

## Nova vacina contra o carbunculo sintomatico.

PELO

**Dr. A. Godoy,**

Assistente.

(1 Figura no texto.)

## Un nouveau vaccin contre le charbon symptomatique.

PAR LE

**Dr. A. Godoy,**

Assistant.

(1 Figure dans le texte.)

Os estudos sobre o carbunculo sintomatico feitos nestes ultimos decenios não alteraram de modo algum os processos de vacinação contra esta zoonoze. O processo ARLOING-CORNEVIN (1887) continúa, quazi que unico, a ser praticado por não terem os estudos de laboratorio conseguido metodo algum capaz de substituil-o. Não faltaram, porem, tentativas como a de LECLAINCHE e VALLÉE (1902) de imunizar por meio de culturas aquecidas e soro-especifico e a de GRASSBERGER e SCHATTENFROH (1904) que, depois de longas e interessantes pesquisas, têm grandes accidentes com a imunização por meio das misturas de toxina-antitoxina.

Iniciámos o estudo deste assunto pelo interesse que merece, especialmente no ponto de vista economico, pois, o Estado de Minas e outros são em quazi totalidade contaminados pelo carbunculo sintomatico que nelles toma denominações diversas — peste da manqueira, quarto inchado, mal de ano, etc. O processo de vacinação com as vacinas pulverulentas havia-se mostrado aqui, como em toda parte, ou demaziado ativo e dava cazos mortais por ocasião da vacinação, ou demaziado escasso e então durante a epoca epidemica morriam alguns vitelos vacinados.

Apezar disso a perda percentual devida ás falhas acima referidas era menor

Les études sur le charbon symptomatique qui ont été faites ces dix dernières années n'ont pas changé les procédés de vaccination employés contre cette épizootie. C'est encore le procédé d'ARLOING et CORNEVIN (1887) celui qu'on emploie le plus, et les études de laboratoire n'avaient pas abouti jusqu'à présent à une meilleure méthode. En effet, il y a eu les essais de LECLAINCHE et VALLÉE (1902) d'immunisation au moyen d'inoculations de cultures chauffées et de sérûm spécifique, et ceux de GRASSBERGER et SCHATTENFROH (1904) avec les mélanges de toxine et antitoxine qui, employées comme méthode immunisante après de longues et intéressantes études ont été cause d'accidents.

Nous avons entrepris des études sur ce sujet, surtout à cause du grand intérêt économique qu'il a pour nous, au Brésil, où des États, comme Minas et autres, ont presque toutes les régions contaminées par le charbon symptomatique qui y est connu sous différentes dénominations: *peste da manqueira, quarto inchado, mal de ano*, etc. Chez nous, comme ailleurs, les vaccins représentés par les poudres desséchées ont été ou trop virulents, donnant quelques cas de mort après inoculation, ou pas assez actifs et n'immunisant pas, d'une manière sûre; on voyait alors mourir aux époques épizootiques quelques animaux vaccinés.

que a que se daria com quaisquer dos processos substitutivos até então experimentados.

A soro-vacinação, que não seria senão um recurso, é o metodo que, segundo LECLAINCHE e VALLÉE, se deve preferir.

No estudo deste assunto, duas questões nos preocupamos especialmente de conhecer — o resultado da inoculação de dozes conhecidas de suco de musculo dessecado e as propriedades das culturas obtidas com amostras que izolassemos de cazos de infeção natural que observassemos em Minas.

Os estudos feitos, referentes a estas questões, assim como a outras que a ellas se relacionam se acham expostos nos diferentes trabalhos já publicados dos DR. ROCHA LIMA (1906); DR. GOMES DE FARIA e o autor (1907); DR. GOMES DE FARIA (1908) e do autor (1909).

As diversas porções de suco de musculo seco que obtivemos, e que haviam sido preparadas como uzualmente se faz na preparação das vacinas pulverulentas, mostraram-se aos ensaios de cultura extraordinariamente impuras. Em regra, não se saberia reconhecer a presença do bacilo do carbunculo sintomatico nas culturas com ellas feitas, mesmo apoz o prévio aquecimento desses materiais. Os anaerobios obrigatórios ou facultativos, que aí se acham, subjugam de muito a este na vejetação.

A inoculação, porem, dá lezões que se assemelham ás do carbunculo sintomatico.

A dozajem do valor infeciozo dos pós virulentos por meio das culturas se nos afigurando, assim, impossivel, fizemos tentativas da sua dozajem em cobaias e em vitelos. Para demonstração dos resultados obtidos damos a seguir o rezumo, em forma de quadro, de uma serie de inoculações em cobaias do material pulverulento orijinario do vitelo 9 (Quadro 1). Para que a doze de inoculação fosse exatamente conhecida dozavamos o reziduo seco de 2. c. c. de emulsão concentrada e livre de grumos, do material, em agua distilada. Avaliavamos então a diluição que se havia de fazer para que

En tout cas, les pertes observées avec l'emploi de ces vaccins pulvérulents étaient toujours moindres que celles qu'on aurait eu en employant un des autres procédés présentés pour les remplacer.

La sérum-vaccination, qui ne serait qu'une ressource de moment, est, selon LECLAINCHE et VALLÉE la méthode de choix.

Dans nos études nous avons tâché de connaître les résultats d'inoculation de doses connues de suc musculaire desséché et virulent et les propriétés des cultures des échantillons de bacilles isolés des cas d'infection naturelle observés à Minas.

Les résultats de ces études ainsi que quelques autres, faits sur ce même sujet ont été déjà publiés par ROCHA LIMA (1906); GOMES DE FARIA et nous (1907) et par nous (1909).

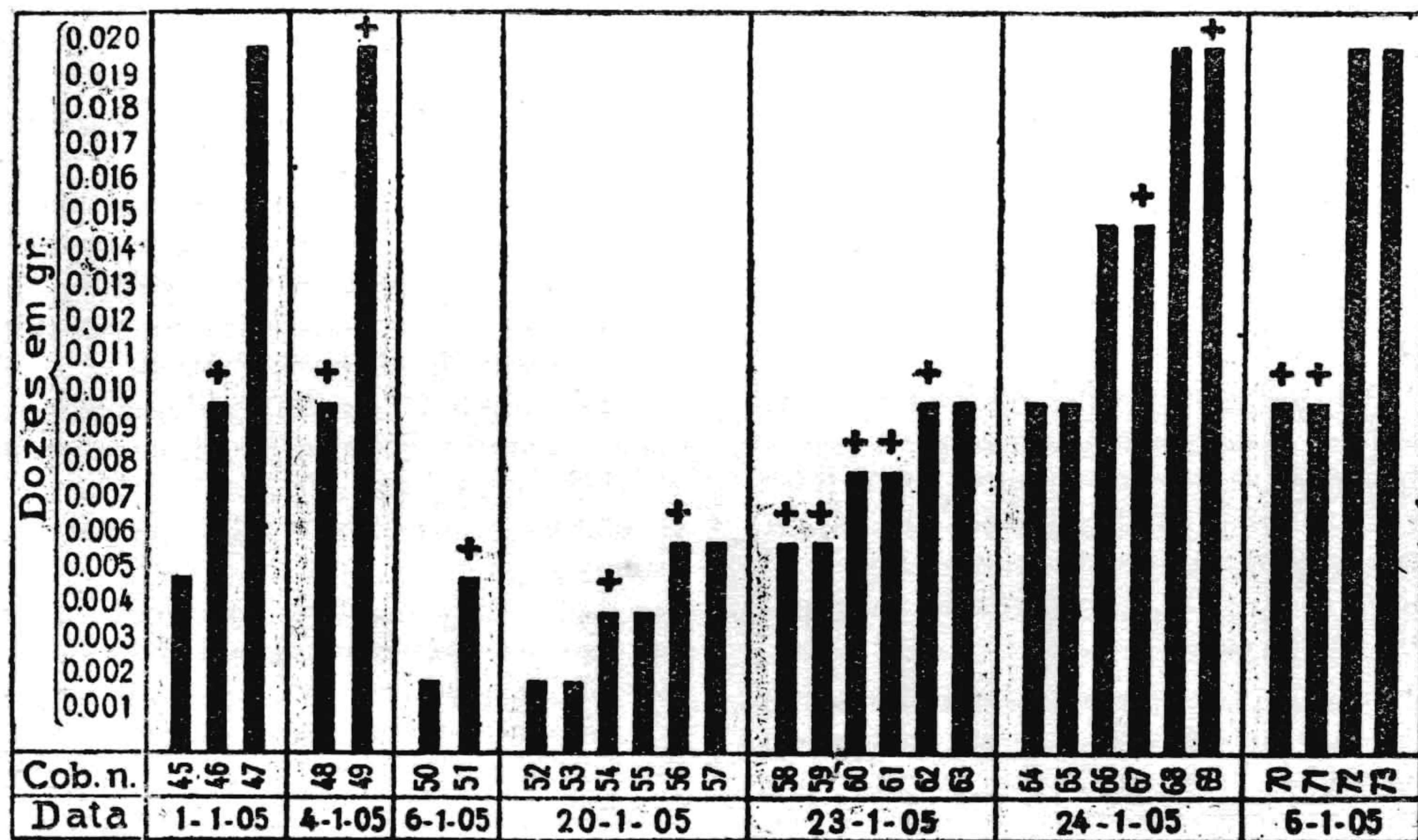
Les essais de culture que nous avons fait sur les différents échantillons de suc musculaire desséché, selon la technique employée à la confection des vaccins en poudre ont montré l'extraordinaire contamination de ce matériel. En règle générale dans ces cultures on ne peut pas caractériser le bacille du charbon symptomatique, même si on avait auparavant chauffé le matériel, les anaérobies facultatifs ou obligés empêchant la végétation du bacille du charbon bactérien. L'inoculation, cependant, du matériel produit des lésions analogues à celles du charbon symptomatique.

Ayant été ainsi démontré qu'il n'est pas possible d'avoir, au moyen du procédé des cultures une idée sur le pouvoir infectant des poudres virulentes, nous avons essayé le dosage du produit au moyen d'inoculations à des cobayes et à des veaux. Pour démontrer les résultats obtenus nous résumons au tableau 1 une série d'inoculations à des cobayes de la poudre virulente préparée avec les muscles du veau n. 9 (Tableau 1). Pour bien connaître avec exactitude la dose inoculée nous faisons une émulsion concentrée et sans grumeaux du matériel dans de l'eau distillée, et nous dosions le résidu sec de 2 cc. de cette émulsion. Avec les données ainsi obtenues nous agissions de manière à avoir dans un vo-



em 3 c. c. de injeção tivessemos a doze que dezeitavamos inocular. A emulsão concentrada era conservada na geleira até o momento de se fazer a diluição.

lume de 3cc. la dose que nous voulions inoculer. L'émulsion concentrée était conservée à la glacière jusqu'au moment de s'en servir pour faire les dilutions.



Quadro 1

Como se vê a morte de algumas cobaias já se dá com a inoculação de 4 miligramas, ao passo que outras resistem a 20 miligramas, sem havermos ainda atinjido a doze seguramente mortal.

Em bóvidas o mesmo se dá.

Da experiencia adiante rezumida no quadro 2 resulta que não se póde com segurança determinar a doze minima mortal de um material infeciozo, ou, cazo isto se possa fazer ella se achará muito afastada da que já começa a ser ativa. Assim, 18 centigramas de suco de musculo do vitelo 1 mostraram-se capazes de produzir a morte quando inoculados em trez vitelos e inocuos em outros tres. Nada sofreram, porem, dois vitelos que foram inoculados com 30 centigramas.

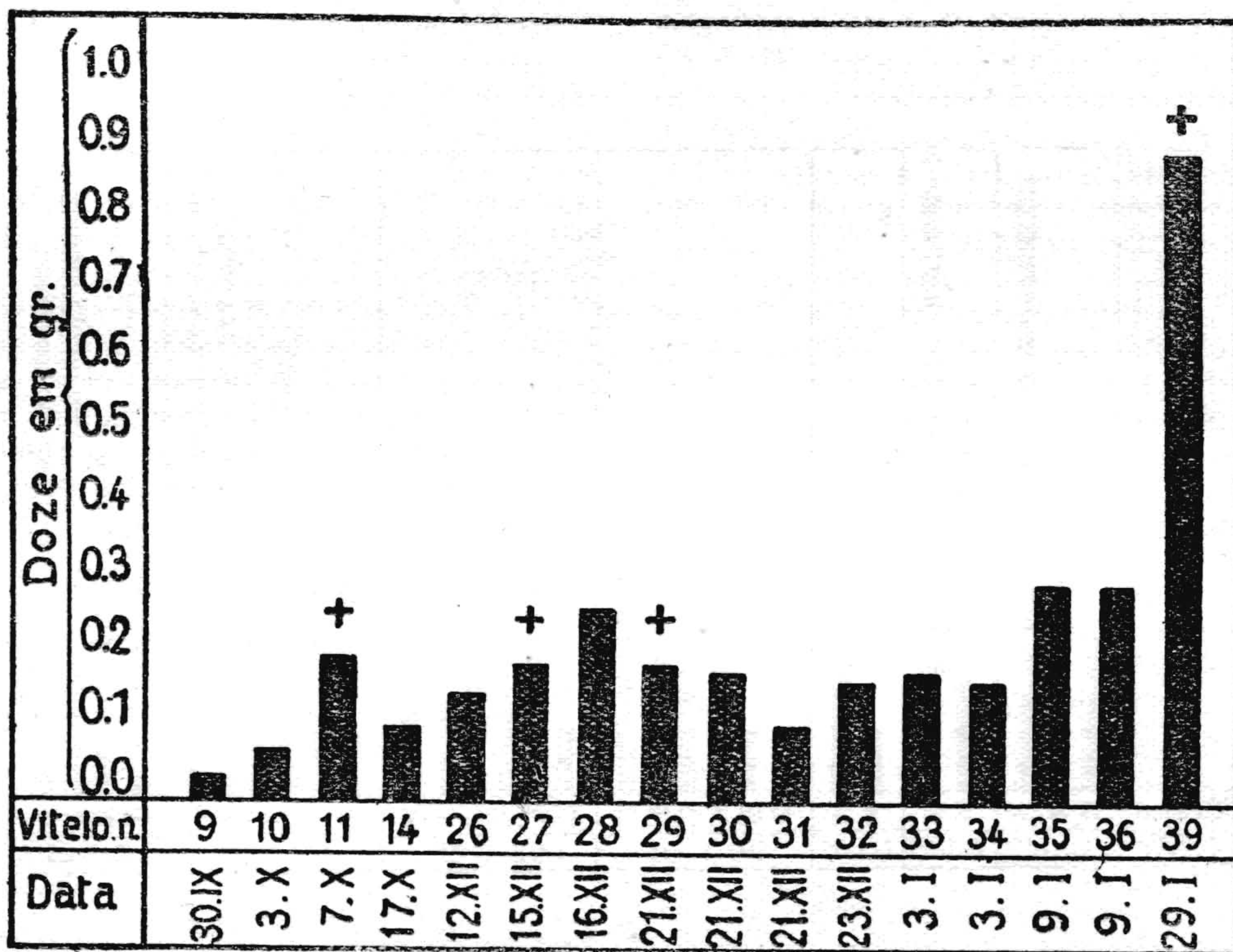
On voit d'après ce tableau qu'il y a des cobayes qui succombent déjà avec une dose de 4 milligr., à côté d'autres qui résistent jusqu'à 20 milligr. et, encore, nous n'avons pas atteint la dose sûrement mortelle.

Chez les bovidées on constate les mêmes faits :

D'après les renseignements fournis par le tableau 2 on voit qu'on ne peut pas établir d'une manière sûre la dose minima mortelle d'un matériel infectieux, ou, quand cela est possible, cette dose se trouve encore très loin de celle qui commence à être active.

Ainsi, 18 centigr. du suc musculaire du veau n. 1 se sont montrés capables de donner la mort à trois veaux et dans les mêmes conditions n'ont rien produit sur trois autres animaux. Deux autres veaux n'ont rien souffert de l'inoculation de 30 centigr. du même matériel.





Quadro 2

Outros materiais pulverulentos empregados não se mostraram mais ativos, assim :

Material. Vitelo N.	Doze em grs.	N. do vitelo inoculado.	Resultado.
6-7	0.1	8	não deu reação
1-40	1.0	44	it.
it.	it.	45	it.
40	0.3	42	it.
it.	1.0	43	morte em 36 h.
27-39	0.5	46	não deu reação
it.	1.0	47	it.
52	0.5	53	morte em 40 h.
53	0.5	43	it.

Não deve causar estranheza o fato de serem necessarias dózes tão grandes para causar a infeção, pois em regra os animais foram autopsiados logo apoz a morte, não havendo portanto a formação de esporos que pudessem rezistir ao dessecamento, si não em pequena quantidade.

D'autres produits virulents ne se sont pas montrés plus actifs ; ainsi :

Matériel. Veau N.	Dose en grs.	N. du veau inoculé.	Résultat.
6-7	0.1	8	pas de réaction
1-40	1.0	44	it.
it.	it.	45	it.
40	0.3	42	it.
it.	1.0	43	mort en 36 h.
27-39	0.5	46	pas de réaction
it.	1.0	47	it.
52	0.5	53	mort en 40 h.
53	0.5	43	it.

On ne doit pas s'étonner de la grandeur des doses qu'il faut inoculer pour donner l'infection, puisque les animaux fournisseurs du matériel ont été autopsiés aussitôt après la mort et il n'y avait pas, alors, de temps suffisant que pour la formation d'un très petit nombre de spores, qui étaient les seuls à rezister au desséchement.



O suco de musculo tal como se obtem antes de qualquer tratamento é muito mais ativo. De musculos recebidos de Minas obtivemos um suco que matava na doze de 1 c. c. o vitelo 2 ; o suco de musculo do vitelo 40 cauza forte reação no vitelo 42 já previamente vacinado. Porem ainda aqui se observam exceções.

As culturas puras em plena vejetação dão rezultados incertos ; porem, o mesmo não acontece com as culturas apoz o completo desenvolvimento em que os rezultados são regulares e proporcionais á quantidade de esporos que contêm, como se vê no quadro 3.

**Quadro 3**

CULTURAS	MEIO EMPREGADO	N. DE ESPÓROS POR CC.	REZULTADO DE INOCULAÇÃO À COBAIA
A	Caldo glicozado e soro $\frac{1}{3}$ .	120	Inoculação de 3 cc. Resistiu, sem reação local.
B	It.	24	It.
C	It.	30	It.
D	Caldo simples e soro $\frac{1}{3}$ .	863.000	Inoculação de 3 cc. Morte em 48 h. por carbunculo tipico.
E	It.	113.000	It.
F	It.	250 000	Inoculação de 2 cc. Morte em 48 h. por carbunculo tipico.

E' de esperar que o mesmo se obtenha em vitelos, como já o indicam as inoculações que adiante referiremos.

As experiencias referidas mostram que ha maiores diferenças entre os materiais inoculados que variação na resistencia dos animais injetados. Seriam, naturalmente, ainda maiores as diferenças de resultados das inoculações quando se pretendesse do-

Le suc musculaire en nature avant un traitement quelconque est bien plus actif.

Nous avons obtenu avec des muscles charbonneux envoyés de Minas un suc actif qui a tué à la dose de 1cc. le veau n. 2 : le suc musculaire du veau n. 40 a produit une très forte réaction sur le veau n. 42, qui était déjà vacciné. Il y a ici encore des exceptions.

Les cultures pures en pleine période végétative fournissent des résultats très incertains, mais quand le développement est complet les résultats sont très réguliers et proportionnels à la quantité de spores qu'elles contiennent comme on peut se rendre compte d'après le Tableau 3.

**Tableau 3**

CULTURES	MILIEU EMPLOYÉ.	N. DE SPORES PAR CC.	RÉSULTAT DE L'INOCULATION AU COBAYE.
A	Bouillon glycosé et sérum $\frac{1}{3}$	120	Inoculation de 3 cc. Survie, sans réaction locale.
B	It.	24	It.
C	It.	30	It.
D	Bouillon simples et sérum $\frac{1}{3}$	863.000	Inoculation de 3 cc. Mort en 48 h. par charbon typique.
E	It.	113.000	It.
F	It.	250.000	Inoculation de 2 cc. Mort en 48 h. par charbon typique.

On peut s'attendre à ce que le même résultat puisse être obtenu sur les veaux, comme d'ailleurs, laissent voir les résultats des inoculations que nous montrerons ci après.

Nos expériences montrent qu'il y a une plus grande différence parmi les matériaux virulents qu'il y a de variations de résistance chez les animaux inoculés.

Les différences des résultats d'inoculation seraient encore plus grandes quand on

zar materiais em que os esporos estivessem englobados por substancias tornadas insolúveis pelo calor, como na pratica da fabricaço das vacinas pulverulentas. No cazo habitual dessa fabricaço considera-se, em regra, como tendo os diferentes sucos de musculo o mesmo valor.

Si estas consideraçoes vizassem de qualquer modo concluir pela dificuldade de se obter um produto vacinante, com razào se nos apontaria para as estatísticas que demonstram a eficacia deste modo de vacinaço, mas, o que queremos é demonstrar que é extraordinariamente facil de se conseguir a imunidade no carbunculo sintomatico. E', de resto, prova disto o sucesso das inoculaçoes de produtos os mais variados, de estados fizicos tão diferentes e por vias as mais diversas. Não faltam processos, porem elles são inconstantes e alguns de difficil pratica. Uma molestia de tão facil imunizaço não deve continuar a ser prevenida com vacinas só toleraveis no inicio da epoca bacteriologica.

No estudo da imunizaço contra o carbunculo sintomatico perdeu-se completamente de vista a inoculaço de germens mortos que se faz por ocaziào da inoculaço das diferentes vacinas onde elles são de milhares contra as centenas de esporos que ellas contem. Já KITASATO (1889) havia observado que culturas antigas e completamente inativas imunizam. Ora, nessas, dado o meio em que eram feitas, se póde concluir que estavam quazi todos os germens, que continham, mortos.

Esta ideia que é apenas sugerida como explicação para a atividade de processos tão heterojenios é amplamente demonstrada pelas inoculaçoes das culturas vacinantes onde não se póde pensar numa imunidade obtida a custa de uma infeço benigna inicial, visto a pequenissima quantidade de esporos inoculados, dezenas, assim como por não poderem essas inoculaçoes serem tornadas mais ativas pela adiço de acido latico e outras substancias quimiotaticas

aurait à doser des matériaux dans lesquels les spores seraient englobés par des produits devenus insolubles par la chaleur, comme c'est le cas dans la pratique de la fabrication des vaccins pulvérulents. D'habitude on considère, dans la confection de ces vaccins, tous les sucus musculaires comme ayant la même valeur.

Si par ces considérations nous voudrions démontrer la difficulté qu'on a d'avoir un vaccin, on n'aurait pas de difficulté à prouver le contraire au moyen des statistiques favorables qui démontrent l'efficacité du vaccin préparé par ce procédé. Mais, ce que nous voulons démontrer c'est qu'il est très aisé de donner l'immunité contre le charbon symptomatique. Du reste, on trouve la confirmation de cette assertion dans le succès des immunisations faites avec les produits les plus différents, d'état physique divers et administrés par des voies si variées.

Il y a beaucoup de procédés, mais ils sont d'action inconstante, les uns de difficile application et préparés selon une technique très primitive. Une maladie contre laquelle on peut immuniser avec une si grande facilité ne doit pas être combattue au moyen de vaccins dont l'existence ne pourrait être tolérée qu'au commencement de l'époque bactériologique.

Dans les études sur les vaccins employés contre le charbon symptomatique on a fait, jusqu'à présent, abstraction des corps microbiens morts, qui se comptent par milliers à côté des centaines de spores qu'on inocule. KITASATO (1889) avait déjà observé que les vieilles cultures tout à fait dépourvues de virulence peuvent immuniser. Dans ces cultures, vû le milieu où elles étaient faites, on peut considérer comme morts tous les germes qu'elles contenaient.

Cette idée qui nous est venue seulement pour expliquer l'activité de vaccins préparés selon de procédés si hétérogènes est tout à fait démontrée par l'inoculation de cultures vacinantes qui confèrent l'immunité sans qu'on puisse attribuer celle-ci à une atteinte légère par la maladie ou à la petite quantité de spores inoculés — quel-



negativas. Estas culturas quando inoculadas, mesmo em pequenas dozes ( $1/2$  c. c.), imunizam.

Daremos aqui apenas algumas indicações sobre a morfologia e biologia em que estamos de acordo com KITT (1902) e HIBLER (1899).

O aspeto das culturas em gelatina que observamos é de pequenas colonias de limites bem nitidos, brancas e que com o desenvolvimento vão fluidificando o meio. Em agar-soro, — a adição de soro é o unico meio de se obter culturas em agar com a nossa amostra, — a forma varia com a concentração do meio, de modo que com uma concentração correspondente a 1 % de agar se obtém um aspeto que consideramos característico — as colonias são grandes, nebulosas, perfeitamente esfericas, de contornos bem definidos e sem a menor apparencia de filamentos. O centro da colonia é marcado por um ponto mais escuro. As culturas em meios liquidos nada mostram de diferente do já conhecido. A variedade de aspeto dos elementos que apparecem nas culturas corresponde ao já descritos por HIBLER e SCHATTENFROH.

A amostra que izolámos possui no mais alto gráo a propriedade de formar granulose em meios glicozados. Quando a cultura está em plena vejetação aí são abundantes as formas em fuzo, esfericas e todas as variantes possiveis entre essas duas extremas. Diferimos, porem, completamente de HIBLER em não considerar a ausencia de esporos nos meios glicozados como devido a acidez do meio, isto, porque, nem a neutralização dos acidos formados, pela adição de carbonato de calcio ao meio de cultura, como pelo fato de uma maior alcalinidade do meio não evitar a ação impedidora que a glicose e outros assucres exercem sobre a formação de esporos. A formação de esporos foi em identicas condições sempre menor com a nossa amostra que com duas outras com que trabalhámos, uma de KITT, de Munich e outra que izolámos de uma pó virulento de orijem suissa

ques dizaines — ainsi que par le fait qu'on ne peut pas rendre plus actives ces inoculations au moyen de l'acide lactique, ou d'autres substances chimiotactiques négatives. Ces cultures immunisent même inoculées en petites doses ( $1/2$  cc.)

Nous passons à donner quelques indications sur la morphologie et biologie du bac. du charbon symptomatique en ce que nous sommes, en général, d'accord avec KITT (1902) et HIBLER (1899).

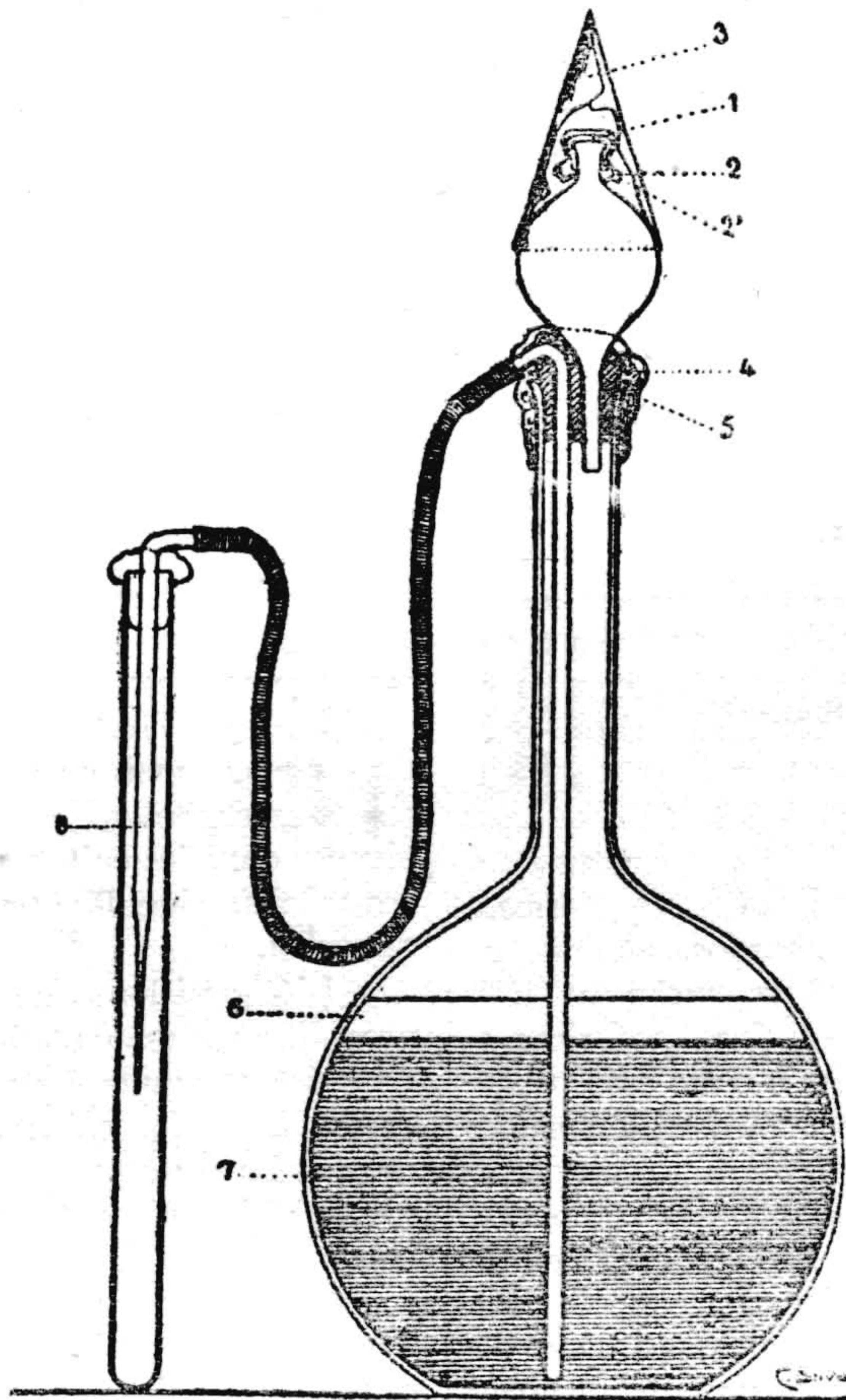
Les cultures en gélatine se font sous l'aspect de petites colonies, à contours nets, blanches et qui, au bout de quelque temps fluidifient le milieu. En agar-sérum — l'addition du sérum est le seul moyen de faire végéter notre échantillon sur agar — la forme de la colonie varie selon la concentration de la gelée ; avec une consistance qui correspond a 1 % d'agar nous avons des colonies qui ont un aspect que nous considérons caractéristique. Elles sont grandes, nébuleuses, parfaitement sphériques, à contours bien nets, sans filaments. La partie centrale de la colonie est marquée par un noyau plus foncé. Les cultures en milieux liquides ne diffèrent en rien de ce qui est déjà connu pour ce microbe. Les différences morphologiques des unités microbiennes dans les cultures sont bien celles qui ont été déjà signalées par HIBLER et SCHATTENFROH.

L'échantillon que nous avons isolé possède au plus haut degré la propriété de produire granulose dans les milieux glycosés. Dans les cultures bien développées on voit les formes en fuseau à côté des formes sphériques avec toutes les intermédiaires entre ces deux formes extrêmes. Nous ne sommes, cependant, point d'accord avec HIBLER en ce qui concerne la manière de considérer l'absence de spores dans les milieux glycosés comme étant due à l'acidité du milieu et cela parcequ'il n'est pas possible d'arrêter cette action empêchante de la glycosé et d'autres sucres sur la formation des spores, si on neutralise par le carbonate de soude les acides formés ou si on emploie un milieu plus alcalin. Toutes choses égales d'ailleurs, la production de



que devemos á amabilidade do DR. CARINI. O que dissemos a respeito dos esporos podemos dizer quanto a virulencia das culturas, assim em um dos ensaios a cultura KITT matava cobaias na doze de  $\frac{1}{1000}$  cc., ao passo que a nossa não matava sinão a  $\frac{1}{2}$  de c. c. As culturas da nossa em meio glicozado foram sempre avirulentas, não se dando o mesmo com as outras.

spores a été moindre avec notre échantillon qu'avec celles de KITT de Munich, et d'une autre de provenance suisse que nous avons réussi à isoler d'une poudre virulente qui nous a été aimablement fournie par M. le DR. CARINI. Ce que nous avons dit sur la production des spores peut être appliqué à la virulence des cultures. Ainsi l'échantillon KITT tuait le cobaye à la dose



**Balão para preparo e distribuição de vacina.**

1. Camada de algodão.
- 2, 2 a. Duplo revestimento de papel.
3. Cartucho de papel.
4. Camada de algodão que protege a rolha.
5. Rolha de borracha.
6. Camada de vaselina liquida.
7. Trocarte para entrada de sôro e distribuição da cultura.

**Balíon disposé pour la préparation et distribution du vaccin.**

1. Couche d'ouate.
- 2, 2 a. Double couche de papier.
3. Cornet en papier.
4. Couche d'ouate protégeant le bouchon.
5. Bouchon en caoutchouc.
6. Vaséline liquide.
7. Trocart. (Entrée du sérum et distribution de la culture).



As culturas destinadas a vacinação são preparadas em balões de 2 litros em que se coloca 1 litro de caldo de carne com 2 % de glicose, adiciona-se parafina liquida até que se forme uma camada de cerca de 2 cm. de altura sobre o meio de cultura. Quando resfriado, ajunta-se 1/3 ou 1/2 litro de soro de cavalo. Um dispositivo muito pratico e seguro para essa adição de soro, assim como para a sementeira dos balões é o representado pela figura acima, cuja descrição minucioza e funcionamento se encontram no trabalho de GOMES FARIA (1908); a figura, entretanto, é assaz clara e permite a sua compreensão.

E' fóra de duvida que as culturas em meio glicozado-soro imunizam. Damos a seguir as primeiras inoculações que fizemos e que serviram de base á pratica da vacinação em grande :

Quadro 4

N. do vitelo	Quantidade de cultura vacinante inoculada em c. c.	Prova	Numero de dias decorridos entre a vac. e a prova
3	2.0	5.0 c. c. de cultura em caldo sangue.....	15 dias
5	5.0	2 c. c. de cultura em caldo sangue.....	30 dias
15	0.5	2 c. c. suco de musculo em natureza do vitelo 40....	7 mezes
16	0.5	1 gr. material seco vit. 1-40	90 dias
17	0.5	1 gr. material seco vitelo 1..	70 dias
18	2.0	1 gr. material seco vitelo 1..	72 dias
19	2.0	2 c. c. suco de musculo em natureza do vitelo 40....	3 mezes
20	2.0	1 gr. material seco vit. 1-40	3 1/2 m.
22	3.0	2 c. c. suco de musculo em natureza do vitelo 40....	3 mezes
23	5.0	1 gr. material seco vitelo 1..	2 mezes
24	15.0	1 gr. material seco vitelo 1..	2 mezes
55	10.0	2 c. c. de cultura em caldo sangue mais acido latico	50 dias
56	10.0	2 c. c. de cultura em caldo sangue mais acido latico	49 dias

Temos a fazer notar que a não ser o vitelo 22 nenhum outro teve a menor reação, sendo que o material com que foi ino-

de 1/1000 cc., et la nôtre ne le faisait qu'à la dose de 1/2 cc. Nos cultures sur milieux glycosés ont été toujours avirulentes ce qui n'arrivait pas avec les autres échantillons.

Nous préparons notre vaccin en semant 1 litre de bouillon de viande glycosé à 2 %, placé dans un ballon de 2 litres. On verse sur le milieu de culture une couche de 2cm. de parafine liquide et après stérilisation et refroidissement on ajoute 1/3 ou 1/2 de sérum stérile de cheval. Pour faciliter l'addition du sérum et pour faire les ensemencements nous employons le dispositif figuré par le dessin ci-dessus, dont la description et le fonctionnement se trouvent dans le travail de GOMES DE FARIA (1908).

C'est incontestable que les cultures du bac. du charbon symptomatique en bouillon-sérum glycosé immunisent. Le tableau qui suit donne une idée de quelques résultats obtenus au laboratoire et qui ont servi de base pour les vaccinations en grand.

Tableau 4.

Veaux N.º	Quantité de culture inoculée en cc.	Inoculation d'épreuve	Nombre de jours entre la vaccination et l'inoculation d'épreuve
3	2.0	5cc. de culture en bouillon-sang.....	15
5	5.0	2cc. it.....	30
15	0.5	2cc. de suc de muscle du veau nº 40.....	210
16	0.5	1 gr. matériel sec des veaux—1-40.....	90
17	0.5	1 gr. m. sec veau 1.....	70
18	2.0	id.....	72
19	2.0	2 cc. suc muscle v. 40..	90
20	2.0	1 gr. mat. sec v. 1-40..	105
22	3.0	2 cc. suc musculaire veau 40.....	90
23	5.0	1 gr. mat. sec v. 1....	60
24	15.0	id.....	60
55	10.0	2 cc. culture bouillon-sang additionés d'acide lactique.....	50
56	10.0	id.....	49

Il n'y a que le veau n. 22 qui ait eu une réaction, les autres n'ont rien eu. Le matériel qui a été inoculé au veau n. 3 a



culato o 3 matou, inoculado na mesma ocasião e doze, o vitelo 2 ; a cultura inoculada no 5 também matou em idênticas condições o 6 e 7 ; as culturas que inoculámos no 55 e 56 eram muito ricas em esporos. Alguns vitelos (17, 18, 23 e 24) foram inoculados com o material 1, do qual já tratámos no quadro n. 2.

Fizemos por essa ocasião a vacinação na fazenda do DR. VILLAÇA, em Juiz de Fora e todos os vitelos assim tratados resistiram, não só á infecção natural, como á inoculação de prova. Mais tarde tivemos, em 24 vitelos vacinados, 8 mortes. Esse acidente veio esclarecer definitivamente o problema da vacinação e mostrar que vacinas que são inocuas para cobaias não garantem a ausência de casos por ocasião da vacinação. Estas culturas que se mostraram ricas em esporos não eram, porém, quando inoculadas em cobaias, mortais para ellas, ou, em outras palavras, a doze minima mortal para os vitelos póde estar abaixo da doze minima mortal para a cobaia.

Como consequencia passámos a dozar as nossas culturas vacinantes pela contagem do numero de esporos em  $1/2$  c. c., isto é,  $1/4$  da doze que inoculamos como vacina. Para esta dozagem ajuntámos 0.5 de centimetro cubico da vacina a 6—8 de soro de cavallo, esta mistura é feita em um tubo de ensaio, no qual se adiciona finalmente a quantidade de agar glicozado para que o tubo fique quazi cheio, ajita-se bem, e, quando gelificado, coloca-se na estufa a  $37^{\circ}$ . No 2.º dia as colonias podem ser contadas e não devem exceder de 200, porém é, somente, na maioria das vezes, de apenas algumas dezenas.

A pratica de milhares de inoculações mostrou que uma só inoculação é sufficiente para conferir a imunidade durante todo o tempo em que são os animais habitualmente atacados. A conservação das propriedades destas culturas tem se mostrado muito longa. Nos frascos fechados á lampada, como é fornecida, é de muitos mezes.

Na falta de estatistica regular apre-

tué dans les mêmes conditions le témoin n. 2.

La culture inoculée au veau n. 5 a tué les témoins ns. 6 et 7 ; les cultures inoculées aux animaux n. 55 et 56 étaient très riches en spores.

Quelques veaux (ns. 17, 18, 23 et 24) ont été inoculés avec le matériel 1 dont nous avons parlé au tableau n. 2.

Nous avons essayé le vaccin en grand, à la ferme de Mr. le DR. VILLAÇA, à Juiz de Fóra où tous les animaux immunisés ont résisté à l'infection naturelle et à une inoculation d'épreuve.

Plus tard dans un autre essai nous avons eu 8 morts parmi 24 veaux vaccinés.

Cet accident est venu résoudre d'une façon définitive le problème du vaccin et nous a montré que le vaccin non virulent pour le cobaye peut donner des cas parmi les veaux et ainsi nous avons vérifié que la dose minima mortelle pour les veaux est au dessous de la dose minima mortelle pour les cobayes.

Nous avons alors dosé notre vaccin en faisant la numération des spores dans  $1/2$  cc. de vaccin, c'est à dire dans le quart de la dose vaccinante. Pour faire cela nous ajoutons à 0,5 cc. de vaccin 6 à 8 cc. de sérum stérile de cheval. Ce mélange est fait dans un tube d'essai dans lequel on verse après, la quantité d'agar-glycosé suffisante pour le remplir à peu près. On agite le tout et on laisse prendre le milieu qui est, alors placé à l'étuve à  $37^{\circ}$  C. Au deuxième jour on fait la numération des colonies, qui ne doivent pas surpasser le número 200. À la majorité des cas il n'y en a même que quelques dizaines.

La pratique de nombreuses, vaccinations a démontré qu'une seule inoculation est suffisante pour immuniser les animaux pendant le temps qu'ils ont plus de receptivité. Le vaccin se conserve assez longtemps ; pendant beaucoup de mois il se conserve actif dans les flacons fermés à la lampe, où il est fourni. En défaut d'une statistique nous présentons ci-dessous les nombres



sentamos o numero de dozes progressivamente crecente fornecidas pelo Instituto:

Em 1906 .....	11.780
» 1907 .....	47.700
» 1908 .....	71.895
» 1909 .....	188.970
Total .....	320.345

Não se trata, pois, de um processo em ensaio, mas de um que merece ser propagado e vir a substituir os processos empiricos até hoje em uzo.

toujours croissants des doses de vaccin fournis par notre Institut:

1906 .....	11.780
1907 .....	47.700
1908 .....	71.895
1909 .....	188.970
Total .....	320.345

On voit par ce que nous venons d'exposer qu'il ne s'agit point d'un procédé d'essai, mais d'une méthode qui doit remplacer les procédés empiriques en usage jusqu'à présent.

## BIBLIOGRAFIA.

- ARLOING, CORNEVIN et THOMAS . . . . 1887 Le charbon symptomatique du boeuf.
- GODOY (DR. A.) . . . 1909 Sobre a peste da manqueira. — A Lavoura, Ano XIII. N. 10, pag. 293.
- GODOY (DR. A.) e GOMES DE FARIA (DR.) . . — Sobre um novo processo de vacinação contra o carbunculo symptomatico. Memoria apresentada ao Sexto Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia — *in* Revista Medica de S. Paulo, Ano XI, N. 16, pag. 338.
- GOMES DE FARIA (DR.) . 1908 Contribuição ao estudo do carbunculo symptomatico. — Dissertação inaugural.
- GRASSBERGER (R.) u. SCHATTFROH (A.) 1904 Ueber Buttersäuregärung. (III Abhandlung.) etc. — Archiv für Hygiene, Bd. 48, S. 1.
- HIBLER (E. v.) . . . 1899 Beiträge zur Kenntnis der durch anaërobe Spaltpilze etc. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. XXV Bd. S. 513.
- KTISATO (S.) . . . . 1889 Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Culturverfahren. Zeitschr. f. Hyg. 6 Bd. S. 105.
- KITT (PROF. DR. H.) . 1902 Neues über Rauschbrand. Monatshefte f. prakt. Thierheilk. Bd. 13. S. 174.
- LECLAINCHE (E.) et VALLÉE (H.) . . . 1902 Les accidents consécutifs aux vaccinations. Annales de l'Institut Pasteur. T. 6<sup>e</sup>, pag. 614.
- ROCHA LIMA (DR. H. DA) 1906 Peste de manqueira ou carbunculo symptomatico. Conferencia realisada perante a Sociedade de Medicina e Cirurgia de Juiz de Fóra e publicada no *Pharol* de 5 de Junho de 1906 *in* *Brazil-Medico*. Ano XX, pag. 246.

