicos soluveis ou por endotoxinas insoluveis, mas unicamente pelo corpo bacillar vivo, constituindo assim uma excepção.

Foi nesta doença que pela primeira vez foi demonstrada a natureza microbiana e em cuja bacteria recahiram os mais minuciosos estudos.

Encontramo-la no sangue e nos tecidos dos animaes infectados, sob a forma bacillar. Vista ao microscopio, apresenta-se-nos como uma virgulta imovel, grande, com as extremidades cortadas a pique e quando reunidas em cadeias tomam por vezes o aspecto de bambu. O seu estudo ao microscopio é simples, graças á facilidade que o bacillo carbunculoso tem de se deixar corar, principalmente pelos derivados da anilina, permittindo-nos assim reconhece-los nas substancias carbunculosas.

Quando cultivados, apresentam-se-nos com aspectos diferentes correspondentes aos diversos meios. Devemos atender sempre a que uma cultura virulenta em meio apropriado não deve formar filamentos durante as pri-

meiras 24 horas e sempre que estes appareçam devemos toma-los como signal de degenerescencia.

A virulencia do germe carbunculoso não offerece, segundo as diferentes especies animaes, caracteres de descontinuidade e variabilidade; um germe atenuado para uma dada especie, tambem o é, por via de regra, egualmente para as outras.

Assim como o bacillo apresenta, quer pelas suas propriedades biologicas, quer pelas suas propriedades morphologicas, caracteres typicos duma regularidade classica, assim tambem o sôro anticarbunculoso não offerece, no dizer de Ascoli, as difficuldades de valorisação que tornam tão incerta a apreciação de outros soros anti bactericos.

Esta bacteria nunca se reproduz por esporulação no sangue e nos tecidos dos animaes. Somente esporula, produzindo um unico espora, quando no cadaver tenha penetrado oxygenio, e em determinadas condições de temperatura. Em culturas apropriadas a esporulação só se realisa quando o meio crie á bacteria condições que, sendo desfavoraveis para o desenvolvimento das formas vegetativas, são no entanto favoraveis ás formas esporuladas.

Dá-se aqui como que um phenomeno teleologico, cujo fim é a conservação da especie. Os esporos, uma vez colocados em condições propicias, seja no organismo do animal, seja num meio de cultura, germinam e produzem bacterias. A fraca resistencia destas ás influencias exteriores (calor, luz, productos chimicos, etc.) está em opposição com a enorme resistencia que apresenta para aquellas mesmas causas, a forma esporulada.

Em antagonismo com outros micro-organismos, ou em presença de productos de desassimilação de certas bacterias, as formas vegetativas do bacillo carbunculoso succumbem tambem muito rapidamente.

No começo da doença as bacterias são levadas pelo sangue aos campos de batalha. isto é, aos espaços lymphaticos dos varios órgãos, ás arteriolas terminais e só depois da lucta travada entre as bacterias e os phagocitos e, claro está, quando esta for vantajosa para as primeiras, é que se dá a multiplicação das bacterias e por consequente a morte do animal infectado.

Animaes infectados, e muito principalmente se se

trata de infecções naturaes de que não t nhamos prévio conhecimento, morrem por vezes sem que possamos vêr os symptomas geraes, que na maioria dos casos são muito pouco notados.

Segundo os auctores e segundo a nossa observação, os animaes que tivemos necessidade de inocular para os nossos trabalhos (Carneiro e Cabra principalmente) pareciam «vender saude» horas antes de morrer, e só nos ultimos momentos cahiam em estado de prostração, isto é, quando as bacterias começavam a pullular, sendo então compromettida a saude, sobrevivendo a morte (1).

Raras vezes podêmos em vida fazer o diagnostico da doença, já pela sua rapidez de ordinario fulminante, já porque a pesquisa bacteriologica da bacteridia de Davaine no sangue circulante, só excepcionalmente dá resultados positivos, o que confirma como acima dissemos, que as bacterias carbunculosas, só tardiamente, nunca no começo da doença, se multiplicam no sangue, sendo então o diagnostico reservado ordinariamente para a autopsia.

Os dados anatomo-pathologicos que a autopsia nos pode offerecer — putrefação rapida dos cadaveres, côr vermelho escuro e falsa coagulação do sangue, a sahida deste pelas aberturas naturaes, edema gelatinoso do tecido cellular subcutaneo, tumefação do baço que se apresenta molle e friavel, rins carregados de sangue e como o baço de côr vermelho carregado — permittem por vezes um diagnostico seguro. Sendo assim, e como o diagnostico do carbunculo bacteridico se torna imprescindivel «não direi já sob o ponto de vista therapeutico que só raras vezes e em determinadas especies animaes (Homem, Cavallo) tem uma importancia excepcional, mas para a proficua applicação das medidas prophylaticas destinadas a proteger os animaes e o homem contra as infecções carbunculosas» nós devemos recorrer pois, sempre que no nosso espirito houver duvidas, ás pesquisas microscopicas e bacteriologicas

(1) Cabra inoculada com carbunculo virulento(1 c. c.) proveniente de um animal da mesma especie, morto de carbunculo natural Morreu no fim de 4 horas, de morte fulminante, annunciando-a com repetidos berros.

Diagnostico bacteriologico

A capsula, caracteristica morphologica do bacillo do carbunculo, que alguns methodos de fixação e coloração tornam evidente, não pode servir como signal de diagnostico seguro, pois outros germes semelhantes na forma, provenientes de cadaveres de animaes não carbunculosos, podem apresentar tambem uma capsula muito semelhante á do bacillo carbunculoso.

Se em vez, porem, dos methodos usuaes de coloração das capsulas, seguirmos o processo de Heim e Foth — fixação pelo calor e coloração pelo azul de methylena — a capsula da bacteridia carbunculosa toma uma coloração rosea, destacando-se dentro della, em violeta, o corpo bacillar. Este aspecto de coloração devido á acção metachromatica da capsula, quando o bacilo é tirado do animal, ou cultivado em meios constituídos por succos organicos de origem animal, é considerado especifico e aproveitado para a diagnose desta doença.

As dificuldades surgem no entanto e o exame torna-se cada vez mais incerto e delicado, se o não realizamos nas primeiras 24 horas que seguem á morte do animal, antes que elle entre em franca decomposição, pois de contrario o numero de bacterias diminue consideravelmente e a sua caracteristica morphologica soffre uma rapida e profunda alteração.

A inoculação em pequenos animaes nem sempre nos conduz a resultados positivos, pois que o germe carbunculoso no corpo do animal pode ser suplantado por outros microorganismos que juntamente forem inoculados com o material em decomposição e causem a morte do animal sem que o primeiro tenha podido desenvolver-se. Outras vezes o animal resiste ás inoculações feitas nestas circumstancias pois que os microorganismos não especiaes, podem não sêr pathogenicos mas causarem a destruição dos bacillos carbunculosos que juntamente tivermos inoculado.

São pois grandes as dificuldades de diagnostico nos

laboratorios, e mesmo naquelles onde nada falte para uma completa investigação. Estas difficuldades multiplicam-se porem, para o veterinario da provincia a quem não falte a competencia technica, mas que por via de regra não pôde dispor dos meios laboratoriaes que o caso reclama.

Sendo assim, o exame morphologico pode conduzir a erro o analysta ainda o mais experimentado, pelo que recorreremos em semelhantes condições ao isolamento do germe, fazendo culturas, e ás inoculações nos animaes.

E' pelas culturas, com o isolamento das colonias, que podemos garantir resultados mais seguros; mas se o estado de decomposição do material fôr muito adiantado, como succede, por vezes, com o que chega aos laboratorios que têm de formular o diagnostico, os resultados são por via de regra nullos.

Porem se, das culturas em placas, podermos isolar colonias que, desenvolvidas em 24 48 horas, apresentem longos filamentos lembrando no conjunto uma madeixa ou cauda de comêta, uma verdadeira «caput medusae» e que com o tempo, lentamente liquifacem a gelatinã, devemos toma-las como caracteristicas.

Na Alemanha de 1909 para cá, a lesgislação sanitaria concede indemnisação ao proprietario de animaes das especies bovina ou equina, mortos de carbunculo, quer o diagnostico seja feito ante ou post-mortem. O diagnostico justifica-se ali, por considerações de ordem prophylactica e bem assim de ordem economica, pois que as indemnisações feitas em cada anno por carbunculo hematico e symptomatico attingindo sommas importantes (cerca de um milhão de marcos na Prussia) impõem o dever de provas bacteriologicas rigorosas para que elle seja seguro. Pois apézar de tudo, e para mostrar a difficuldade com que se lucta para bem o acertar em certos casos, o Professor Ascoli cita que, o numero em que não foi possivel a confirmação bacteriologica do diagnostico formulado pelo veterinario, foi n'umas regiões de 20%, noutras de 37%.

Bem expressivo é tambem o seguinte caso citado por Ascoli e que succedeu ao veterinario Werner, que por engano enviou em dias seguidos duas amostras da mesma substancia e do mesmo animal para o laboratorio de

Wiesbaden para analysar : Com surpresa viu que o resultado foi para a 1.^a amostra positivo, para a 2.^a negativo!...

A uma resposta negativa do bacteriologista não devemos pois attribuir um valor absoluto, quando esta não estiver em harmonia com o exame clinico e anatomo-pathologico por nós colhido, e muito principalmente, se se der o caso, de ser frequente na localidade a febre carbunculosa. Uma resposta positiva pelo contrario, merecemos todo o credito, não podendo dar logar a duvidas, claro está, se o bacteriologista for consciencioso e tiver atendido aos caracteres de differenciação do germe. Assim o tem demonstrado a pratica corrente.

Para maior facilidade no isolamento do bacillo e no seu transporte para os laboratorios, e por conseguinte para maior garantia no diagnostico, tem-se inventado varios processos tendentes a favorecer a conservação do germe carbunculoso. Assim, é a opinião de quasi todos os auctores que se deve oportunamente proceder á sua seccagem. D'entre os varios processos, o mais simples é aquelle em que se deposita, numa lamina porta-objecto, uma camada da substancia a analysar, da espessura de cinco réis, collocando-a em seguida ao ar a fim de seccar.

O processo seguido pelos italianos consiste em collocar numa provêta esterilisada, fios de seda como aconselha Heim, facilitando-se a dessecação pelo chloreto de calcio, mantido no fundo da provêta por meio de um rôlho de algodão. Preparado assim este systema, perfeitamente secco, uma vez que se precise, tira-se o fio, impregna-se com o sangue suspeito e colloca-se novamente na provêta, tapando-a de novo com algodão e capuz de borracha. (1)

Os alemães, sabido como está que as difficuldades do diagnostico bacteriologico resultam principalmente da destruição rapida das bacterias no cadaver, usam um processo tendente a fornecer aos germes, regulares condições de multiplicação e tão depressa quanto possível as melhores condições de esporulação.

(1) Um Carneiro inoculado, com 0^m,02⁴ de fio segundo Heim, preparado nas condições indicadas havia um anno, morreu fulminado ao 4.^o dia, sendo nullas as lesões anatomo-pathologicas.

E' pois, de uso corrente entre elles e muito recomendado como auxiliar no diagnostico do carbunculo hematico, o processo estudado com este fim por Jacobsthal e Pfersdoff na Escola de Strasburgo, sob a direcção de Forster e que ficou conhecido por «Methodo de Strasburgo».

Consiste tal methodo em impregnar com caldo pequenos pedaços de gesso, colocados em provêtas, fixos nestas por dois rôlhos de algodão, sendo tudo previamente esterilizado. Obtido assim este systema e desejando em occasião oportuna fazer a colheita, tira-se o gesso que se esfrega em corte fresco da substancia a analysar tendo-o previamente humedecido com agua.

Colocado o pedaço de gesso novamente na provêta e fixado pelo algodão, podêmos humedece-lo previamente para obter assim uma atmospherá humida dentro da provêta que se envia para o laboratorio.

Este processo magnifico pelos resultados a que conduz não é tão pratico quanto o uso reclama, pelo que se suprime por desnecessario o caldo, humedecendo-se simplesmente o gesso com agua. A superioridade deste processo, assim simplificado, sobre o exame das preparações feitas com sangue ou polpa de baço, foi posta em evidencia na Allemanha com os resultados seguintes: emquanto o methodo corrente permittia reconhecer 280 casos de carbunculo, pelo processo dos pedaços de gesso o numero ascendia a 377!

Alguns auctores reconhecem a vantagem das substancias porosas e Engler primeiramente e mais tarde este e Müller estudam a questão e escolhem entre as substancias porosas as que melhor convem para a esporulação da bacteria, tendo preferencia sobre o gesso, o giz e o barro cozido.

Das duas substancias é, segundo estes auctores, o giz que dá nas sementeiras em agar maior numero de colonias, pois é elle tambem que absorve o sangue em maior quantidade. Por esta mesma razão, porem, torna-se friavel e fragmenta-se facilmente no transporte o que o inutilisa. Por isto e por se encontrar facilmente em toda a parte tem a preferencia o barro cozido — os cacos.

Eberle e Schüller substituíram o gesso por pedaços

ou pequenos r6los de papel de filtro, mas os resultados est6o longe de satisfazer. O emprego dum fragmento de vaso (de flores) foi preconizado por M6ller e Engler, para o que os esterelizam pr6viamente pela ac66o da agua a ferver, durante cinco minutos, resfriando-os em seguida por immers6o na agua da fonte, fresca e bem arejada. Estes fragmentos apresentam duas faces, uma rugosa que coberta duma camada espessa de sangue presta-se para a pesquisa das bacterias, outra lisa onde se derrama o sangue em tenue camada para facilitar uma esporula66o rapida.

Dos resultados que conseguimos com tal methodo, d6a ideia o Mappa I e da maneira como procedemos vamos dar conta.

Para a realiza66o destas experiencias recorremos a fragmentos de varias substancias porosas a saber : cacos de vaso (flores), de gr6s (manilha) de loi6a preta, de telha, de tijolo e porcellana (em bruto). Feitas com exito as primeiras experiencias com as substancias citadas, d6mos preferencia 6s duas primeiras com que obtivemos a maioria dos resultados.

Preparados «ad hoc» pequenos fragmentos destas substancias, de dimens6es sufficientes a caberem em vulgares tubos de ensaio, de comprimento em media igual ao dobro da largura destes, apresentando faces, lisas umas, rugosas outras, eram assim esterilizados pela ac66o da agua fervente durante alguns minutos.

Em occasi6o opportuna eram humedecidos com agua commum e passados alguns minutos esfregavam-se com a substancia suspeita — uns com ba6o, outros com sangue do cora66o.

Procedendo assim, depunhamos sobre as faces rugosas uma camada de substancia (polpa do ba6o) espessa por vezes num ou noutro ponto. Nas faces lisas ficava o sangue em tenue camada, proporcionando assim 6 bacteria carbunculosa uma facil esporula66o.

Assim preparados os cacos, eram mettidos nos tubos de transporte (tubos de ensaio) tendo se lhes pr6viamente introduzido um r6lho de algod6o que humedeciamos com algumas gottas de agua. Assim colocados, eram fixos no tubo por um outro r6lho, de maneira a poderem ser enviados para o laboratorio, gastando

no «transporte» um numero de dias, variavel entre 1 e 26.

Exceptuando os casos em que se embebeu, não com agua, mas com caldo, as substancias porosas, para fazer a pesquisa bacteriologica procedemos sempre como vamos expor.

Dados dois cacos, eguaes sob o ponto de vista da substancia porosa, do material carbunculoso, do numero de dias decorridos no «transporte» e das dimensões, collocavamos cada um em pequena capsula. onde se humedecia com soluto de ClNa uns, com agua distillada outros.

Decorrido algum tempo, seguravamos o caco com uma pinça e com outra (hemostatica) seguravamos uma pequena bola de algodão com que desagregavamos toda a substancia aderente, obtendo na capsula uma pequena porção de liquido por vezes sanguinolento.

Deste extrahia-se uma gotticula que se semeava em agar em placas de Petri, que collocavamos na estufa a 37° durante 24 horas, passadas as quaes examinavamos as colonias. O outro caco passava-se directamente do tubo de transporte para um tubo com caldo (carne) que collocavamos tambem na estufa a 37° durante 24 horas, pelo menos, findas as quaes o examinavamos.

Desta cultura tiravamos uma gotticula, que se semeava em placas de gelose e examinavamos no dia seguinte.

Os resultados obtidos por qualquer destes dois meios são inteiramente animadores, mas não sabemos dizer da superioridade de um ou da inferioridade do outro pela maior ou menor garantia de diagnostico que um ou outro nos possa dar, pois não temos a pretensão de, com um tão pequeno numero de experiencias tirar taes conclusões.

Preferimos no entanto ás culturas em caldo, as culturas directas em agar, já porque o diagnostico nos leva apenas 24 horas, ou seja metade do tempo, já porque o numero de colonias desenvolvidas se nos afigurou sempre superior e só excepcionalmente egual e nunca inferior, excepto uma vez em que este meio falhou em verdade, mas em que aquelle garantiu o diagnostico, apenas por uma colonia.

A que attribuir pois taes resultados?

Ao caldo de que nos servimos não ser um bom meio

para o desenvolvimento do bacillo carbunculoso ou ao facto dos productos de desassimilação de certas bacterias se comportarem para as formas vegetativas d'aquelles, como verdadeiros venenos, ou ainda porque estas, em antagonismo com outros microorganismos succumbem muito rapidamente?

Se a causa não está nos dois ultimos factos, não a julgamos, porem, no primeiro, pois semeando no mesmo caldo, culturas puras, o numero de colonias revelado então pelo agar, foi suprehendente. Sendo assim, nós podemos, se necessario for, obviar tal inconveniente, fazendo como que uma selecção dos esporos, matando pelo calor os germes asporogenos, antes de semear as placas, o que convem ainda para as culturas directas em agar, mas que em verdade não julgamos indispensavel. Os elementos impregnados com sangue e polpa (baço) dão, como previamos, maior numero de colonias sobre o agar, do que os impregnados com sangue (coração) que dão contudo um numero consideravel de colonias.

Os resultados obtidos com cacos embebidos não com agua mas com caldo, tem em verdade superioridade, pois o numero de colonias que nos revela o agar é ainda mais consideravel, e comprehende-se que assim seja, pois as bacterias assim em meio apropriado, multiplicam-se e, só tornado improprio o meio para as formas vegetativas, vem a esporulação cujos resultados são denunciados pelo agar (6 experiencias).

E' inegavel pois, que semelhantes precauções na coheita da substancia carbunculosa, offerecem ao methodo da Escola de Strasburgo, vantagens reaes, indiscutíveis sobre os outros, já favorecendo a esporulação, já facilitando o isolamento do germe carbunculoso, tornando-se assim possivel a pesquisa d'este, nos casos em que ella ordinariamente falha.

Esperamos pois, ver substituido entre nós, pelo methodo de Strasburgo, o habito de mandar em frascos para o laboratorio amostras de substancias carbunculosas que, alem dos inconvenientes de insuccesso que tal processo traz ao diagnostico, é por vezes dispendioso, incommodo e antiphyllatico.

Com considerações de natureza das que ficam expostas, procurou o Professor Ascoli demonstrar, quando

publicou no numero 1 da revista «La Clinica Veterinaria» de 15 de janeiro de 1911, os primeiros resultados das pesquisas feitas com Valente sobre a precipitina na diagnose do carbunculo hematico, quanto pode ser longa, difficil e por vezes impossivel a pesquisa bacteriologica, o que, allás, muito bem sabe quem já experimentou.

Precipitinas

Nos soros antibactericos existe ao lado das bacteriolysinas, antitoxinas e agglutininas, uma outra especie de substancias produzidas no decurso da immunisação, que provocam, nos filtrados e nos extractos da cultura dos germes correspondentes, a formação dum precipitado.

A propriedade precipitante de taes soros é attribuida a «anticorpos» a que se dá o nome de precipitinas — atenta a terminologia já consagrada para as bacteriolysinas e agglutininas.

São varias, pois, as substancias com as quaes o organismo reage, perante os corpos bacillares, revelando-se os phenomenos de immunidade duma complexidade inesperada, e se até certa data se tratou apenas da reacção directa só contra microbios ou só contra venenos, bem depressa porem se soube que o organismo tambem reagia á acção das substancias albuminoides soluveis, sendo capaz de elaborar substancias immunisantes que vemos tambem incluídas no termo geral de anticorpos.

A demonstração da existencia das precipitinas nas substancias albuminoides é devida aos trabalhos de Bordet e Tschistovitch e tem o nome de albumino-precipitinas. O de precipitinas bactericas é pertença das primeiras, cuja descoberta foi feita por Kraus em 1897. Os trabalhos de Wassermann, Schütze e Uhlenhuth confirmaram estas observações e a differenciação das diversas albuminas pelas precipitinas tornou-se um facto de tal im-

portancia que, sahindo da esphera da simples pesquisa bacteriologica, faz ligar a serologia á physiopathologia e á biochimica, inaugurando uma nova era no estudo da reacção biologica, subsidiando assim a medicina legal, a hygiene, o problema biologico e em clinica o diagnostico.

E' principalmente nas investigações medico-legaes que a reacção das precipitinas presta relevantes serviços como meio de diagnostico, podendo differenciar as albuminas de origem humana, sem difficuldade, das albuminas das diversas especies animaes, excepção feita no entanto para a dos macacos e muito principalmente para os macacos anthropomorphos, cujo diagnostico é por vezes difficil e delicado.

O methodo pratico e preciso como se pratica em medicina legal a reacção das precipitinas é devido a Uhlenthuth e a sensibilidade desta reacção é verdadeiramente extraordinaria. Um dado sôro de Coelho precipitante para o sangue do Homem, permite reconhecer com segurança se uma mancha (de sangue) encontrada num estofa com muitos annos, proveio do Homem ou do animal. Para o conseguir dissolvemos a mancha numa solução de ClNa a 0,85 %, filtra-se o liquido e junta-se-lhe a quantidade de sôro precipitante precisa : se não se produz precipitado, quando fôr positivo o resultado da experiencia de contra prova feita com o mesmo sôro e sangue do Homem, podemos concluir que a mancha provem dum animal.

Podiamos mesmo ir mais longe e determinar a que especie de animal pertencia, para o que bastava dispôr de soros precipitantes de outros animaes. Uma vez determinada a origem da mancha, precisamos ainda recorrer a methodos especiaes para sabermos se ella provem de sangue ou doutro liquido organico, pois no caso presente, a reacção seria a mesma, quer se tratasse duma mancha de sangue, quer de esperma.

A fraude na venda de chouriços de carne de Cavallo por carne de Porco é denunciada de modo analogo, fazendo com agua um extracto de carne suspeita ; assim se o chouriço é de carne de Cavallo, com um sôro de animal preparado com injeções da mesma carne, deve dar um precipitado. O diagnostico é ainda possivel com as carnes fumadas e seccas e applicado este processo aos

leites temos um meio de diagnostico que podemos utilizar na destringa dos mesmos.

No problema biologico esta reacção tem ainda o seu papel. O anti-sôro que precipita o sôro do Coelho, precipita tambem o sôro da Lebre; o anti-sôro do Cavallo precipita tambem o sôro do Burro e do Tapir. A *consanguinidade* da Cabra e do Carneiro é tambem assim demonstrada e pelo que mais de perto nos diz respeito, o sôro do Coelho preparado com sangue do Homem dá um precipitado com o sôro dos macacos, o que põe em evidencia o nosso proximo parentesco com os macacos e mais com os do antigo mundo do que com os da America.

Aqui, como na agglutinação, ha precipitação por grupos, mas este facto em nada restringe a utilidade pratica dos soros precipitantes, pois este inconveniente pode ser evitado servindo-nos de soros cuja actividade seja precisamente conhecida e cujo poder especifico para as diversas albuminas tenha sido determinado rigorosamente.

O poder precipitante de um dado sôro para a albumina injectada é tanto menor para esta e tanto maior para as outras quanto mais prolongada e intensiva fôr a immunisação, donde resulta o não precisarmos na pratica de a levar muito longe, quando pertendermos obter um sôro que só actue sobre determinada especie de albumina.

Nos soros que conservamos durante algum tempo, as precipitinas dissociam-se e mais rapidamente ainda do que as agglutininas e bacteriolysinas. Alem de algumas semanas a sua conservação é duvidosa pelo que devemos addicionar ao sôro, chloroformio ou phenol se desejarmos prolongar-lhe a sua conservação.

A constituição chimica das precipitinas como a dos outros corpos especificos é mal conhecida; podemos supô las pertencentes ou pelo menos aproximadas á classe das globulinas e mais particularmente á das globulinas soluveis na agua distillada (pseudo-globulinas). Duma maneira geral podemos dizer que as precipitinas são corpos muito instaveis, possuindo contudo para o calor, uma certa resistencia. A temperatura de 60 a 70 graus não destroe o seu poder fixador, mas é sufficiente para paralisar a sua acção precipitante. Possuem com effeito um grupo funcional termolabil, cuja destruição transforma

as precipitinas em *precipitinoïdes* que possuem uma afinidade específica para a substancia precipitavel, e um agrupamento haptophoro mais resistente.

Experiencias demonstrativas de Cantacuzène dizem-nos que no organismo normal do Coelho existem tambem pequenas quantidades de anti-corpos para os soros estranhos e a sua elaboração pode augmentar em quantidade notavel se provocarmos, por uma injeccão de aleurona, a actividade dos órgãos precipitoformadores que são por ordem decrescente — o baço, ganglios (mesentericos) medulla ossea. Os elementos cellulares livres que elaboram estas precipitinas são os leucocytos e dentre estes provavelmente os mononucleares.

Nos extractos dos órgãos é sempre pequena a proporção em que ellas se encontram e não apresentam nenhum character de especificidade. O seu apparecimento nos órgãos precipitoformadores, realisa-se no mesmo dia ou passadas poucas horas depois da injeccão de aleurona na cavidade peritoneal.

Não acontece, porem, o mesmo para as especificas que precisam para apparecer nos órgãos, isto é, para serem elaboradas de um periodo de incubação de 3 dias, e para apparecerem no sangue de 6 a 10, mas a quantidade segregada é tambem incomparavelmente mais notavel.

Theoria de Ehrlich

Immuniidade. Chama-se assim a faculdade natural ou adquirida que certos individuos gosam de ficarem refractarios aos efeitos duma dada infecção, para a qual são receptiveis outros individuos da mesma especie e da mesma raça em identicas condições.

«A lucta contra as doenças infectuosas foi praticamente impulsionada pela descoberta de Roux e de Behring, que sôb o ponto de vista doutrinal, ensinou a distinguir nitidamente a immuniidade activa e passiva.

Contra a diphteria e tetano a immuniidade activa, desenvolve-se no organismo vaccinado por processos de reacção ao veneno introduzido e dum modo analogo se

produz com toda a probabilidade tambem, a refractarie-
dade conferida pelas vaccinações pasteurianas. A immu-
nidade serotherapica que se obtem transportando os prin-
cipios antitoxicos produzidos pelo organismo immunisado
activamente para um organismo são, ou já intoxicado, foi
chamada passiva, porque o organismo em nada contribue
para a sua producção, pois comporta-se apenas passiva-
mente, actuando unicamente como simples vehiculo dos
principios antitoxicos »

A immundade natural nem sempre é completa, pois
um dado individuo assim immune pode por influencias
quer naturaes quer artificiaes, perder tal faculdade.

Traduzida em defeza do organismo a immundade é
para Metchnikoff devida aos elementos cellulares e mais
particularmente aos leucocytos e lymphocitos que se
comportam, com os germes infecciosos ou com os cor-
pusculos extranhos, englobando os e digerindo os.

Em opposição a esta theoria, Buchner, apesar de
reconhecer pelas suas experiencias que a destruição das
bacterias e dos elementos figurados se faz no interior
dos phagocitos, foi levado a admitir que eram os plas-
mas dos humores, sem o concurso daquelles, que asse-
guravam a immundade á acção das infecções.

A estas substancias encarregadas da defeza do orga-
mo deu lhes o nome de *alexinas*.

Negando assim a theoria de Metchnikoff, Buchner
dentro em breve abandonava o campo opposto para ado-
ptar uma concepção intermediaria ás duas theorias, atri-
buindo um papel nos phenomenos da immundade, já
aos phagocytos, já ás alexinas. Esta theoria intermedia-
ria e até certo ponto conciliadora das de Metchnikoff e
Buchner é seguida por muitos auctores.

Assim para estes, as propriedades digestivas e ba-
cteridas dos humores, bem como as propriedades ana-
logas dos leucocytos são devidas a substancias idénticas
ou pelo menos muito vizinhas, e são secreções cellu-
res da natureza dos fermentos.

Posto que não seja dado aos leucocytos gosarem nos
phenomenos da immundade o papel preponderante que
Metchnikoff lhes imputa, não devemos no entanto des-
conhecer o papel de destaque desempenhado pela sua
intervenção. Assim reforçam elles a acção dos soros im-

munisantes, já destruindo as bacterias mortas ou enfracuecidas pelos anticorpos especificos, já annullando o effeito dos seus productos toxicos.

A presença de agentes infecciosos no organismo immunisado, provoca nelle uma modificação permanente que podemos traduzir por um estado de hypersensibilisação que o torna apto para a producção de anticorpos.

O estudo destes teve por inicio a descoberta das antitoxinas e a necessidade de explicar não só a acção destas sobre as toxinas, mas a origem dos anticorpos, suscitou varias theorias, entre as quaes a de Ehrlich, que nos permite comprehender o mechanismo da producção de um grande numero de anticorpos, a saber: bacteriolysinas, antitoxinas, precipitinas, agglutininas especificas e opsoninas a que dá origem a immuniidade, quer natural, quer artificial.

A maneira clara e brilhante como Ascoli trata nos seus magnificos «Elementi di Sierologia» a theoria de Ehrlich, leva-nos a transcrever sobre esta theoria alguns trechos de tão precioso livro, a que já vimos de recorrer tratando dum ou outro assumpto.

«A theoria que tem o nome de Ehrlich teve por ponto de partida a hypothese emittida por este sabio ha mais de vinte annos — que o protoplasma de cada cellula viva, resulta dum nucleo de complexos anatomicos destinados ás funcções cellulares especificas a que elle chamou «Leistung Kern» e de numerosos agrupamentos moleculares destinados a atrahir e a armazenar as substancias nutritivas. A estes agrupamentos moleculares deu elle o nome de «cadeias lateraes» usando a terminologia da chimica moderna.

A's cadeias lateraes ou receptores — como foram chamados em seguida — cumpre a tarefa de assimilar em condições physiologicas os alimentos, por exemplo os assucares, não os dissolvendo simplesmente por meio de factores physicos no protoplasma, mas fixando-os tão intimamente com ligações chimicas que para extrahil-os não basta o *solvente*, mas sim é necessaria a dissociação das afinidades, como a que é exercida, por exemplo, pelos acidos mineraes.

As cadeias lateraes são porém capazes de armazenar ainda outras substancias alem das nutritivas, quando es-

tas possuam um complexo anatomico dotado de afinidades chimicas especificas para com os receptores, ou por outras palavras, quando essas contenham um grupo haptophoro.

Segundo Ehrlich a incorporação, a assimilação, seja dos alimentos ou dos toxicos antigenos, realiza-se por meio de grupos haptophoros semelhantes, os quaes encontram nas cadeias lateraes os agrupamentos dotados de afinidades especiaes para elles. Assim interpretado o processo de absorpção da toxina tetanica, reduz-se a uma reacção entre o grupo haptophoro do toxico e certas cadeias lateraes ou receptores das cellulas nervosas. Mas ao passo que com as substancias nutritivas, se segue á sua fixação a sua combustão, desembaraçando-se assim d'ellas, rapidamente, os receptores; dos toxicos, porém, que representam como que alimentos indigestos, a cellula não consegue desfazer-se com tanta facilidade.

As cadeias lateraes occupadas neste processo, não podem já exercer as suas funcções habituaes, de atracção ás substancias nutritivas. Nestas condições, a cellula para recuperar o seu funcionamento normal, vê se obrigada a reproduzir novos receptores em substituição dos já empregados, que debaixo do ponto de vista funcional estão paralisados como se já não existissem.»

Se a cellula se satura pelos grupos toxophoros da toxina, torna-se inactiva e se este phenomeno abrange um grande numero de cellulas de um ou de muitos orgãos de grande importancia vital, o individuo succumbe. Se porem a intoxicação da cellula não é completa, ella regenera os elementos de que foi cerceada, mas segundo a Lei de Weigert esta regeneração vae alem da simples compensação, havendo uma verdadeira hyper-produção e hyper-regeneração ao mesmo tempo. Esta lei assenta nas observações feitas em animaes inferiores que, privados dum dos seus membros, regeneram não um mas mais e por vezes maiores. Assim, um reptil amputado de alguns dos seus aneis, regenera-os em maior numero. Ora se nos animaes inferiores é assim, do mesmo modo cerceadas as cellulas dalguns dos seus elementos funcionaes, ellas reproduzem-nos e regeneram-nos em excesso, e como este lhes é prejudicial, lançam-no no sangue, (na corrente circulatoria) e nos humores sob a for-

ma duma secreção interna, desembaraçando-se assim duma parte destes grupos de neoformação.

«As cadeias lateraes mais simples, ou receptores de 1.^a ordem, isto é, providas só do grupo haptophoro, postos assim em liberdade e passando para o sangue, constituem a antitoxina; as mais complexas (ou receptores de 2.^a ordem) isto é, providas alem do grupo haptophoro, dum zimophoro agglutinante ou precipitante, representam as agglutininas ou precipitinas Graças á sua origem as antitoxinas apresentam um grupo atomico dotado de afinidades especiaes para com o toxico e capazes de desviar este ultimo dos orgãos e dos tecidos sensiveis.»

Assim como as toxinas dão origem á formação de antitoxinas, tambem as cellulas bactericas uma vez introduzidas no organismo provocam ahi a formação doutros anticorpos que são como as antitoxinas receptores destacados de certas cellulas para as quaes os grupos haptophoros correspondentes das bacterias gosam d'uma afinidade especifica. Producto d'um determinado veneno, a antitoxina, mostra se em verdade efficaz somente para esse e indifferente para todos os outros toxicos.

«A hypothese de Ehrlich dá ainda a razão ás differenças entre immunidade activa e passiva, as quaes não se comprehenderiam se as antitoxinas proviessem directamente das toxinas; se pelo contrario admitirmos com Ehrlich que as antitoxinas representam os productos da reacção do organismo immunisado, não só se comprehende como a immunidade activa possa ser excitada por meio de estimulantes secretores, mas as modificações cellulares que necessariamente acompanham a immunidade activa e faltam na passiva, são sufficientes tambem para explicar as profundas differenças que entre ellas existem.»

Dieudonné resume assim a theoria de Ehrlich :

«Une toxine ne peut intoxiquer un individu que si celui-ci possède dans ses cellules des substances capables de la fixer. Les éléments de la cellule sur lesquels vient se fixer la toxine constituent les chaînes latérales ou récepteurs. Les antitoxines ne sont autre chose que ces mêmes chaînes latérales détachées des cellules et déversées dans le sang et les humeurs. En d'autres termes,

es organes qui possèdent une affinité spécifique pour les molécules de toxine, deviennent par là même des producteurs d'antitoxine. Les antitoxines, c'est à-dire les récepteurs régénérés continuellement et mis en liberté par les cellules au cours de l'immunisation, sont donc constituées en dernière analyse, par certains éléments normaux solubles des cellules.»

Esta mesma concepção é por Behring resumida na seguinte phrase celebre :

«La même substance, dont la présence dans les *cellules* est la condition indispensable de l'intoxication, devient l'agent de la guérison, dès qu'elle a passé dans le *sang*.»

Precipitina do carbunculo

Ao tratarmos das precipitinas vimos como pela acção precipitante do soro anti humano, se pode reconhecer uma mancha de sangue proveniente do Homem.

Com a acção precipitante do soro anticarbunculoso, poder-se-ha revelar tambem o protoplasma carbunculoso em uma polpa de qualquer órgão ou em um sangue que o contenha?

O problema assim posto é tão facil que a nós mesmos perguntamos, diz Ascoli, como é que o bacteriologista não tinha ainda pensado em aplicar o methodo da precipitina ao menos nos casos em que os ordinarios methodos de pesquisa se mostravam impotentes?

Elles bem se esforçavam para resolver o problema mediante o isolamento do germe carbunculoso, com extraordinaria persistencia na verdade, mas tambem com resultados dubios, descurando no entanto completamente a pesquisa dos constituintes bacillares originados na autolise, os quaes em verdade deverão apresentar-se em proporção inversa dos germes ainda integros, devendo pois com muita probabilidade encontral-os em quantidade tanto maior quanto mais alteradas forem as amostras, onde geralmente mais falham os exames, microscopico, cultural e experimental.

E' muito provavel, continúa o mesmo professor, que

tentativas em tal sentido tenham sido feitas, mas essas com toda a certeza foram detidas perante um obstaculo, levando á contestação evidente de que os soros anticarbunculoses em regra, não provocam sobre os extractos germes carbunculoses uma acção precipitante.

Só excepcionalmente foi dado aos Drs. Ascoli e Valente defrontarem-se com sôro anticarbunculozo precipitante. Muito poucos investigadores tiveram a sorte de ter entre as mãos um sôro precipitante. Assim, Bail não pôde distinguir a acção precipitante especifica, do poder coagulante do sôro normal e Carini julgou tratar-se duma acção agglutinante; e se Gruber encontrando-a, soube dar-lhe logo o seu verdadeiro significado, annunciando ulteriores pesquisas calou-se, dando o seu prolongado silencio margem a julgar se que, experimentando outros soros, jamais encontrou em algum, o poder precipitante.

A difficuldade de obter um sôro anticarbunculozo bom precipitante, apparece nos clara, quando Ascoli afirma que, nas suas primeiras pesquisas, só em quatro, dentre quarenta soros do Instituto Sieroterapio Milanense foi encontrada a acção precipitante duma maneira evidente!

Sôro precipitante

A norma seguida por Ascoli e Valente para a obtenção do sôro anticarbunculozo precipitante é muito instructiva e a sua historia muito interessante.

Desejosos da descoberta de um methodo que permitisse uma preparação facil, sempre que se quizesse, de tal sôro, para poderem satisfazer as analyses que lhes pediam e ainda para que outros as podessem fazer sem difficuldades e sem recorrer a elles, dirigiram-se aos varios directores dos Institutos serotherapicos pedindo amostras dos seus soros anticarbunculoses, na esperanza de encontrarem uma maior percentagem de soros precipitantes e de tirar dos dados relativos á via seguida para a immunisação dos animaes fornecedores, qualquer indicio sobre as condições mais favoraveis para a preparação.

Dentre os soros enviados pelos varios Institutos, os

de Berne manifestaram-se fortemente precipitantes, em nada inferiores aos melhores do Instituto Milanense, mas infelizmente as amostras enviadas, eram já os restos d'uma preparação antiga, e este Instituto já os não preparava. O unico sôro de Mula, fornecido pelo Instituto Pasteur de S. Paulo, manifestou-se um optimo sôro precipitante.

Colhidos alguns dados e feitas tentativas em tal sentido, preparando grandes animaes (Cavallo, Boi, Burro) e Ovelha, chegaram a bons resultados, pois examinando com regularidade o sôro do Cavallo e da Ovelha, no decurso da immunisação contra o carbunculo, conseguiram obter um bom sôro precipitante.

Da leitura da sua historia, porem, nenhum indicio poderam colher que os levasse a afirmar a superioridade da injeccão endovenosa sobre a sub-cutanea, ou o poder antigeno de certas culturas em confronto com outras, ou da acção da quantidade, pois o poder precipitante não correspondia com a regularidade precisa a permittir attribuir a este ultimo factor, uma importancia decisiva e de considerar como resolvido o problema a que se propuzeram. Nem mesmo as experiencias feitas em pequenos animaes os conduziram a resultados sufficientemente regulares para poderem ser reproduzidos em algum Instituto que quizesse praticar a reacção precipitante no carbunculo bacteridico.

Das suas numerosas experiencias concluíram, Ascoli e Valente, que o poder precipitante nos soros dos grandes animaes, quando se encontrava, apparecia em geral depois da primeira injeccão de dose de carbunculo, maior da que habitualmente basta para obter um sôro anticarbunculoso sufficientemente activo como therapeutico e com a prova do seu methodo de verificação.

Assim, tanto o Cavallo como o Burro, deram um sôro regularmente activo como therapeutico, depois de uma injeccão de dose de carbunculo, pequena relativamente, comparada á necessaria para provocar a producção da precipitina. Esta porem appareceu fugazmente, só depois da injeccão de vaccina em grande dose, como se o factor principal fosse a quantidade de substancia protoplasmatica introduzida, e fosse por isso indifferente a maior ou menor virulencia do germe, o que se harmo-

nisa bem com o facto da acção antagonista que, provocada, apparece indifferentemente sobre qualquer extracto carbunculozo quer provenha d'uma cultura virulenta ou atenuada. Depois de grande numero de experiencias ficaram convencidos que, na preparação dos animaes se devem empregar grandes doses de culturas não virulentas, evitando assim os insuccessos que com o emprego de bacillos virulentos seriam por certo inevitaveis. D'este modo, dada a facilidade de applicarem o methodo rapido proposto por Fernet e Müller, methodo por excellencia para a producção dos soros precipitantes, deram contudo preferencia ao emprego das culturas atenuadas, não porque temessem a surpresa do choque anaphylatico no decurso da preparação, mas pela maior rapidez que o processo de immunisação adquiria.

Que a precipitina carbunculosa representa os productos de reacção devida á introducção do protoplasma solúvel, independente do germe vivo, dizem-no os soros precipitantes (ainda que ligeiramente) da Ovelha e do Coelho, immunisados por elles com extractos muito concentrados de culturas de carbunculo em agar, filtrados pela vella Chamberland, de modo a ficar esteril a prova cultural e experimental.

Os dados obtidos pareciam-lhes contudo, guia bastante para a preparação de bons soros precipitantes, ao menos para aquelles que podessem dispor dum numero sufficiente de grandes animaes.

Porem, não obstante as numerosas experiencias de Ascoli e Valente, o problema a que se propozeram não ficou logo resolvido, mas com os primeiros soros precipitantes, provenientes de animaes que não foram submettidos ao processo de immunisação, a que Ascoli chamou classico, estabeleceram elles as bases fundamentaes para a applicação pratica das precipitinas na diagnose do carbunculo bacteridico pelo methodo serodiagnostico, já para os laboratorios, já para o veterinario da provincia.

Baseado na propriedade que a substancia precipitogenea manifestou de se deixar dissolver pelo soluto physiologico, o methodo de Ascoli e Valente, não offerencia a simplicidade e rapidez indispensaveis na pratica, pois o veterinario obrigado a executar a reacção no campo, ne-

cessitava de um methodo que o dispensasse não só de qualquer operação delicada, mas lhe eliminasse toda a difficuldade.

Era já conhecida a maneira como se comportava o soluto protoplasmatico carbunculoso para o dissolvente chloroformio e sabido tambem que os extractos da cultura do carbunculo em agar, na agua ou em soluto physiologico davam a reacção do biureto. A analyse chimica dos extractos, por seu lado, havia-lhes já revelado a presença de azote.

Ascoli levado pela curiosidade scientifica a continuar as suas pesquisas sobre os caracteres chimico-physicos do precipitogeneo carbunculoso, viu que esta substancia se avizinha, pela maneira de reagir em presença dos diversos catalysadores, ao precipitogeneo do cholera e do typho estudados por Pick.

Apresenta pois uma notavel resistencia aos fermentos proteoliticos e amiloliticos e ao calor, pois que não só fica intacto sôb a acção da fervura, mas ainda após o aquecimento prolongado durante alguns minutos que é incapaz de o destruir completamente.

Esta propriedade particular da precipitina do carbunculo foi aproveitada pelo seu descobridor — Dr. Ascoli, Libero Docente di Chimica Fisiologica nella R. Università di Pavia — para a diagnose do carbunculo pelo methodo da «Reacção de Ascoli — Thermo-precipitina».

Descobrimto de excepcional importancia pratica, veio tornar extremamente rapido o diagnostico do carbunculo bacteridico e a idealização do aparelho a que Ascoli deu o nome de «*diagnosticador do carbunculo hematico*» trouxe-lhe uma simplicidade tal, que vae até ao ponto de ser accessivel mesmo aos nada versados em assumptos de laboratorio.

Resolvida está difficuldade, o espirito de Ascoli preocupava-se com a não facil preparação do sôro precipitante. O labôr, porem, de numerosas experiencias deu-lhe o merito de resolver tão delicado problema, indicando-lhe que «*o factor principal para a produção do sôro precipitante reside no corpo bacillar, e não na sua virulencia.*»

Por isto concluiu que, para a sua preparação é melhor recorrer, como já o havia indicado, a culturas ate-

nueadas do carbunculo, ficando assim eliminadas as surpresas que possam esconder-se na virulencia do germe. Fazendo uso destas culturas (no Cavallo, Mulla, Burro e Ovelha) a immunisação foi rapida, com um decurso classico, como nos mostra o diagramma que illustra os seus trabalhos: «*Lo svolgimento della reazione precipitante nel carbonchio ematico*» (Biochimica e Terapia Spe-

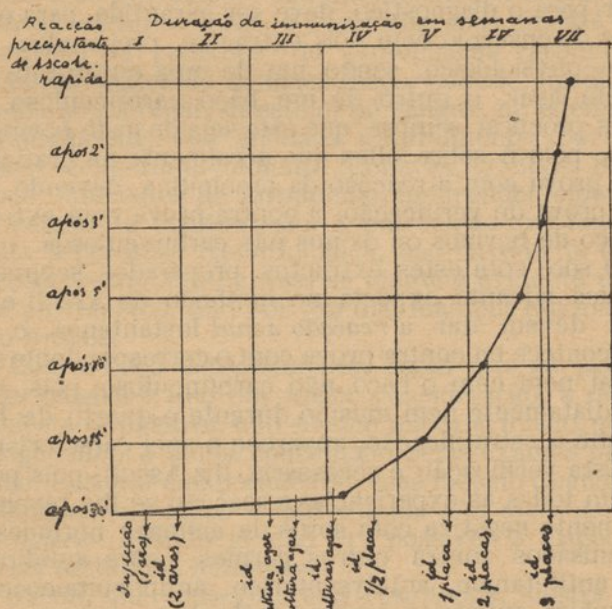


FIG. 1

riental); «*Der Ausbau meiner Praecipitinreaktion zur Milzbranddiagnose*» (Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie), que requintes de cortezia de Ascoli levaram a offerecer nos.

A curva do diagramma (Fig. I) reproduz graficamente o andamento de immunisação dum Burro que deu um bom sôro precipitante antes de sete semanas de preparação.

Sabido resolver assim tão delicado problema, era in-

tento nosso immunisar um animal, para praticar com o sôro a reacção precipitante no carbunculo bacteridico, mas o aproximar rapido do *fim do anno*, impediram-nos de o fazer.

A actividade de todo o sôro precipante que tem de servir para o diagnostico, deve ser garantida, para o que temos de ensaia-lo com dois extractos, preparados com soluto physiologico, sendo um de uma cultura do germe em agar, o outro de um baço carbunculoso. Devemos procurar sempre, que este seja de gado bovino ou ovino, pois é sobre elles que geralmente na pratica se faz a prova com a reacção da precipitina, devendo juntar á prova de verificação, a contra-prova com extracto de baço de bovinos ou ovinos não carbunculosos.

O sôro com estes extractos, preparados segundo a technica adeante exposta no methodo de Ascoli e Valente, devem dar a *reacção zonal* instantanea, o que não acontece na contra-prova com o correspondente sôro normal nem com o baço não carbunculoso, pois, nem immediatamente nem mesmo durante o quarto de hora seguinte á estratificação, apparece o anel caracteristico.

Esta verificação é necessaria, diz Ascoli, pois posto que em todas as experiencias a reacção se lhe revelasse geralmente negativa com soros de animaes normaes ou immunisados contra outros germes - sôro antidiphtherico, antitetanico, antidysenterico, antipneumococcico, antityphico, anticolico, contra o mal rubro - todavia usando extractos de culturas muito concentrados, assiste-se tambem ao apparecimento dum anel na prova testemunha, principalmente se o sôro usado é fresco. Este inconveniente, porem, que só muito raramente se nota, resolve se muito facilmente, diluindo oportunamente o extracto, ou substituindo-o por um de normal concentração. Esta contra-prova alem de indispensavel, mostra a razão do erro em que cahiu Bail, quando confundiu a precipitina do carbunculo com o poder precipitante do sôro normal.

Diagnostico com a precipitina

A precipitina do carbunculo contida nestes soros, provoca o apparecimento rapido da *reacção zonal* entre o sôro e os extractos e não diremos só em extractos de culturas carbunculosas e vaccinaes, mas ainda é capaz de revelar a presença do protoplasma carbunculoso em varios órgãos de animaes (baço, pulmão, figado, rim, capsula supra-renal, intestino) no sangue, no edêma, nos derramamentos dos animaes naturalmente (bovinos e ovinos) e experimentalmente (Cobayas, Coelhos, Burro e ovinos) infectados de carbunculo, independentemente do seu estado de conservação. A putrefacção que tanto difficulta a pesquisa bacteriologica, não impede de facto a reacção precipitante, a qual se mantem evidente nos órgãos putrefactos, não por um dia, mas por um mês, um anno e mais.

Com o baço especialmente, órgão que na pesquisa bacteriologica é tido em maior consideração, a reacção manifesta-se positiva, não só com material fresco, quando o diagnostico é ainda confirmado pelos exames microscopico, cultural e experimental, mas mesmo quando profundamente alterados e putrefactos «*ha mais de dezasseis meses*» quando já não era possivel o diagnostico com os methodos habituaes.

Ascoli, que conseguiu taes resultados, mostra ainda a especificidade da reacção, pois, fazendo exames com extractos de baços frescos e putrefactos de animaes da mesma especie dos que tinham fornecido o material carbunculoso, deram sem excepção resultados negativos, quer a proveniencia fosse de animaes sãos ou mortos por outras doenças (diphtheria, tuberculose, septicémia, cholera, meningite, pneumonia, raiva, mormo, edêma maligno e carbunculo symptomatico).

Methodo de Ascoli e Valente

METHODO DE LABORATORIO

A condição indispensavel para o bom exito da prova é podermos dispor dum sôro anti-carbunculoso bom precipitante.

O primeiro acto consiste na preparação do extracto, para o que é preciso dispor de uma cultura, em placa, de carbunculo ou vaccina com 24 horas, ou de um baço de animal morto de carbunculo.

A extracção da cultura faz-se com soluto physiologico, bastando para cada placa 5 a 6 c. c. que uma vez em contacto com a cultura, abandonamos por duas horas á temperatura do ambiente; filtra-se em seguida pelo papel, ou pelo amianto em tubo estrangulado especial (Fig. II) ou por meio da vella Chamberland, obtendo assim um filtrado limpido, mas por vezes um tanto amarelado. Com o baço, porem, a fim de precipitar a hemoglobina para obter um extracto limpido e incolor, tanto quanto possivel, emulsiona-se depois de previa trituração, com chloroformio na proporção de 10 c. c. para cada baço de Cobaia ou quantidade correspondente de qualquer outro baço; mantida assim esta mistura cerca de 5 horas á temperatura do ambiente, decanta-se o chloroformio (melhor com chupêta de Pasteur) que se não evaporou ou não foi absorvido, e emulsionada a polpa com cerca de 5 c c de soluto phy-



FIG. II

siológico, abandona-se durante 2 horas, findas as quaes se filtra, como já vimos, obtendo também assim um filtrado limpo, excepcionalmente corado.

Preparados assim os extractos, clarifica-se o sôro precipitante e o sôro normal, mediante filtração pelo amianto, pela vella Chamberland ou centrifugando-o. Uma vez promptos todos os elementos, pratica-se a *reação zonal*, para o que se distribue por meio de duas chupêtas de Pasteur em duas pequenas provêtas (Fig. III) uma porção do extracto da cultura na primeira e na outra igual quantidade de extracto do baço; cada um dos extractos é experimentado com sôro precipitante e com sôro normal, os quaes se colocam também por meio de duas chupêtas sôb os dois extractos e em porções eguaes.

O ensaio será dado como prompto e o sôro precipitante correspondendo ao fim desejado, quando o anel característico apparecer instantaneamente na provêta com sôro precipitante e falte por completo na provêta com sôro normal, ainda depois de um quarto de hora de permanencia á temperatura do ambiente.

Nos laboratorios estas contra-provas não deverão ser nunca omittidas; o material suspeito será também experimentado (depois de previa trituração como foi dito para o baço) com sôro

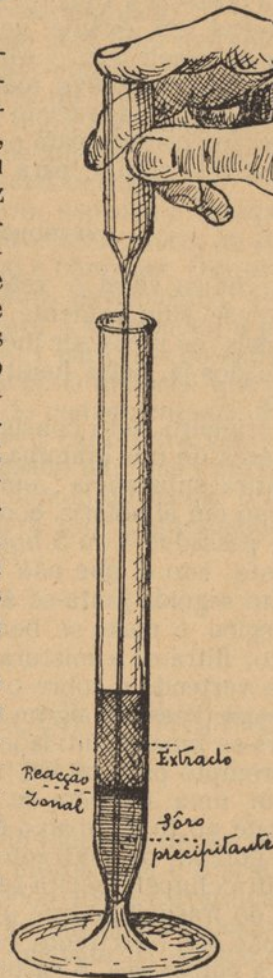


FIG. III

precipitante e com sôro normal correspondente. Nos casos de duvida, que só excepcionalmente se dão, e em que seja possível a hypothese de que tenham penetrado no material em exame germes pseudo-carbunculosos capazes de reagir com o sôro precipitante, devemos experimentar o respectivo material em variadas diluições, pois ainda que estas variem de 1:10, 1:50, 1:100 os resultados serão positivos para o material carbunculoso, sempre negativos, porem, para os não carbunculosos.

METHODO PRATICO

Na clinica rural o veterinario praticará a reacção, limitando-se simplesmente a examinar o material suspeito, pois os soros ser-lhe-ham fornecidos, clarificados e verificados já, pelos Institutos incumbidos da sua preparação.

O primeiro acto consiste em tirar do animal suspeito cêrca de um gramma de polpa esplenica ou qualquer outra substancia; emulsiona-se, depois de previa trituração em almofariz, com cerca de 10 c. c. de chloroformio; passadas 4 ou 5 horas, decanta-se o chloroformio excedente, isto é, que não se evaporou nem foi absorvido. Em seguida junta-se á polpa 5 a 10 c. c. de soluto physiologico e mexe se bem; passadas duas horas de contacto, filtra-se a mistura pelo papel e o filtrado clarifica-se vertendo-o sobre o amianto do tubo estrangulado especial. Passado algum tempo, no fundo deste tubo, encontra-se uma quantidade sufficiente de extracto limpo, prompto para prova.

Com uma chupêta de Pasteur, tira-se pelo orificio que existe no tubo, abaixo do estrangulamento, uma pequena porção de extracto que se lança na provêta. Com outra chupêta aspira-se egual porção de sôro precipitante do frasquinho que o contem e estratifica-se com precaução sôb o extracto, como indica a fig. III.

Se a substancia é carbunculosa, no ponto de contacto entre o sôro e o extracto, apparece um precipitado circular, isto é, o anel caracteristico da *reacção zonal*. Este processo pode abreviar-se, omittindo a descoloração pelo chloroformio, fazendo logo em seguida á trituração, a extracção do precipitogeneo com soluto physiologico.

A filtração pelo papel pode ser suprimida e para abreviar a clarificação do extracto, podemos centrifuga-lo com certa lentidão, no tubo estrangulado.

A reacção assim feita não será dum extremo rigor, mas apesar de tudo, satisfaz inteiramente, tanto mais que o veterinario, ao contrario do que acontece nos laboratorios, opera por via de regra com substancias frescas, e por isto mesmo, menos sujeito ás causas de erro com que tem de contar o bacteriologista.

O material do laboratorio, especial e indispensavel para executar a reacção, reduz-se ao sôro, ao tubo estrangulado, á provêta com pé e chupêtas. Os outros elementos; — chloroformio, soluto physiologico, almofariz com martello (necessario para a trituração) a provêta, funil, papel de filtro e amianto para o tubo estrangulado, encontram-se na pharmacia. O material que a prova não inutilisar, pode, depois de convenientemente desinfectado, lavado e enxuto, servir para outra vez.

O sôro que não fôr utilizado em dada prova, pode servir para outra, tendo o cuidado de fechar o frasquinho á lampada, logo a seguir á prova, guardando-o em sitio fresco e ao abrigo da luz.

Reacção de Ascoli "Thermoprecipitina,,

A exposição detalhada do methodo de Ascoli e Valente mostra-nos bem a sua morosidade e a pratica, indicando as difficuldades diz-nos que a estratificação do sôro sôb o extracto é operação um tanto delicada.

Felizmente a thermo-estabilidade da substancia que reage duma maneira especifica com a precipitina do sôro anticarbunculoso, é uma qualidade preciosa e, utilizada directamente é muito importante na pratica, pois reduz ao minimo o tempo necessario para a reacção, reunindo no simples acto da fervura a descoloração e extracção do precipitogeneo.

Por outro lado as dificuldades que offerece ao leigo em estudos de laboratorio a estratificação do sôro sôb o extracto são eliminadas com o aparelho a que Ascoli, deu o nome de *diagnosticador do carbunculo hematico*,

que filtra e estratifica automaticamente o extracto sobre o sôro, dispensando assim o operador da primitiva e delicada technica de estratificar com a chupêta o sôro sôb o extracto.

Este aparelho consta de duas partes:

1) Uma provêta com pé (Fig. iv) provida dum estrangulamento (e) e dum alargamento (a) por baixo daquelle; esta provêta contem até ao limite (l) sôro precipitante (s.p) que se conserva perfeitamente limpido, pois os precipitados eventuaes depositam se no alargamento.

2) Um pequeno funil (Fig. v) com filtro de amianto (a) que termina por um tubo capilar (t.c) recurvado e cortado em bisel ou bico de flauta (f).

Para montar o apparelho (Fig. vi) introduz-se o funil na provêta de maneira que a extremidade (f) encoste á sua parede e o filtrado seja forçado a escorrer ao longo da mesma e a estratificar-se lentamente sobre o sôro.

Graças á idealisação do aparelho descripto, elimina-se a delicada manobra com a chupêta e associa-se á estratificação automatica do extracto, a filtração.

Nos laboratorios, onde se dispõe de todo o material necessario para praticar a reacção, onde o emprego de chupêtas é de uso corrente, não constituindo difficuldade, a reacção faz se facilmente. Na pratica, porem, a reacção da thermo-precipitina pratica-se do seguinte modo:

1) Toma-se uma provêta vulgar em que se deita sôluto physiologico⁽¹⁾ até ao meio; introduzem-se neste liquido dois grammas de material a examinar e immerge-

(1) Melhor se ligeiramente acidulado com acido acético a 1‰.

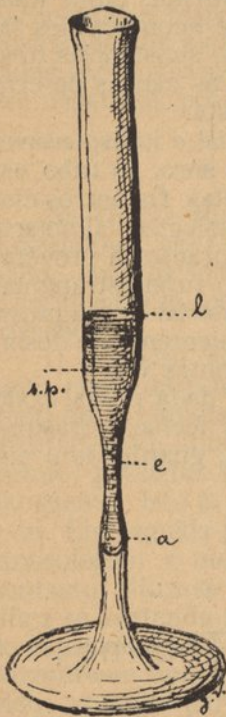


FIG. IV

se o tubo em banho-maria onde se conserva em ebulição por alguns minutos; tira-se em seguida o tubo do banho e deixa-se resfriar, podendo abreviar-se o resfriamento por meio dum jacto de agua fria.

2) Deita-se no funil do aparelho o extracto assim obtido, e pegando na provêta com a mão direita, observa-se contra a luz a superficie de contacto entre o sôro e o extracto, para o que se faz anteparo com o braço.

Se o material em exame provem de um animal carbunculoso, veremos apparecer na zona de contacto (l) entre os dois liquidos um anel circular dum branco-sujo, caracteristico da reacção zonal.

No louvavel intento de diffundir entre os veterinarios da provincia o methodo da *thermo-precipitina*, Ascoli reuniu numa caixa todos os elementos necessarios para praticar a reacção no proprio local.

Deste tão util e interessante aparelho com que Ascoli se dignou brindar-nos, entendemos, por o julgar util, dar um schema do seu conjuncto, (Fig. vii) figurando alem do aparelho já descripto, uma provêta com bico e uma pastilha de chlorêto de sodio para preparar o soluto physiologico.

Com o seu invento, Ascoli, conseguiu adaptar a technica da diagnose do carbunculo com a precipitina ás exigencias da pratica quotidiana do veterinario da provincia, fazendo-a sahir do circulo muito restricto do laboratorio.

A confirmar os brilhantes resultados de Ascoli, foi precisamente na Allemanha, país em que mais se impunha, pelas razões já expostas, um methodo seguro de diagnostico, que se realisaram as primeiras experiencias, tendentes a verificar os resultados publicados por Ascoli, chegando a conclusões honrosas para este Professor.

Assim Bierbaum, que operou no Cobaya, entre outras conclusões, diz:

«Com o sôro precipitante de Ascoli pode-se demonstrar a infecção carbunculosa com certeza, ainda quando os methodos usuaes de laboratorio se comportam em



FIG. V

parte ou totalmente negativos por causa da avançada putrefacção da substancia em exame. As contra-provas feitas com orgãos sãos e não carbunculoses, confirmam a especificidade absoluta da reacção.»

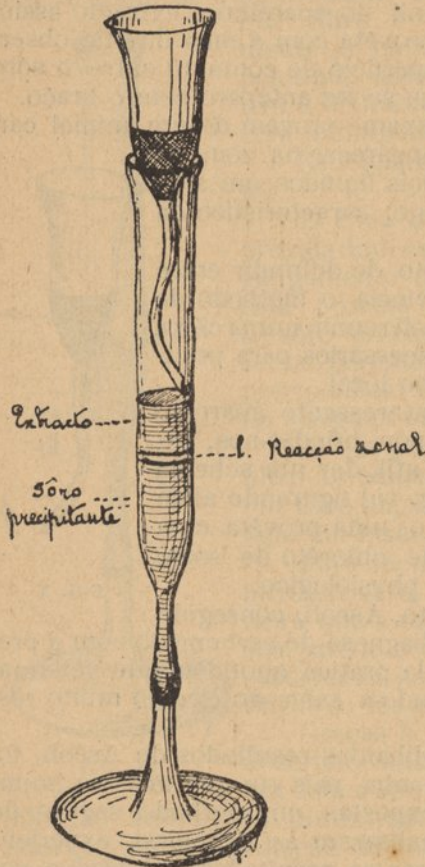


FIG. VI

Pfeiler utilizando-se de soros da mesma proveniencia diz que: «As pesquisas o conduziram aos mesmos resultados obtidos e referidos pelo professor Ascoli. Que se pode demonstrar, tambem em orgãos de avançada putrefacção a presença da substancia especifica (precipitogeneo) proveniente do protoplasma do bacillo do carbunculo hematico, ainda quando os methodos bacteriologicos empregados com o mesmo material para a diagnose do carbunculo hematico dão resultados negativos.»

Roncaglio tira das suas pesquisas, feitas com baço de bovinos mortos de carbunculo hematico as conclusões seguintes:

«1.º) O soro de Ascoli tem acção precipitante especifica: esta

aparece só ao contacto dos filtrados de orgãos carbunculoses e nunca ao de orgãos sãos ou affectados de outras doenças.

2.º) A reacção Ascoli obtem-se não só com orgãos provenientes de animaes mortos ha pouco tempo mas

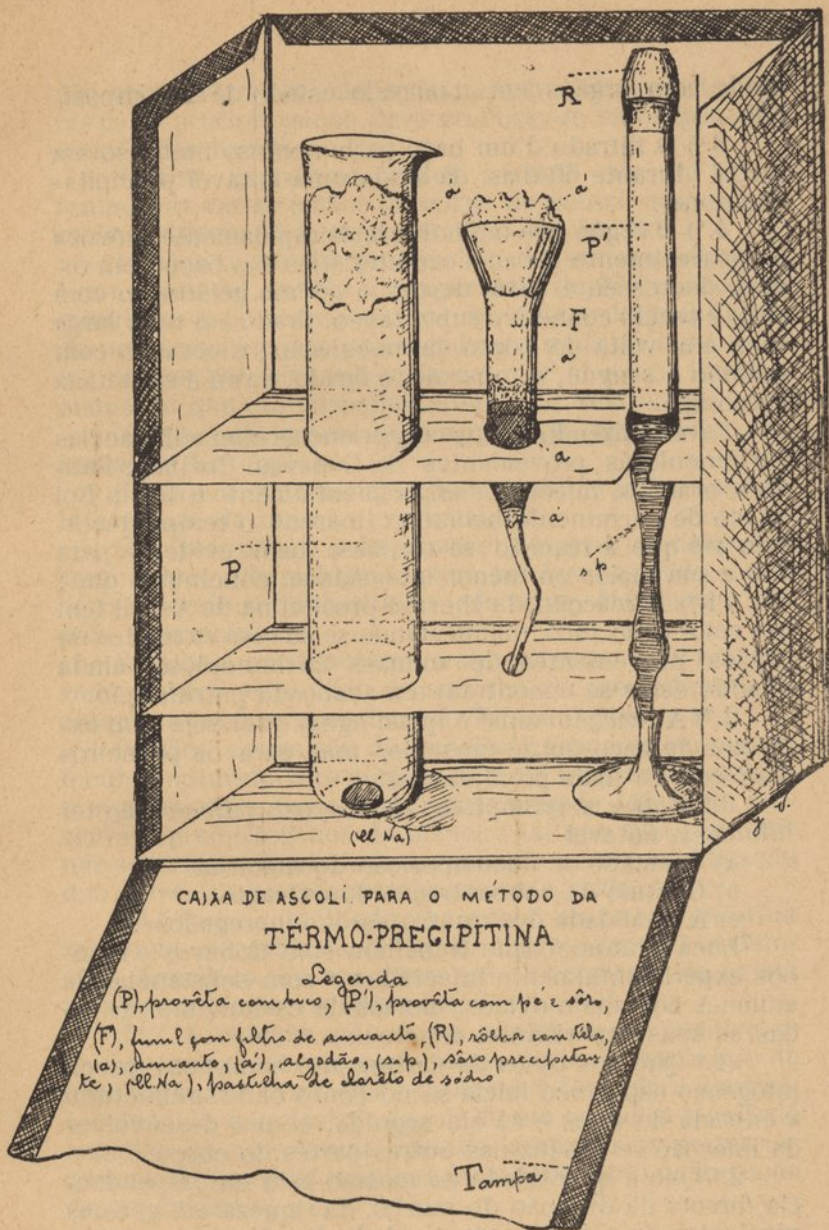


FIG. VII

ainda com órgãos em avançado estado de decomposição.

3.º) O filtrado d'um baço carbunculoso immerso em alcool durante 60 dias, dá ainda uma notavel precipitação zonal.

4.º) O órgão que melhor e mais rapidamente provoca o apparecimento do anel caracteristico é o baço; em ordem decrescente está depois o edêma gelatinoso com pelle e tecido connetivo subcutaneo, tirado em uma larga zona em volta do ponto de inoculação; o coração com pulmão e sangue, o musculo, o figado, o rim e substancia cerebral.»

Favero fazendo as suas experiencias com substancias carbunculosas provenientes de Cobayas, Coelhos, Ratinhos brancos, infectados experimentalmente e de um Boi morto de carbunculo hematico, marcou o tempo decorrido até que a reacção se tornasse bem evidente para ver a sua maior ou menor intensidade, concluindo que:

«1.º) A reacção da thermo-precipitina de Ascoli tem um valor especifico, manifestando-se só com extractos de órgãos provenientes de animaes carbunculosos ainda quando estes se encontram em avançada putrefacção.

2.º) A reacção zonal é quasi igual quer seja com extractos de baço ou de musculo, mas para os primeiros manifesta-se mais promptamente.

3.º) Sobre a promptidão da reacção parece não ter influencia notavel:

a) O estado de decomposição do material.

b) O titulo de concentração do extracto.

c) A qualidade dos quatro soros empregados».

Luca Granucci, que trabalhou com Cobayas e Pomboes experimentalmente infectados e com substancias de animaes bovinos e ovinos, mortos de carbunculo, de todas as suas experiencias conclue:

«1.º Que nos casos de carbunculo hematico o precipitogeneo especifico inicia-se no ponto onde se effectuou a entrada do virus e só em seguida, com o desenvolver da infecção se produz nas outras partes do corpo.

2.º Que a quantidade do mesmo está em dependencia directa da duração do morbo, da riqueza em germes virulentos ou seja da receptividade dos diversos órgãos para com o virus, e que, nos casos em que os germes

são muito raros ou não existem em outras partes do corpo, o precipitogeneo deve procurar-se só no ponto de eleição dos bacillos.

3.º Que quando se produz, persiste por um certo tempo nas varias partes do corpo do animal vivo, ainda mesmo depois do desaparecimento dos bacillos.

4.º Que o precipitogeneo alem de ser normalmente thermo estavel, resiste á temperatura de 100º por alguns minutos e á putrefacção ; que se não extingue depois de um dessecamento prolongado por mais de um anno e em órgãos conservados em alcool por 11 annos mesmo, enquanto que em formalina altera-se e destroe-se.

5.º Que não passa, porem, para os liquidos de conservação dos órgãos.

6.º Que a concentração dos extractos influe sobre a intensidade da reacção precipitante.

7.º Que não é indispensavel preparar os extractos com soluto physiologico e que por isso, quando o não houver, pode ser substituido pela agua distillada e até pela agua commun.

8.º Que a putrefacção e o aquecimento a 56º não privam o sôro especifico da sua virtude precipitante ; no entanto a uma temperatura de 70º esta attenua-se.

9.º Que a emulsão do material carbunculoso em vehiculos notavelmente acidos, alem de conservar por mais tempo os extractos e tornar mais limpido o filtrado, conserva o precipitogeneo de maneira tal que este pode tornar-se evidente com o sôro, mediante previa modificação dos extractos em reacção fracamente acida.

10.º Que o methodo de Ascoli *thermo-precipitina* responde maravilhosamente ao diagnostico do carbunculo hematico. Só nos casos em que o virus não existe nos parenchimas, os extractos destes, falham.

11.º A reacção não cessa porem de ser positiva se se usa para a prova o material da porta de entrada e de localisação do virus. Por este facto é bem clara a necessidade de não desistir depois de um primeiro resultado negativo da experiencia, mas de pesquisar as partes organicas que melhor mantenham o substracto da infecção carbunculosa.»

Conhecidos já os brilhantes resultados de auctores italianos e alemães, a nós mesmo perguntamos com que ousadia vimos enfileirar o nosso trabalho ao lado dos de tão illustres homens de sciencia ? !

Dada porem a excepcional importancia da nova conquista de Ascoli, a necessidade de assumpto para *these* e o nosso proposito inabalavel desde os primeiros annos do nosso curso, de nada apresentar para dissertação, a não ser um trabalho experimental, a isso fomos levados.

Quiz o acaso que o nosso muito amigo e illustre medico-veterinario, Luiz Nunes, fosse colocado em Lourenço Marques ao serviço da Republica, precisamente na occasião em que se dispunha a tratar tão importante quão interessante assumpto, sugerido pelo eminent Director do Instituto Bacteriologico Camara Pestana.

Na impossibilidade pois, de poder realizar o seu proposito antes da sua partida para aquella colonia, gentilmente no-lo ceden, pelo que nos confessamos muito gratos, mas esqueceu-se de nos ceder tambem aquella competencia que lhe é peculiar.

Apesar de tudo, os resultados das nossas experiencias, realisadas com soros amavelmente enviados pelo professor Dr. A. Ascoli, vão ser publicados, o que em verdade fazemos de boa vontade no intento não só de confirmar os brilhantissimos resultados de Ascoli e outros experimentadores, mas para que, publicados na nossa dissertação inaugural, possamos contribuir assim, para a vulgarisação de tão admiravel meio de diagnostico.

Segundo indicações do proprio Ascoli, todos os soros precipitantes que serviram nas nossas experiencias vinham do Instituto Sieroterapico Milanense garantidos na sua actividade, pelo criterio atraz exposto.

O auxilio verdadeiramente primacial prestado pelo Professor Dr. Alberto Ascoli, com aquella cortezia propria do seu saber, tornou-o credor perpetuo da nossa mais sincera gratidão. Alegramos-nos pois, por ter occasião de agradecer aos Professores Doutores A. Ascoli e S. Bel-

fanti, director do Instituto Sieroterapico Milanense, o auxilio prestado e enaltecer-lhes a infinita cortezia usada naquelle Instituto, que tem por divisa a *sympathica* missão de auxiliar todas as pesquisas scientificas.

As substancias carbunculosas que serviram para exame nas nossas experiencias eram provenientes de animaes experimentalmente infectados (Cobayas, Coelhos, um Carneiro e uma Cabra) e duma outra Cabra morta de carbunculo natural que o nosso amigo Justo Garcia Pereira d'Agrella, illustre medico-veterinario em Campo Maior (Alentejo) se dignou enviar-nos. Como a prova, que no campo biologico é feita com a reacção da *thermo-precipitina*, se realisa geralmente na pratica sobre órgãos bovinos e ovinos, nós bem procuramos obter taes productos, para o que nos dirigimos a muitos illustres medicos-veterinarios da provincia, mas felizmente para a economia nacional, elles não tiveram na sua clinica, durante a realisação dos nossos trabalhos, caso algum de carbunculo!

A todos lhes agradecemos a boa vontade de serem uteis á sciencia, mas devemos especialisar os nossos amigos Antonio Canejo, illustre quintanista de medicina veterinaria, e Alberto Brito, distincto medico-veterinario em Alcacer do Sal que, interessando-se sobremaneira por todos os assumptos scientificos, nos enviaram visceras de animaes mortos de varias infecções.

Do confronto dos diversos meios de diagnostico (MAPPA II) claramente se vê que o *diagnostico do carbunculo bacteridico pela reacção de Ascoli «thermo-precipitina»* é possivel mesmo quando falham os exames microscopico e cultural. Tendo por vezes chegado a resultados negativos com estes dois ultimos meios de diagnostico, visto que as tabellas o não indicam, devemos dizer que, como complemento, mais de uma vez recorremos tambem á inoculação experimental que como aquelles egualmente falhou (3 experiencias). Posto que o titulo de concentração dos extractos habitualmente empregados por nós fosse de 1:5, fizemos variar o titulo de concentração dum dos nossos extractos de baço de Carneiro de 1:5, 1:10, 1:20 e fazendo a prova com o soro n.º 12 a

reacção foi sempre positiva sem que, contudo, a intensidade da reacção se modificasse notavelmente.

Fazendo variar de 1:5, 1:50, 1:100 o titulo de concentração de um outro extracto de baço de Cabra morta havia já quatro meses e fazendo a prova com o soro n.º 5, o anel característico da reacção zonal apparecia sempre entre o soro e o extracto, mas a sua intensidade diminuia com o augmento da diluição.

Propositadamente deixamos ao abandono durante um numero de dias variavel de 1 a 10 entre a morte e a autopsia alguns cadaveres de Cobayas infectadas, a fim de putrefazerem e para que as bacterias carbunculosas, assim ao abrigo do ar não podessem esporular. Pois mesmo nestas condições e quando já não era possível o diagnostico por nenhum dos methodos habituaes de laboratorio (nestas experiencias não recorremos ao Processo de Strasburgo) as provas feitas com baços d'aquelles animaes deram sempre resultados positivos.

Os productos carbunculosos que serviram na quasi totalidade das restantes experiencias foram abandonados no meio ambiente do laboratorio, depois da autopsia dos animaes durante o tempo maximo de 179 dias, excepção feita, porem, para dois fragmentos de baço de origem ovina um, caprina outro, que foram colocados em alcool. O primeiro esteve durante quatro meses a contar do dia seguinte á morte do animal, data em que fizemos com resultado positivo o exame microscopico e cultural; o segundo tambem durante quatro meses a contar do septimo dia depois da autopsia do animal, epoca em que já não foi possível o diagnostico pelos methodos habituaes de laboratorio. Pois ainda em todos estes casos os resultados da reacção precipitante de Ascoli, obtidos assim com substancias frescas umas, putrefactas outras e ainda conservadas em alcool como já havia feito Roncaglio foram sempre positivos, exceptuando o soro de leite de Cabra que deu resultado negativo e a glandula mammaria do mesmo animal que deu uma reacção incerta com o soro n.º 4. (1)

(1) O soro anticarbunculoso portuguez do dr. Palma, não manifesta em presenca de varios orgãos de differentes animaes carbunculosos nenhum poder precipitante, não obstante o seu valor therapeutico.

Por outro lado dois filtrados de extractos tratados pelo chloroformio e soluto physiologico—um de baço de Cobaya preparado ao vigessimo segundo dia depois da autopsia do animal e abandonado na geleira durante 153 dias, e outro de um figado de Coelho preparado ao 6.º dia depois da autopsia do animal e abandonado na geleira durante 147 dias, deram tambem reacção positiva.

Como Luca Granucci, tivemos occasião de verificar tambem, que não é indispensavel prepara os extractos com soluto physiologico, pois fazendo dois extractos de baço de Cabra morta, havia já 197 dias, nm com agua distilada outro com agua commum, e executando as provas com o sôro n.º 8, os resultados da reacção foram positivos.

Não podemos fixar a escala da riqueza dos differentes órgãos carbunculoses em precipitinas, visto que não fizemos ao mesmo tempo e com o mesmo sôro a reacção precipitante com os respectivos extractos.

Os diversos ensaios feitos permitem concluir no entanto que é o baço, o órgão que mais rapida e nitidamente dá o anel caracteristico da reacção zonal.

Em verdade, sendo o baço o órgão geralmente preferido para as pesquisas bacteriologicas, a demonstração practica não faz mais que confirmar que a intensidade da reacção é de facto proporcional ao numero de germes carbunculoses que tenham penetrado no material submettido á prova, e que a conclusão tirada é inteiramente verdadeira.

Como porem a intensidade da reacção depende tambem, alem doutras circunstancias, do maior ou menor poder precipitante do sôro, nós não referiremos mais nada além do que se deduz do MAPPA II, com as suas observações.

A demonstrar a especificidade da reacção temos a juntar aos resultados negativos dos auctores atraz citados, os nossos, obtidos na contra-prova (MAPPA III) com órgãos frescos e putrefactos de animaes sãos e mortos de variadas infecções, positivamente não carbunculoses, das mesmas e de differentes especies dos que forneceram as substancias carbunculosas.

Não devemos, porem, deixar de relatar, que assistimos tambem, ao apparecimento, não rapido, dum anel

entre o sôro e o extracto, em duas provas. Usando porem do artificio indicado por Ascoli, isto é, fazendo a prova com o extracto diluido ou com outro de normal concentração, o pseudo anel não mais apparecia.

Manifestando ao Professor Dr. Alberto Ascoli interesse de que entre as varias doenças que serviram a confirmar a especificidade da reacção, pudessemos contar o carbunculo symptomatico, que inoculações de velhos germes não haviam produzido, com a gentileza de sempre, aquelle illustre professor promptamente nos enviou material que, inoculado, deu o fim visado.

As provas assim feitas com substancias provenientes de animal morto de carbunculo symptomatico, dando resultados negativos, não fizeram mais do que confirmar os resultados já obtidos por aquelle professor, que havia demonstrado como a reacção da precipitina pode servir em caso de duvida, para a differenciação dos dois carbunculos.

A importancia scientifica da nova conquista de Ascoli é grande por certo, e a sua immediata applicação practica á diagnose do carbunculo, veio resolver, sem duvida um problema de excepcional importancia.

Com o methodo da *thermo-precipitina*, uma vez entrado no uso diario da clinica rural, nos matadouros e nas «barreiras» onde chegam os animaes, mortos sem a inspecção medico-veterinaria ante e post-mortem, dando margem a que a fraude occulte ao inspector qualquer indicio, no exame anatomo-pathologico, para a suspeição carbunculosa, hão de ganhar, alem da diagnose, a prophylaxia, a que estão ligadas a hygiene publica e a economia nacional.

Conclusões

I

Com a reacção precipitante de Ascoli pode fazer-se o diagnostico do carbunculo bacteridico mesmo quando não é possível caracterisa-lo pelos methodos microscopico, cultural e experimental.

II

Que é especifica a reacção precipitante de Ascoli, pois o anel caracteristico da reacção zonal apparece só ao contacto do sôro com extractos de órgãos carbunculosos, nunca de órgãos sãos ou não carbunculosos.

III

Com a reacção precipitante de Ascoli é possível o diagnostico do carbunculo bacteridico com órgãos conservados em alcool durante quatro meses pelo menos; isto quer no momento da immersão permittam ainda ou não a diagnose pelos methodos habituaes.

IV

E' o baço o órgão cujo extracto em contacto com o sôro mais prompta e nitidamente dá a reacção zonal.

V

Com a reacção precipitante de Ascoli é possível demonstrar a existencia do precipitogeneo carbunculoso em filtrados de órgãos carbunculoses, frescos ou não, quando colocados na geleira durante cento e cincoenta e tantos dias, pelo menos.

VI

E' preferivel, mas não indispensavel, preparar os extractos com soluto physiologico, podendo tambem, quando o não honver, substitui-lo pela agua distillada e até pela agua commum.

VII

A rapidez e intensidade da reacção diminuem com o augmento da diluição dos extractos, com o menor poder precipitante do sôro, não influndo de maneira notavel a maior ou menor decomposição das substancias empregadas.

Bibliographia

- A. Ascoli—* La precipitina nella diagnosi del carbonchio ematico, *La Clinica Veterinaria*, 1911, No. 1, 15. Januar.
- * Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactéridien. *Compt. rend. Soc. de Biol.*, Séance du 14 février 1911
- , Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand. *Centralbl. f. Bakt., Orig.*, Bd. 58, No. 2.
- , Biologische Milzbranddiagnose mittels der Präzipitinmethode. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1911, No. 8, 19. Februar
- * Diagnosi del carbonchio ematico col metodo della termoprecipitina. *La Clinica Veterinaria*, 1911, No. 4, 28 febbraio
- , La precipitina del carbonchio ematico. *Pathologica*, Anno III, No. 56, 1 marzo 1911.
- * Il diagnosticatore del carbonchio ematico. *La Clinica Veterinaria*, No. 9, 15 maggio.
- * Lo svolgimento della reazione precipitante nel carbonchio. *Biochimica e Terapia Sperimentale*, Anno III, Fasc. 2, 1911.
- , Zur Technik meiner Präzipitinreaktion bei Milzbrand. *Berl. tierärztl. Wochenschr.*, 111, No. 22, 1. Juni.
- , Les précipitines dans le diagnostic du charbon bactéridien. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 1911, No. 6, juin.
- * La colorazione metacromatica del bacillo del carbonchio. *La Clinica Veterinaria*, 1911, n.º 7, 15 de Abril.
- , * Der Ausbau meiner Präzipitinreaktion zur Milzbranddiagnose. *Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie* XI Bd S. 103, 1911.
- * Elementi di Sierologia.
- , e Valenti, Diagnosi biologica del carbonchio ematico. *Società Italiana di Scienze Naturali*, Seduta 6 marzo 1910. *Biochimica e Terapia Sperimentale*, Anno II, Fasc. 3 *La Clinica Veterinaria*. Anno 1910, No. 21.
- , Biologische Milzbranddiagnose. *Zeitschr. f. Infektionskrankh. etc.*, Bd. 7, 1910, Heft 5/5.

- K. Bierbaum, Beitrag zur Milzbranddiagnose mit Hilfe der Präzipitations-methode. Berl. tierärztl. Wochenschr., 1911, No. 12, 23 März.
- W. Pfeiler, Die Diagnose des Milzbrandes mit Hilfe der Präzipitations-methode. Berl. tierärztl. Wochenschr., 1911, No. 13, 30. März.
- , La diagnosi del carbonchio ematico per mezzo della precipitina. Il Moderno Zootatro, 1911, No. 4, 30 aprile.
- G. Roncaglio, — * Sulla specificità della «Reazione Ascoli» (Termoprecipitina) nella diagnosi del carbonchio ematico. La Clinica Veterinaria, 1911, No. 10, 30 maggio.
- , Ueber die Spezifität der Ascolischen Reaktion bei verschiedenen Organen. Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere, 1911, Heft 7.
- D. Zibordi, La censervazione del materiale carbonchioso in rapporto alla diagnosi colla «reazione Ascoli» (termoprecipitina). Il Nuovo Ercolani, 1911, No. 16.
- , Die Konservierung milzbrandigen Materials für die Ascolische Reaktion (Thermopräzipitin), Tierärztl. Centralbl., 1911, No. 19.
- Fr. Favero — * Contributo alla diagnosi del carbonchio ematico colla «Reazione Ascoli» della termoprecipitina. La Clinica Veterinaria 1911, No. 17.
- , Beitrag zur Diagnose des Milzbrandes mittels der «Ascolischen Reaktion» (Thermopräzipitin). Folia Serologica, Bd. 7, Heft 8.
- A. Casalotti — La termoprecipitina nella diagnosi del carbonchio ematico. Contributo sperimentale. Tip. Paoli Sassuolo 1911.
- F. de Gasperi — Del siculo valore della «reazione di Ascoli» della termoprecipitina nella diagnosi del carbonchio ematico. Giornale della R. Società Nazionale Veterinaria, Vol. 60, No. 26.
- L. Granucci — * La reazione precipitante Ascoli nella diagnosi del carbonchio ematico. La Clinica Veterinaria, Bd. 44, 1911, No. 16.
- Luigi Viganò — * Manual di Tecnica Siero-diagnostica.
- Kolle et Hetsch — * Bacteriologia expérimentale.
- Brouardel et Gilbert — * Maladies Parasitaires Communes A' L' Homme et Aux Animaux.
- Cantacuzène — * Recherches sur l'origine des précipitines. Annales de l'Inst. Pasteur — 1902.
- Etienne Burnet — * Microbes e Toxines.
- M. Muller et A. Engler (Strasbourg) — * Uber die Erhöhung der Leistungsfähigkeit des strassburger Verfahrens zum Nachweis von Milzbrand in Bulletin de l'Inst. Pasteur, 1911, n° 1, 15 de janvier.

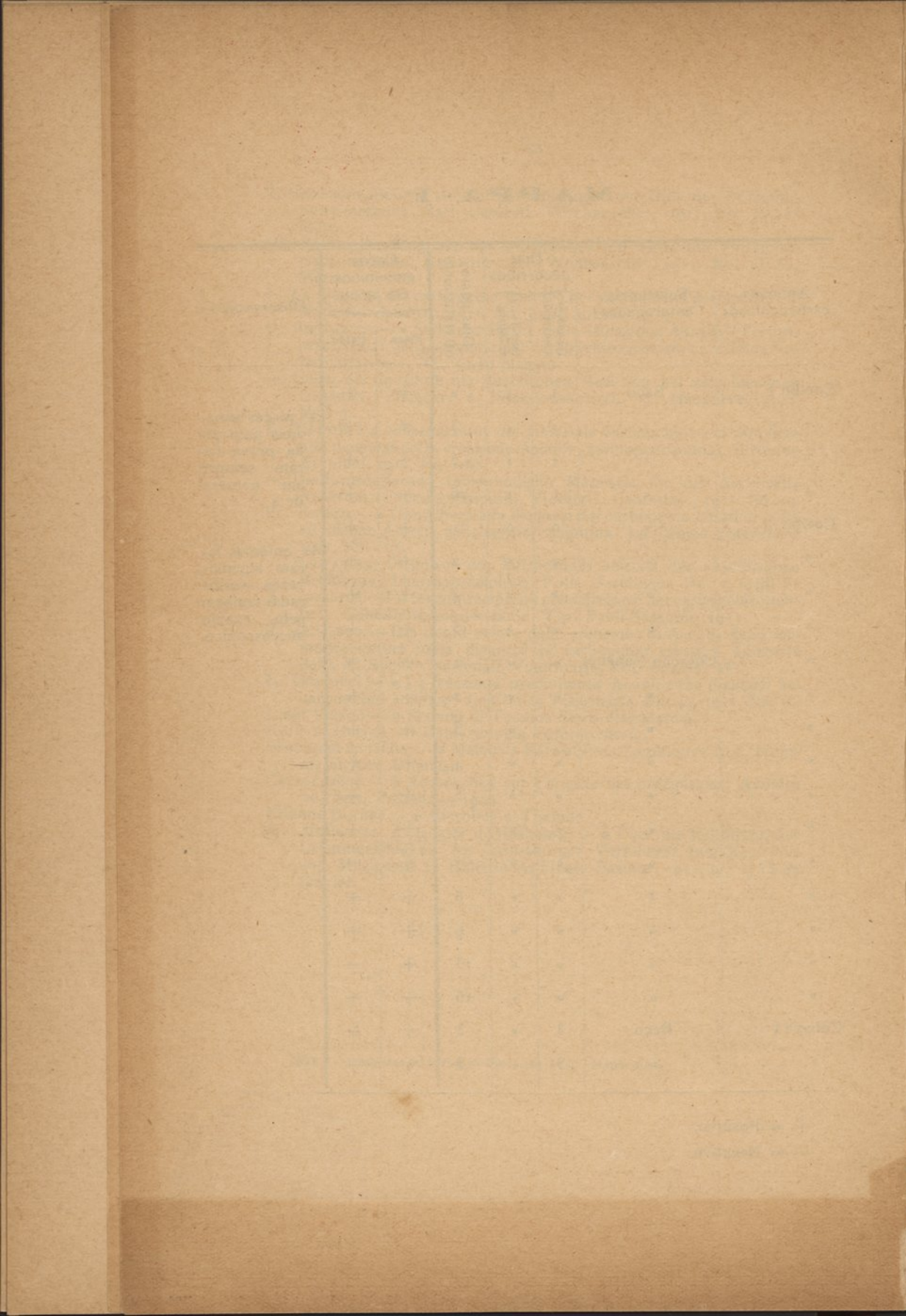
NOTA — O asterisco (*) indica os livros que foram compulsados.



MAPPA I

Animaes carbunculosos	Substancias empregadas	Dias decorridos		Dias gastos no transporte	Cacos embebidos em agua		Observações
		Da morte á autopsia	Depois da autopsia		Placa	Caldo	
Coelho I	Baço	1	1	2	+	+	As placas seme- adas para ca- da prova fo- ram sempre em numero de 4
» »	»	1	1	3	+	+	
»	»	1	1	5	+	+	
»	»	1	1	26	—	+	
Coelho II	»	0	0	1	+	+	As colonias fo- ram algumas vezes verifi- cadas tambem pelo exame microscopico
»	»	»	»	2	+	+	
»	»	»	»	4	+	+	
»	»	»	»	15	+	+	
»	Coração (sangue)	»	»	1	+	+	
»	»	»	»	2	+	+	
»	»	»	»	3	+	+	
»	»	»	»	4	+	+	
»	»	»	»	5	+	+	
»	»	»	»	6	+	+	
»	»	»	»	7	+	—	
»	»	»	»	8	+	+	
»	»	»	»	9	+	+	
»	»	»	»	13	+	—	
»	»	»	»	16	+	+	
Cobaya I	Baço	3	»	3	+	+	
»	»	3	»	3	+	+	

+ = Positivo.
— = Negativo.



MAPPA II



Animaes carbunculosos	Substancias empregadas	Dias decorridos		Diagnostico		SOROS DE ASCOLI					Observações	
		Da morte á autopsia	Depois da autopsia	Microscopico	Pelas culturas	Numeros e proveniencia						
						4 Cavallo	5 Mula	7 Cavallo	11 Burro	12 Burro		
Cobaya I.....	Baço	1	22 (a)	.	.	++						(a) 31 dias mais na geleira depois da filtração.
" "	"	"	22 (a')	.	.		+					(a') 153 dias mais na geleira depois da filtração.
" II	"	2	1	+	+			++				
" III	"	4	0	+	+	++						
" IV	"	6	0	+	-	+	++					
" V	"	8	0	-	-		++					
" VI	"	10	0	-	-						+	
" VII	Coração	2	4	.	+				**	++		** O titulo de concentração do extracto n'esta prova foi de 1 : 50.
" "	Figado	2	7	.	.	+						
Carneiro I.....	Baço	0	3	+	+	++					+	
" "	"	0	9	+	+			++				Titulo de concentração dos extractos : 1 : 5
" "	Baço em alcool a 70°	0	10	.	.				++			
" "	Baço	0	16	.	.					++	+	
" "	Baço em alcool a 70°	0	55	.	.					++		
" "	"	0	121	.	.		++					
" "	Coração	0	3	.	+	+						
" "	"	0	9	.	+			+				
" "	Figado	0	3	.	+	+						
" "	"	0	9	.	+			+				
" "	Rim	0	7	+	+	++						
Coelho I.....	Baço	1	1	+	+	++						
" "	"	1	6	-	-		++					
" "	Sangue (sôro)	1	1	+		+						
" "	Figado	1	6 (b)	.	.					++		(b) 30 dias mais na geleira depois da filtração.
" "	"	1	6 (b')	.	.		+					(b') 147 dias mais na geleira depois da filtração.
" II	Sangue (sôro)	0	1	+	+	++						
Cabra I.....	Baço	1	3	+	+	++						
" "	"	1	7	+	-						++	
" "	"	1	7 (c)	.	.						+	
" "	"	1	7 (c')	.	.					++		(c) 10 dias mais em alcool a 70°.
" "	"	1	7 (c'')	.	.		++					(c') 40 dias mais em alcool a 70°.
" "	"	1	60	.	.			*	+			(c'') 120 dias mais em alcool a 70°.
" "	"	1	122	.	.		++					
" "	Leite (sôro) e glandula mammaria	1	7	.	.						+	
" "	Leite (sôro)	1	10	.	-	-						
" "	Glandula mammaria	1	10	.	.	+						
" "	Glandula mammaria e edema gelatinoso	1	10	.	.	+		++				
Cabra (d) II.....	Baço	1	4	+	+		++		++			(d) Carbunculo natural.
" "	"	1	15	.	-	++					+	
" "	"	1	143	.	.			*	+		-	

++ = Positivo e rapido ; + = Positivo ; ± = Incerto ; - = Negativo ; * = Sôro n.º 8.

Date	Description	Debit	Credit	Balance	Total
1875	Jan 1				
	Jan 2				
	Jan 3				
	Jan 4				
	Jan 5				
	Jan 6				
	Jan 7				
	Jan 8				
	Jan 9				
	Jan 10				
	Jan 11				
	Jan 12				
	Jan 13				
	Jan 14				
	Jan 15				
	Jan 16				
	Jan 17				
	Jan 18				
	Jan 19				
	Jan 20				
	Jan 21				
	Jan 22				
	Jan 23				
	Jan 24				
	Jan 25				
	Jan 26				
	Jan 27				
	Jan 28				
	Jan 29				
	Jan 30				
	Jan 31				
	Feb 1				
	Feb 2				
	Feb 3				
	Feb 4				
	Feb 5				
	Feb 6				
	Feb 7				
	Feb 8				
	Feb 9				
	Feb 10				
	Feb 11				
	Feb 12				
	Feb 13				
	Feb 14				
	Feb 15				
	Feb 16				
	Feb 17				
	Feb 18				
	Feb 19				
	Feb 20				
	Feb 21				
	Feb 22				
	Feb 23				
	Feb 24				
	Feb 25				
	Feb 26				
	Feb 27				
	Feb 28				
	Feb 29				
	Feb 30				
	Feb 31				
	Mar 1				
	Mar 2				
	Mar 3				
	Mar 4				
	Mar 5				
	Mar 6				
	Mar 7				
	Mar 8				
	Mar 9				
	Mar 10				
	Mar 11				
	Mar 12				
	Mar 13				
	Mar 14				
	Mar 15				
	Mar 16				
	Mar 17				
	Mar 18				
	Mar 19				
	Mar 20				
	Mar 21				
	Mar 22				
	Mar 23				
	Mar 24				
	Mar 25				
	Mar 26				
	Mar 27				
	Mar 28				
	Mar 29				
	Mar 30				
	Mar 31				
	Apr 1				
	Apr 2				
	Apr 3				
	Apr 4				
	Apr 5				
	Apr 6				
	Apr 7				
	Apr 8				
	Apr 9				
	Apr 10				
	Apr 11				
	Apr 12				
	Apr 13				
	Apr 14				
	Apr 15				
	Apr 16				
	Apr 17				
	Apr 18				
	Apr 19				
	Apr 20				
	Apr 21				
	Apr 22				
	Apr 23				
	Apr 24				
	Apr 25				
	Apr 26				
	Apr 27				
	Apr 28				
	Apr 29				
	Apr 30				
	Apr 31				
	May 1				
	May 2				
	May 3				
	May 4				
	May 5				
	May 6				
	May 7				
	May 8				
	May 9				
	May 10				
	May 11				
	May 12				
	May 13				
	May 14				
	May 15				
	May 16				
	May 17				
	May 18				
	May 19				
	May 20				
	May 21				
	May 22				
	May 23				
	May 24				
	May 25				
	May 26				
	May 27				
	May 28				
	May 29				
	May 30				
	May 31				
	Jun 1				
	Jun 2				
	Jun 3				
	Jun 4				
	Jun 5				
	Jun 6				
	Jun 7				
	Jun 8				
	Jun 9				
	Jun 10				
	Jun 11				
	Jun 12				
	Jun 13				
	Jun 14				
	Jun 15				
	Jun 16				
	Jun 17				
	Jun 18				
	Jun 19				
	Jun 20				
	Jun 21				
	Jun 22				
	Jun 23				
	Jun 24				
	Jun 25				
	Jun 26				
	Jun 27				
	Jun 28				
	Jun 29				
	Jun 30				
	Jun 31				
	Jul 1				
	Jul 2				
	Jul 3				
	Jul 4				
	Jul 5				
	Jul 6				
	Jul 7				
	Jul 8				
	Jul 9				
	Jul 10				
	Jul 11				
	Jul 12				
	Jul 13				
	Jul 14				
	Jul 15				
	Jul 16				
	Jul 17				
	Jul 18				
	Jul 19				
	Jul 20				
	Jul 21				
	Jul 22				
	Jul 23				
	Jul 24				
	Jul 25				
	Jul 26				
	Jul 27				
	Jul 28				
	Jul 29				
	Jul 30				
	Jul 31				
	Aug 1				
	Aug 2				
	Aug 3				
	Aug 4				
	Aug 5				
	Aug 6				
	Aug 7				
	Aug 8				
	Aug 9				
	Aug 10				
	Aug 11				
	Aug 12				
	Aug 13				
	Aug 14				
	Aug 15				
	Aug 16				
	Aug 17				
	Aug 18				
	Aug 19				
	Aug 20				
	Aug 21				
	Aug 22				
	Aug 23				
	Aug 24				
	Aug 25				
	Aug 26				
	Aug 27				
	Aug 28				
	Aug 29				
	Aug 30				
	Aug 31				
	Sep 1				
	Sep 2				
	Sep 3				
	Sep 4				
	Sep 5				
	Sep 6				
	Sep 7				
	Sep 8				
	Sep 9				
	Sep 10				
	Sep 11				
	Sep 12				
	Sep 13				
	Sep 14				
	Sep 15				
	Sep 16				
	Sep 17				
	Sep 18				
	Sep 19				
	Sep 20				
	Sep 21				
	Sep 22				
	Sep 23				
	Sep 24				
	Sep 25				
	Sep 26				
	Sep 27				
	Sep 28				
	Sep 29				
	Sep 30				
	Sep 31				
	Oct 1				
	Oct 2				
	Oct 3				
	Oct 4				
	Oct 5				
	Oct 6				
	Oct 7				
	Oct 8				
	Oct 9				
	Oct 10				
	Oct 11				
	Oct 12				

MAPP A III

Animaes testemunhas	Substancias empregadas	Dias decorridos		Diagnostico		SOROS DE ASCOLI					OBSERVAÇÕES	
		Da morte á autopsia	Depois da autopsia	Microscopico	Pelas culturas ou experimental	Numeros e proveniencia						
						4 Cavallo	5 Mula	7 Cavallo	11 Burro	12 Burro		
Pcmbo I (mal rubro)..	Baço	1	3	+	+	-						
" " ..	Coração	1	3	.	.	-						
" "	Figado	1	3	.	.		-					
Porco I (mal rubro)	Baço	(putrefacto)		+	+				-	-		
" II (mal rubro)	Baço	(putrefacto)		+	+	-						
" III (pneumonia contagiosa) ..	Baço	0	3	+	+			-*				
" IV.....	Baço	0	0	.	.						-	Titulo de concentração dos extractos : 1:5
Carneiro I.....	Baço	0	0	.	.	-						
"	Baço	1	3	.	.		-					
Coelho I (Raiva)	Medulla	0	0	.	.	-						
" II (Raiva).....	Baço	0	0	.	.		-					(a) Trypanosoma gambiense
" III	Baço	0	1	.	.						-	
" "	Coração	0	1	.	.						-	
Rato branco I (doença do somno)*	Coração	0	0	+			-					
" " "	Figado	0	0	.	.			-				
" " "	Rim	0	0	.	.	-						
" II "	Baço	0	0	.	.		-*					
" III(pneumonia contagiosa)	Baço	0	1	+					-	-		
" " "	Figado	0	1	.	.	-						
" IV "	Baço	0	4	.	.				-			
Cão I (pericardite).....	Baço	1	2	.	.		-					
Cobaya I (carbunculo symptomatico)	Figado	0	0	+	+	-		-				
" " "	Figado	0	2	.	.		-*					
" " "	Baço	0	3	.	.				-			
" " "	Rim	0	3	.	.						-	
" " "	Coração	0	3	.	.	-						
" II "	Baço	0	0	.	.	-						
" " "	Coração	0	0	.	.			-				
" " "	Figado	0	0	.	.			-				
Burro I.....	{Baço	0	5	.	.							
"	Baço	0	5	.	.		-					
Vacca I (septecémia).....	Baço	0	3	.	.	-						
" II (tuberculose)...	Baço	0	0	tuberculina			-					
" " "	Glandula mammaria	0	0	.	.			-*				
" " "	Ganglio tuberculoso	0	0	.	.	-						
" " "	Leite (sôro)	0	23	.	.	-						
Boi I.....	Baço	0	0	.	.						-	
"	Figado	0	0	.	.		-					
" II (tuberculose).....	Ganglio tuberculoso	1	5	.	.	-						

