

DO PREPARO DA LYMPHA VACCINICA

POR

J. LEMOS MONTEIRO E RAUL GODINHO

CAPITULO I

Do preparo da lympha vaccinica

E' facto incontestavel que o meio seguro de se evitar a variola consiste na vaccinação, instituida por E. JENNER, como consequencia das suas observações sobre o poder immunizante do *Cow-pox* em relação ao *Small-pox*.

O methodo primitivo desse eminente cientista e bemfeitor da humanidade vem-se aperfeiçoando constantemente com o decorrer dos annos. Hoje é de pratica corrente o emprego da vaccina animal, *cow-pox*, obtida por passagens successivas do virus vaccinico de vitello a vitello, e preparada, para fins prophylacticos, por institutos especializados.

Na qualidade de toda lympha vaccinica deve predominar sempre a mais rigorosa pureza, ao par de uma actividade constante. Producto biologico de indiscutivel importancia social, a vaccina é preparada e empregada sob controle do Estado na maioria dos paizes adiantados, quasi todos obedientes a preceitos codificados por uma sub-commissão especial mantida junto á Commissão de Hygiene da Liga das Nações. Por isto mesmo, ella deve estar sempre presente ás cogitações dos nossos sanitaristas e homens de laboratorio, por merecedora de criterioso estudo que venha estabelecer de vez normas orientadoras para a sua standardização em nosso meio.

O presente trabalho constitue apenas um pequeno ensaio para o estabelecimento das normas do preparo industrial da lympha vaccinica entre nós, pois estas de certo virão, a seu tempo e com a collaboraçã de todos os especialistas, uniformizar o processo da producção da vaccina contra a variola nos differentes estabelecimentos officiaes do paiz. Nesta nossa contribuiçã mostraremos apenas, sem detalhes desnecessarios, a pratica corrente usada no Instituto Butantan para a producção da polpa vaccinica, assim como as technicas de purificaçã da lympha que vimos empregando desde 1927, quando um de nós foi encarregado da reorganizaçã e da chefia do serviço.

Instalações.

O serviço de vaccina animal do Instituto é uma dependencia da sua Secção de Virus e acha-se installada em pavilhões especiaes e adaptados ao seu fim.

Em um pavilhão central acha-se installado o grande laboratorio industrial para o tratamento da polpa, com os differentes aparelhos necessarios para o seu preparo, conservação e acondicionamento. Anexo, encontra-se um laboratorio bacteriologico para as pesquisas e controle das differentes partidas preparadas quanto á sua pureza e actividade do virus.

Em pavilhão ao fundo estão installadas outras dependencias relacionadas com os animaes necessarios: sala com baias para os vitellos em observação; sala com baias para os vitellos vaccinados; sala com balança para pesagem dos animaes; sala para "toilette" dos vitellos (raspagem e preparo); sala para a vaccinação e colheita da polpa, tendo 2 mesas apropriadas á contensão dos animaes e outras installações necessarias (agua esterilizada, etc.); sala com aparelhos de esterilização do material (autoclave, forno Pasteur e aparelho para esterilização da agua); sala-bioterio, para os pequenos animaes vaccinados (coelhos) e os utilizados para as verificações das polpas, e, finalmente, salas para o deposito do material e forragem. Este pavilhão tem um largo corredor central, communicando com as varias dependencias assignaladas.

Esta installação é provisoria, pois os pavilhões foram adaptados ao seu fim actual, estando já organizado um projecto para a installação dos serviços conjunctamente com a Secção de Virus, onde o laboratorio de vaccina animal ficará materialmente melhor aparelhado.

Escolha dos animaes.

Hoje é de pratica corrente o emprego da vaccina animal, *cow-pox*, obtida por passagens successivas do virus vaccinico de vitello a vitello.

Os vitellos destinados á vaccinação são recebidos em lotes de 6 a 12 animaes, escolhendo-se animaes com um peso de 80 a 150 kilos e de apparencia sadia. Uma vez chegados ao Instituto, ficam sob as vistas da secção de medicina veterinaria, onde são submettidos a differentes provas para a confirmação do seu estado hygido, permanecendo em observação durante um certo numero de dias. Entre as provas a que são submettidos, figuram a inoculação da tuberculina, para elucidação da tuberculose, e exames acurados e repetidos quanto á possibilidade da febre aphtosa. Só depois de se obter resultado negativo em todos estes exames é que os vitellos são recolhidos á Secção para serem utilizados.

Primeiros cuidados hygienicos.

Recolhidos á sala destinada aos vitellos em observação, antes de vaccinados, são elles submettidos a um previo e cuidadoso tratamento durante 2 a 3 dias. Em primeiro logar, todo o pello do corpo é cortado com uma machina electrica especial; depois, os vitellos são submettidos a lavagens diarias de todo o corpo, com agua, sabão e escova, sendo-lhes então registados os pesos e as temperaturas.

Os vitellos que tenham, principalmente na região a ser vaccinada, muitos carrapatos, o que se observa commummente nos nossos rebanhos, são submettidos, ainda quando sob as vistas da secção de veterinaria, a banhos carrapaticidas, sendo então necessario augmentar o seu tempo de observação e de lavagens diarias, afim de que desapareçam os traços do antiseptico utilizado e a reacção cutanea por elle determinada.

Raspagem do vitello.

Na tarde da vespera da vacinação, os vitellos a serem vaccinados, geralmente em numero de 2 ou 3, são levados a uma sala especial onde lhes é raspada toda a região thoraco-abdominal, que depois é convenientemente lavada.

Vaccinação dos vitellos.

Levados para a sala destinada á vacinação e colheita, os vitellos raspados na vespera são collocados em mesas apropriadas, lavando-se convenientemente a região com agua esterilizada e sabão especial e neutro. Esta lavagem é feita com escova e repetida varias vezes, sendo todo o sabão finalmente removido com agua esterilizada. Depois de enxuto todo o campo com toalhas estereis, procede-se á escarificação da região a ser vaccinada. Usa-se um estilete especial ou um vaccinostylo commum, fazendo-se escarificações lineares, no sentido longitudinal, de cerca de 10 a 15 cm. de comprimento e separadas umas das outras por cerca de 0,5 a 1 cm.

Escarificada toda a região, com toalhas esterilizadas enxuga-se todo o sangue que por ventura tenha surgido das escarificações.

Feito isto, o operador passa, com a mão protegida por luva de borracha, a polpa-semente sobre toda a região. Cerca de 20 a 30 cc. de polpa, conforme o porte do animal, são sufficientes para cada vitello.

Esta technica de vacinação que adoptámos depois de termos já ensaiado as demais usadas, parece-nos a mais pratica, por sua rapidez e resultados.

Escolha da semente.

Para a vacinação dos vitellos, a polpa-semente deve possuir certas qualidades principalmente relativas á actividade do virus.

Utilizamos a bovo-vaccina, oriunda de partidas cuja evolução no vitello se mostrou perfeita e normal e que foram separadas e tratadas para esse fim especial. Estas polpas são geralmente addicionadas de 3 partes de seu peso de glicerina e empregadas depois de, pelo menos, 6 mezes de permanencia no frigo a -8°C . As bovo-vaccinãs são usadas desde que tenham soffrido menos de 4 passagens de vitello a vitello.

Além desta, usamos a lapino-vaccina como semente. Para este fim e tambem para a exaltação da actividade do virus e sua purificação indirecta, depois de 3 a 4 passagens em vitello, fazemos uma no coelho.

Os coelhos são vacinados pelo mesmo processo, fazendo-se, no dorso depilado, as escarificações transversaes. Só são utilizadas como semente as polpas dos animaes em que a evolução vaccinica se apresenta de um modo normal.

Periodo de evolução da vaccina no vitello.

Depois de vacinados e de retidos na mesa durante uns 15 minutos, os vitellos, protegido o campo vaccinado com pannos esterilizados especiaes, são transportados para as baias da sala a elles destinada.

A temperatura é tomada 2 vezes ao dia, pela manhã e á tarde, sendo mantida uma permanente vigilancia dos animaes, ao par da limpeza e hygiene das baias, cujo ambiente se conserva em meia luz e isento de moscas.

Como alimentação, dá-se, além do farello, capim cortado á machina, evitando-se, assim, sujar o leito da baia.

No 2.º e 4.º dias após a vaccinação, os vitellos são collocados na mesa para exame da evolução das pustulas. Nesses dias, lava-se com agua esterilizada a região vaccinada, e, depois de enxuta, sobre ella passa-se glycerina, com um pincel especial.

Os campos protectores são trocados diariamente e mesmo 2 vezes ao dia, se sujos ou molhados. Importante seria se se pudesse manter de pé, durante os 5 dias de evolução da vaccina, os vitellos. Imaginámos para isto um dispositivo especial que não deu os resultados esperados, em virtude de serem muito baixas as baias já existentes, tendo resolvido reserval-o para ensaio nas nossas futuras installações.

Colheita da polpa.

E' feita geralmente no 5.º dia após a vaccinação. O vitello é collocado na mesa e a região lavada varias vezes com agua esterilizada, sabão e escova. Se a reacção inflammatoria local é muito intensa, após a ultima lavagem applica-se sobre toda a região um soluto de verde brilhante a 1/50.000. Este ahi permanece durante uns 15 minutos e depois é retirado com novas lavagens de agua esterilizada. Se a evolução vaccinica é normal, não se observando edema ou reacção local intensa, dispensamos o uso do verde brilhante.

Uma vez lavado o vitello e enxuto com toalhas esterilizadas, protege-se o campo vaccinado com pannos especiaes esterilizados. Em seguida, o operador, munido de luvas esterilizadas, procede á colheita da polpa, que é recolhida num recipiente especial, esterilizado e previamente tarado.

A colheita é feita com uma cureta de Volkmann, a começar da zona inferior para a superior, evitando que a polpa venha com excesso de sangue. Terminada a colheita, o recipiente contendo a polpa é levado para o laboratorio, e sobre a zona sangrenta do vitello applica-se um pó antiseptico e seccativo, para diminuir o soffrimento do animal.

Necropsia do vitello.

Cada vitello recebe um numero annual de ordem e tambem um numero mensal no casco da mão direita, sendo em seguida enviado para o matadouro municipal, onde o seu dono o faz abater. Acompanhando o animal segue um cartão contendo o seu numero de ordem e o numero no casco da mão direita.

Depois de abatido, o vitello é necropsiado pelos veterinarios do matadouro municipal, que devolvem ao Instituto o resultado da necropsia com a informação sobre se o animal foi considerado bom para o consumo.

Só depois de observadas estas precauções é que a polpa fornecida pelo vitello respectivo poderá ser utilizada.

Pesagem, glycerinização e 1.^a trituração da polpa.

A polpa colhida é imediatamente levada para o laboratorio, onde é pesada. Em seguida é adicionada de glycerina pura neutra (usamos actualmente com bons resultados a glycerina Schering) na proporção de 3 a 4 partes, conforme certas condições e o seu fim posterior.

Com uma espátula especial a polpa é emulsionada na glycerina e soffre uma primeira trituração, grossa, no aparelho de Felix. Esta trituração grossa tem por fim tornar mais intimo o contacto da glycerina com a polpa, que é então recolhida num frasco, convenientemente rotulada (n.^o de ordem, data da colheita, quantidade) e levada para o aparelho frigorifico, onde é mantida em temperatura de -8°C. Todas as partidas, registadas em livro e fichas adequadas, são constantemente mantidas nessa temperatura.

Segunda trituração, tamisação e extracção do excesso de ar.

Depois de permanecer no frigo por espaço de tempo superior a 4 mezes (geralmente acima de 6 mezes) a polpa soffre uma 2.^a trituração, fina, no aparelho de Felix, sendo em seguida passada num tamis de malha estreita.

A lympha tamisada é collocada numa proveta e levada para um aparelho de vacuo onde soffre extracção do excesso de ar.

A extracção, por nós instituida, do excesso de ar que augmenta em virtude da tamisação, é de grande vantagem, principalmente para a conservação de uma reacção favoravel ao virus durante a longa permanencia da polpa no frigo.

Retirado o material do aparelho de vacuo, remove-se a espuma da superficie contendo detritos e pellos que passaram pelo tamis e colloca-se a polpa num frasco, convenientemente rotulado (n.^o de ordem, data da 2.^a trituração e tamisação e quantidade em cc.), levando-se novamente para o *frigo*.

Somente depois de um mez pelo menos desta ultima operação é que se iniciam as pesquisas bacteriologicas e a verificação da actividade do virus.

Pesquisas bacteriologicas.

As pesquisas bacteriologicas que se procedem nas diferentes partidas preparadas teem por fim a verificação da presença de germes pathogenicos, prin-

principalmente do bacillo do tetano, nas polpas e a observação do seu grau de contaminação, isto é, se o numero de micro-organismos associados, mesmo não pathogenicos, não ultrapassa o limite de tolerancia.

Para a verificação de anaerobios e principalmente do bacillo tetanico, a polpa é semeada em varios tubos contendo caldo glycosado anaerobio. Os tubos permanecem durante 10 dias na estufa a 37°; se se nota formação de gaz, inocula-se então 1 cc. da cultura em cobaia para a completa eliminação da hypothese da presença daquelle germe.

A contagem de micro-organismos é feita em placas com gelose commum e a verificação da presença de outros germes pathogenicos é dada pela inoculação de 0,5 a 1 cc. da polpa em cobaia de 400 gr. de peso.

Os resultados destas verificações indicarão a marcha a seguir: se a polpa se encontra em condição de ser diluida e distribuida, ou se deverá ser submetida aos processos de purificação, que estudaremos no capitulo seguinte.

Verificação da actividade do virus.

Para a verificação da actividade do virus nas differentes partidas preparadas usamos o coelho, fazendo escarificações em 3 regiões differentes do dorso com a polpa diluida a 1/10, 1/100 e 1/1000. Uma polpa convenientemente activa deve produzir pustulas, ao longo da escarificação, até nesta ultima diluição.

Mais commummente, porém, usamos para esta dosagem o methodo de Gins, da escarificação na cornea da cobaia. Geralmente as polpas que preparamos produzem a ceratite vaccinica typica em diluição ás vezes superior a 1/100.000. Estas polpas poderão ser diluidas com 20 ou mais por cento de agua destillada antes de serem distribuidas. Esta diluição facilita, por outro lado, o enchimento dos tubos capillares.

Segundo o methodo de Gins, a polpa que determina uma ceratite vaccinica na diluição de 1/5000 deve dar na pratica 100 % de resultados positivos em primo-vaccinados.

Todas as partidas preparadas pelo Instituto apresentam, ao sahirem, uma actividade igual ou geralmente superior á considerada favoravel, segundo o methodo de Gins.

Enchimento dos tubos, fechamento e emballagem.

Preenchidas as necessarias condições de pureza bacteriana e de actividade ao Gins positivo em diluição superior a 1 por 10.000, a polpa é diluida com 20 % de agua destillada ou physiologica, podendo ser distribuida nos tubos capillares ou em bisnagas para uso colectivo (100 doses).

A distribuição nos tubos capillares é feita numa caixa de vidro, cujo interior é impregnado de vapores de ether, protegendo-se, assim, a polpa contra as contaminações da poeira do ambiente e da excessiva proximidade do operador.

O processo de enchimento é o utilizado pelo antigo Instituto Vaccinogenico de S. Paulo. Os maços de tubos esterilizados, em numero de 500, abertos em ambas as extremidades, são introduzidos num "bico de mamadeira" de borracha e esterilizado, cuja extremidade fina termina por um tubo de vidro, onde se liga o vacuo. A outra extremidade dos tubos é mergulhada na polpa contida num recipiente esterilizado.

Uma vez cheios os tubos, são suas extremidades fechadas ao maçarico, e, em seguida, acondicionados em blócos de madeira, contendo 10 tubinhos ou 10 doses da vaccina, que são reunidos em enveloppes contendo 5 ou 30 blocos de madeira, respectivamente com 50 ou 300 doses individuaes.

Além deste acondicionamento em tubos capillares, a polpa é tambem distribuida em pequenas bisnagas contendo 100 doses e que são geralmente fornecidas ás autoridades sanitarias para a vaccinação em collectividades (collegios, quartéis, etc.).

CAPITULO II

Technicas de purificação usadas no Instituto Butantan

A preocupação dos experimentadores que se dedicam ao estudo do virus vaccinico e ao preparo da lymphá immunizante, orienta-se de preferencia para a obtenção de um producto onde o virus activo appareça em estado de maior pureza, isto é, isento, se possivel, de micro-organismos associados ou pathogenicos, os quaes quasi sempre se reconhecem como responsaveis pelos accidentes sobrevindos ao uso da vaccina animal. Assim é que, á polpa bruta, oriunda da raspagem das pustulas desenvolvidas no vitello vaccinado, se addiciona geralmente uma proporção conveniente de glicerina pura e neutra, collocando-se, em seguida, a mistura em temperatura abaixo de 0° durante varios mezes. Nesta temperatura a acção da glicerina não se mostra prejudicial ao virus, o mesmo não acontecendo com os germes estranhos, por ventura associados, os quaes diminuem de numero com o decorrer do tempo. Infelizmente esta depuração da polpa glicerinada é muitas vezes insufficiente para a obtenção de um producto com a pureza necessaria a uso generalizado como o da vaccina, principalmente em occasiões de emergencia, quando se é obrigado a lançar mão até de polpas recém-colhidas. Diante desta circumstancia foram propostos differentes methodos para a purificação das polpas vaccinicas glicerinadas. Estes se baseam, principalmente, na acção de certos antisepticos volateis ou outras substancias chemicas, que, actuando de differentes maneiras sobre a polpa, agem sobre os germes estranhos, destruindo-os ou diminuindo-lhes o numero, sem manifestar acção nociva, sinão ás vezes muito fraca, sobre o proprio virus.

Processos de purificação das polpas vaccinicas

Sem entrar na discussão de todos os processos estudados e empregados para a purificação das polpas glicerinadas, mencionaremos apenas os que lograram maior repercussão e dos quaes alguns já foram utilizados na pratica.

Em 1895 foi nomeada pelo governo da Prussia uma commissão com o fim especial de estudar os meios de purificação da vaccina; desde então começou a ser bem conhecida a flora da vaccina, graças, principalmente, aos trabalhos de Kirchner, Green, Sacquepée, Hallier, Zurn, Keber, etc., para só citar os mais antigos. Esses investigadores foram os primeiros a orientar os processos de purificação da vaccina para as differenças encontradas na resistencia do virus e dos germes de associação aos agentes chimicos e physicos, o que tornava possivel a eliminação dos elementos estranhos da lymphá sem prejuizo da actividade do principio immunizante.

Processos chimicos.

Entre os methodos de purificação por meio de agentes chimicos, foi talvez o do emprego da glicerina um dos primeiros utilizados, a partir de 1886, pelo Real Instituto Vaccinico de Berlim, depois de verificadas as vantagens do seu poder microbida por Feiler e posteriormente por Kirchner. Essa verificação da acção reductora da glicerina, que se exerce lentamente e durante longo prazo, tem sido confirmada e aproveitada universalmente, ainda em nossos dias, por todos os laboratorios vaccinicos.

Tomarkin e Serebrenikoff procuraram verificar se porventura os effeitos observados com a glicerina tambem seriam produzidos pela vaselina e pela lanolina e concluíram pela insufficiencia do poder germicida destas duas substancias. Outros agentes chimicos tiveram, a seu tempo, applicação experimental visando o mesmo objectivo: o sublimado corrosivo, o iodo, o cyaneto de potassio, o acido acetico, a ammonea, o chloreto de sodio, o alcool e ainda a bile, a saponina e o taurocholato de sodio, todos elles, porém, destruindo concomitantemente o virus vaccinico em maior ou menor espaço de tempo. Entre os agentes purificadores diversas essencias lograram despertar a attenção dos investigadores. A essencia de cravo foi applicada á polpa vaccinica, segundo o methodo de Blaxall, por Degive e Antoine, mas, embora eliminasse todos os germes, prejudicava consideravelmente o virus; a essencia de giroffle foi estudada, entre outros, por M. J. Antoine, D. de Blasi, M. Belin e Marcel, segundo o citado methodo de Blaxall, mas não logrou tambem melhor resultado. Do mesmo modo foram ensaiados a antiformina, o toluol e o quinosol, cuja acção pouco intensa e sem applicação na pratica foi posta em evidencia pelos trabalhos de Fonet, Carini e Seiffert e Hune, respectivamente.

Melhor acceitas e de resultados incontestavelmente evidentes foram as substancias corantes, dentre as quaes se destaca o verde brilhante que, em diluições fracas, agiria sobre os germes associados respeitando o virus, facto que, segundo

as experiencias de Tyler (de Nova York) e de um de nós, se observa quando a polpa assim tratada é mantida em temperatura abaixo de 0°. O seu emprego é, hoje em dia, corrente na America do Norte.

Ainda entre os corantes foram ensaiados o azul de methyleno por Tappeiner e a eosina, bem como o vermelho neutro por Friedberger e Yamamoto.

Na lista das substancias volateis, de mais recente experimentação, encontra-se o ether sulfurico que, em 1913, foi aproveitado em Berlim com satisfactorios resultados, segundo as publicações de Fernet. A mesma technica foi mais tarde repetida por Noguchi e depois por Barbará em Buenos-Aires, não conseguindo este ultimo A. esterilização absoluta da polpa vaccinica, nem mesmo depois de 30 dias de contacto com o ether, além de ter observado sensivel diminuição da actividade do virus, em opposição ao effeito annuciado por Fernet. A conclusões iguaes ás de Barbará chegou Edna Harde, no seu trabalho publicado nos "Annales de l'Institut Pasteur" em Julho de 1916.

Dignas de elevado apreço são as experiencias de Tanner de Abreu, feitas entre nós em 1916, concluindo, por sua vez, que "em relação ao virus vaccinico é evidente, nos resultados de todas as experiencias, a notavel attenuação soffrida por influencia do ether sulfurico".

Preconizada por L. Camus, a chlorethyla não sahiu do dominio experimental. Melhor sorte teve o chloroformio proposto por Green, e usado, sob a forma de vapores durante certo tempo, tambem no nosso antigo Instituto Vaccinogenico.

Ainda em relação aos antisepticos é indispensavel uma menção especial ao phenol, officialmente empregado nos Estados Unidos, por determinação do "Hygienic Laboratory" de Washington, e cuja addição, já feita em outros paizes e experimentada certa vez no Rio de Janeiro com resultado negativo, não se recommenda em nosso meio e clima, visto como as polpas assim tratadas devem ser constantemente mantidas em temperatura abaixo de 0°, mesmo após a sahida do Instituto, para que a actividade do virus não soffra redução em prazo relativamente curto.

Processos phisicos.

Embora em menor numero do que os processos chimicos de purificação da vaccina, não são, todavia, os meios phisicos de inferior relevo e importancia, tanto que de longa data vêm sendo tambem ensaiados.

Procurando proteger as pustulas vaccinicas por meio da oclusão, visava Paul, em 1898, a preservação contra os agentes estranhos, embora ao mesmo passo prejudicasse a evolução normal da vaccina.

Santori, em 1904, tentou a pressão de 450 atmosferas sobre o virus vaccinico e verificou tambem os effeitos que a trituração da polpa exercia sobre sua ulterior contaminação. Centrifugação e sedimentação foram processos tentados, na Allemanha ainda, sem resultado apreciavel.

A influencia de differentes especies de raios luminosos tem sido aproveitada fartamente como meio de purificação. De referencia ao frio, nenhuma duvida existe mais para a sua geral acceitação, muito embora a longa permanencia da polpa em baixa temperatura não seja sufficiente para determinar por si só uma baixa sensivel e satisfactoria do teor da sua flora microbiana.

Mais pratico e usado nos Estados Unidos é o processo de purificação da polpa glycerinada por meio do aquecimento descontínuo a 37°, durante 1 ou 2 horas, por alguns dias, até que o numero de germes estranhos fique reduzido a um limite toleravel. Por este processo, ensaiado já com resultados favoraveis por um de nós, favorece-se a acção antiseptica da glycerina sobre os germes de contaminação sem se provocar, com a observancia rigorosa da technica, redução consideravel da actividade do virus (Figs. A e B).

Processos biologicos.

Em todo caso, quer os processos chimicos de purificação da polpa glycerinada, quer os processos physicos indicados, não representam o ideal que se deve collimar, e que seria a producção facil e fornecimento abundante do virus puro, isto é, isento de quaesquer germes de contaminação. Dahi as tentativas para a cultura do virus *in vitro* e *in vivo*.

A obtenção do virus puro, *in vivo*, é possivel e realizavel pelos processos de Noguchi (vaccina testicular) e de Levaditi (neuro-vaccina). Numerosas são, na verdade, as contribuições ao estudo do virus obtido por inoculação e multiplicação no testiculo de certos animaes, assim como no cerebro de coelhos. Todavia, na pratica, a vaccina testicular, pelas difficuldades technicas do preparo, não teve acceitação generalizada; de seu lado, a neuro-vaccina, apresenta, além deste, outros inconvenientes que a não recommendariam ao uso prophylactico.

Em relação á cultura *in vitro*, citaremos apenas as primitivas tentativas feitas, principalmente por Fernet e os trabalhos relativamente recentes de Carrel e seus collaboradores, do Instituto Rockefeller. Os resultados de Carrel são sobremodo interessantes: este illustre cientista, por meio de uma technica especial, obteve a multiplicação do virus em culturas, *in vitro*, de cellulas embryonarias, acreditando que com um embrião de gallinha se poderá obter cultura pura do virus, em quantidade igual á fornecida por um vitello. Este processo, que representa um grande aperfeiçoamento no preparo da vaccina e no estudo do virus, encerra, como facilmente se comprehende, difficuldades technicas á sua industrialização, pois exige installações especiaes nos laboratorios productores da lymphá.

Processos physico-chimicos.

Mais pratico, portanto, seria o aproveitamento do virus obtido segundo o methodo commummente usado, vaccina animal, mas separado, por processos adequados, dos detricos cellulares e germes estranhos existentes na polpa.

Entre estes processos o mais recommendavel seria o da filtração em velas especiaes, pois que o virus vaccinico é filtravel.

Hugh K. Ward, do Departamento de Bacteriologia e Immunologia, Harvard University Medical School, Boston, obteve a filtração do virus, suspenso em caldo hormonio, através da vela Berkefeld V e, mais recentemente, Hidetake Yaoi e Hisao Kasai, fazendo, preliminarmente, a passagem, através da vela, de uma diluição acida de clara de ovo, de mistura com o virus, conseguiram a filtração deste. Devemos ainda lembrar que estes dois autores japonezes já haviam empregado, na purificação da vaccina, o methodo de adsorpção pelo kaolin.

Sendo o processo, que descrevemos para a obtenção do virus vaccinico puro, baseado na sua filtrabilidade, sob certas condições, através de velas diatomaceas, faremos a seguir algumas considerações a respeito de experiencias realizadas neste Instituto e que constituiram objecto de um trabalho apresentado por um de nós ao V Congresso Brasileiro de Hygiene, reunido recentemente em Recife.

Varios são os factores que influem sobre a passagem do virus vaccinico através dos filtros: natureza e composição da vela, porosidade, carga electrica da vela, do virus e do meio, poder de adsorpção, intensidade da pressão, temperatura, etc.

No decurso de nossas pesquisas, verificamos que, suspenso em caldo glycosado a 1 % (pH=8,0), o virus atravessa com facilidade as velas Mandler (regular) de 6 lbs. de pressão. A filtração do virus se dará tambem, mas com certa dificuldade, se a suspensão for feita em caldo commum e não se dará absolutamente quando em agua physiologica. Os pormenores technicos das experiencias que realizamos e seus resultados constam do trabalho citado.

Estes resultados experimentaes evidenciaram a possibilidade do emprego do virus puro, filtrado, dependendo apenas do estudo de certas particularidades technicas que tornariam possivel o seu aproveitamento industrial para o fim de prophylaxia collectiva.

Mostraremos, a seguir, as experiencias que realizámos, com este fim, indicando primeiramente, em linhas geraes, a technica para a producção da polpa bruta.

Producção e colheita da polpa vaccinica

O vitello é vaccinado com uma semente escolhida e cujo virus se revele sufficientemente activo (Gins positivo em diluição superior a 1/50.000), de accordo com todos os cuidados technicos usuaes, já descriptos no capitulo I.

No 5.º dia depois da vaccinação, estando bem desenvolvidas as pustulas, e não se notando reacção inflammatoria local intensa ou edema, procede-se á colheita da polpa.

A polpa a ser empregada para a filtração, é escolhida entre as pustulas de desenvolvimento mais perfeito e normal e collocada num recipiente especial, esterilizado e previamente tarado.

Retirada a quantidade necessaria para a partida a ser preparada pela filtração, continua-se a colheita da polpa que deverá ser glycerinada e manipulada segundo o methodo habitual para a producção da vaccina animal.

A polpa bruta, separada e contida no recipiente especial, é levada para o laboratorio, onde se iniciam immediatamente os differentes tempos para a obtenção do virus puro, filtrado.

Filtração do virus

Preparo da emulsão.

Colhida a polpa, é ella pesada e suspensa em caldo glycosado a 1 % (pH=8,0) na proporção de 10 grs. para 100 de vehiculo.

A addição do caldo é feita aos poucos e á medida que se tritura num gral.

O emprego do caldo glycosado, na reacção de pH=8,0, mostrou-se o mais adequado, conforme se verifica pelas experiencias do nosso citado trabalho e pelas de Hidetake e Kasai sobre a relação entre a concentração do ionte hydrogenio e a filtrabilidade do virus vaccinico.

A concentração da suspensão da polpa pode ser reduzida de 10 %, pois, conforme veremos adeante, os resultados que obtivemos com o emprego do virus filtrado, nesta proporção, permittem sua maior diluição para emprego na vacinação. Para se evitar esta nova manipulação do producto, julgamos sufficiente, com as polpas bastante activas, a sua mistura na proporção de 5 grs. para 100 de caldo glycosado.

Centrifugação.

Preparada a suspensão, é ella centrifugada durante certo tempo. As particulas solidas, detrictos cellulares, etc., reúnem-se no fundo e o liquido é decantado e collocado em provetas especiaes afim de soffrer a filtração. Verifica-se então a reacção do liquido, a qual, sendo diversa, se trata de reajustar para o mesmo ponto que a do caldo primitivo, isto é, pH=8,0, representando isto uma medida da maxima importancia para que se consiga a filtração com a devida rapidez.

E' desnecessario dizer que todo o material, tubos centrifugadores, provetas, etc. devem ser convenientemente esterilizados.

Filtração e distribuição.

Usamos, como foi descripto nas experiencias do nosso citado trabalho, a vela Mandler (regular) de 6 lbs. de pressão. A vela introduzida na proveta contendo a emulsão é ligada a um aparelho (frasco) que recebe o filtrado, ligado, por sua vez, a um aparelho de vacuo. A filtração é feita com a pressão negativa de 30 a 40 cm. de Hg.

Uma vez terminada a filtração, a distribuição se faz pelo processo usual em taes casos. Distribuido em empolas, o liquido é semeado nos meios habituaes de laboratorio, aerobios e anaerobios, para a verificação de sua esterilidade em relação aos germes estranhos cultivaveis nesses meios.

CAPITULO III

Aplicação do virus filtrado na pratica

Para o emprego na pratica da vacinação, era indispensavel verificar as condições em que o virus filtrado se conservaria melhor, o tempo de duração da sua actividade, concentração optima, etc.

Com este fim o virus foi distribuido, em quantidades de 1 ou 2 cc. em tubos longos (como os usados para cultura de leptospira) e esterilizados. Os tubos distribuidos foram separados em diferentes lotes, tratando-se cada um, sob varias condições, da seguinte maneira:

I - Os tubos contendo o virus foram submettidos á extracção do excesso de ar por meio do vacuo, sendo immediatamente fechados no maçarico:

- 1.º lote, conservado na temperatura do laboratorio;
- 2.º lote, conservado na "frigidaire" a 5°C.;
- 3.º lote, conservado no "frigo" a -8°C.

II - Os tubos não soffreram a previa extracção do ar e foram apenas, depois da distribuição, fechados ao maçarico.

- 4.º lote, conservado na temperatura do laboratorio;
- 5.º lote, conservado na "frigidaire" a 5°C.;
- 6.º lote, conservado no "frigo" a -8°C.

A actividade do virus antes e depois da filtração foi verificada pelos methodos de Gins e Groth, o mesmo acontecendo com o filtrado, mantido nas diferentes condições acima assignaladas e no fim de 1, 2 e 6 mezes. Os resultados colhidos quanto á actividade do virus filtrado confirmaram os anteriormente obtidos e assignalados no nosso citado trabalho (Figs. C e D).

Quanto á conservação do virus filtrado, verificámos ser desnecessaria a extracção do excesso de ar, bastando que as empolas distribuidas sejam immediatamente fechadas ao maçarico.

Quanto á temperatura optima para a conservação do filtrado activo, os resultados foram mais favoraveis com os lotes de empolas mantidos em temperatura abaixo de 0°C. Com os lotes conservados na "frigidaire", á temperatura de 5°C., os resultados foram tambem muito favoraveis; o virus manteve sua actividade, mesmo no fim de 6 mezes (tempo maximo até agora verificado), quando conservado a -8°C.

Com os lotes de empolas conservados na temperatura do laboratorio, a verificação feita depois de um mez mostra grande reduccção da actividade do virus: Gins positivo apenas até a diluição de 1/100, emquanto que, neste prazo, o virus,

mantido nas condições optimas assignaladas acima, se mostrou activo, por este methodo de dosagem, em diluição superior a 1/5.000.

Pode-se ter a certeza de que o virus puro filtrado, mantido no laboratorio em temperatura abaixo de 0°C. e em temperatura tambem favoravel (5°C.) após sua sahida para os serviços de prophylaxia, poderá ser utilizado com vantagem e efficiencia dentro de um prazo superior a dois mezes.

Emprego do virus puro como semente e na pratica.

Para a verificação da actividade do virus puro, filtrado e dos resultados da sua utilização como semente, servimo-nos de um vitello, vaccinando-o, em uma zona do ventre, com o virus filtrado e, em outra zona, com a suspensão do virus não filtrada. As duas zonas, de cerca de 10 cm² cada uma, foram escarificadas, e os virus, na dose de 1 cc., foram esfregados na respectiva zona, estando o operador com luva de borracha.

Em ambas as regiões as pustulas se desenvolveram: com o virus não filtrado (fig. 1), notou-se reacção local mais intensa, ao passo que com o virus filtrado (fig. 2), não se observou reacção inflammatoria e as pustulas, embora menores, se mostraram mais typicas.

Outro vitello foi vaccinado igualmente com o virus filtrado, conservado em condições favoraveis (abaixo de 0°C.) durante 2 mezes. A pustulação mostrou-se bem caracteristica, não se observando reacção inflammatoria (fig 3).

Ainda outro vitello foi vaccinado exclusivamente com o virus puro e filtrado (fig. 4), já para uso industrial da vaccina, com excellent resultado de desenvolvimento das pustulas e rendimento da polpa.

Deante destes resultados experimentaes e da applicação do virus no vitello, tratámos primeiro de verificar a immuniidade conferida pelo virus filtrado em relação á *lympha commum* e vice-versa, em experiencias cruzadas, em coelhos, e vitellos, para em seguida iniciarmos o emprego do nosso virus filtrado, puro, na vaccinação anti-variolica.

Essa immuniidade provocada pelo virus filtrado em relação á polpa vaccinica *commum* ficou bem demonstrada, tanto sob o ponto de vista experimental, por meio das citadas observações em coelhos e vitellos, resumidas nos quadros I (A e B) e II (A e B), como sob o ponto de vista pratico, em resultado da vaccinação de pessoas, tendo igualmente sido verificado que a vaccina *commum* confere immuniidade em relação ao virus filtrado.

Para a applicação pratica, o virus filtrado é distribuido em empolas de 0,5 cc., de modo a se tornar facil sua utilização. Essa quantidade é sufficiente para a vaccinação de, pelo menos 5 pessoas, porquanto as empolas contêm geralmente um excesso de producto.

Antes de se proceder á vaccinação, é aconselhavel fazer-se uma applicação previa de ether sobre a região a ser escarificada e isto para se reduzirem as probabilidades de infecções secundarias. Em seguida se deposita uma pequena

gotta do liquido contido na empola em dois pontos sufficientemente separados (região deltoidiana de preferencia ou outro qualquer ponto que se escolha). Faz-se então a escarificação do tegumento segundo os methodos usuaes, tendo-se sempre o cuidado de evitar o apparecimento de sangue.

Resultados clinicos.

Até agora praticamos com o virus filtrado 53 vaccinações em pessoas, adultos e creanças, residentes em Butantan e proximidades. Os resultados são resumidos no quadro junto.

Quanto á evolução das pustulas, não se observa a reacção local, muitas vezes intensa, como commumente. As pustulas são bem formadas e cercadas por uma ligeira areola pouco avermelhada. As figuras 5 e 6, mostram o aspecto das pustulas vaccinicas desenvolvidas, sendo que em 2 observações se pode ver o aspecto da cicatrização após 3 mezes.

Pelas vaccinações já praticadas, verifica-se um resultado de 100 % de casos positivos em primo-vaccinados; em 19 revaccinados, 7 tiveram a vaccina propriamente dita, 11 tiveram reacção de immuidade e em 1 o resultado é desconhecido.

Para confirmação experimental da immuidade conferida pelo virus vaccinico puro e filtrado, praticamos, como vimos, algum tempo depois, a inoculação da vaccina commum em 5 creanças que haviam sido primo-vaccinadas com o filtrado e em todas ellas observámos reacção de immuidade typica, o mesmo acontecendo tanto no coelho como no vitello anteriormente vaccinados com o virus puro, filtrado.

Devemos assignalar ainda que todos os individuos por este meio vaccinados apresentam um processo especial de cicatriz das pustulas, que não deixa senão uma imperceptivel mancha com tendencia franca ao completo apagamento (Figs. 7 e 8).

Resta-nos, agora, verificar a duração da immuidade conferida pelo emprego do virus filtrado; isto será feito mediante repetição da prova, annualmente, em todas as pessoas por nós ha pouco immunizadas.

RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho são assignalados em conjuncto:

- a) o processo de preparo industrial da vaccina animal;
- b) os methodos de purificação da *lympha vaccinica*.

Sobre estes pontos são descriptas, de preferencia, as technicas empregadas no serviço de vaccina animal da Secção de Virus do Instituto Butantan e, como contribuição original, o methodo empregado para a obtenção do virus vaccinico

puro por meio da filtração, assim como o resultado do seu emprego na prophylaxia da variola, chegando ás seguintes conclusões:

1. - E' possível obter-se, por meio da filtração sob certas condições, o virus vaccinico em estado de pureza e em quantidades apreciaveis;
2. - Esse virus assim obtido é passivel de applicação, com real vantagem, na prophylaxia da variola;
3. - E' evidente a immuidade que elle determina, nas creanças vaccinadas, em relação a uma posterior vacinação com a polpa vaccinica commum, o mesmo acontecendo sob o ponto de vista experimental com a vacinação de coelhos, cobaias e vitellos;
4. - A cicatriz consequente á vacinação com o virus puro, filtrado, é pouco perceptivel, não deprimida e não deformante da esthetica da região.

ABSTRACT AND CONCLUSIONS

This paper deals with *a*) the process of industrial production of the small-pox vaccine; *b*) the methods of purification of the vaccine lymph. In this regard the various technics used at the Instituto Butantan are described together with the purification of the vaccine virus by means of filtration, the conclusions reached at by the authors as to the practical application of the purified virus in the prevention of small-pox being the following:

1. It is possible to obtain, by means of filtration under proper conditions, the vaccine virus entirely pure and in fairly large amounts;
2. The virus thus obtained may be applied to the prevention of small-pox with a decided advantage over the common vaccine;
3. The immunity brought about in children by the purified virus may be demonstrated by the negative "take" of a further application of the common vaccine. This may also be experimentally observed in rabbits, guinea-pigs and calves;
4. The scar resulting from the application of the filtered virus is leveled, undefacing and hardly perceptible.

Observações experimentaes sobre o valor immunizante do virus filtrado em relação á *lympha commum* e vice-versa

I. Vitellos

A. *Immunização com a vaccina commum e ulterior inoculação do virus filtrado*

N.º	Vaccina usada	Data da vacinação	RESULTADO	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO
1 (1930)	Polpa n.º 4618	15 - II - 30	Positivo: evolução normal da vaccina; colheita: 20 - II - 30.	Filtrado da polpa n.º 4659	14 - V - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

B. *Immunização com o virus filtrado e ulterior inoculação da vaccina commum*

N.º	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO	Vaccina usada	Data da vacinação	RESULTADO
17 (1930)	Filtrado da polpa n.º 4653	30 - IV - 30	Positivo: evolução typica e sem reacção inflammatoria; colheita em 5 - IV - 30.	Polpa n.º 4618	14 - V - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

II. Coelhos

A. *Immunização com a vaccina commum e ulterior inoculação do virus filtrado*

N.º	Vaccina usada	Data da vacinação	RESULTADO	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO
4 (1930)	Polpa n.º 4602	25 - III - 30	Positivo: desenvolvimento normal.	Filtrado da polpa n.º 4653	7 - V - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

B. *Immunização com o virus filtrado e ulterior inoculação da vaccina commum*

N.º	Virus usado	Data da inoculação	RESULTADO	Vaccina usada	Data da vacinação	RESULTADO
10 (1930)	Filtrado da polpa n.º 4653	14 - IV - 30	Positivo: desenvolvimento typico.	Polpa n.º 4618	19 - IV - 30	Negativo: nenhum desenvolvimento.

III. Observações clinicas

A. *Individuos primo-inoculados com o virus puro filtrado e ulteriormente immunizados com a vaccina commum*

Nome	Idade (annos)	Residencia	Inoculação do virus filtrado (data)	Resultado	Emprego da vaccina commum (data)	Resultado
R. K. F.º	3	Butantan	12 - XII - 1929	Positivo	17 - III - 1930	Negativo : R. de immunidade
L. R.	6	"	"	"	"	"
J. M. A.	1,6	"	14 - XII - 1929	"	"	"
J. N.	8	Pinheiros (Escola Butantan)	7 - II - 1930	"	"	"
A. L.	8	"	"	"	"	"
A. R.	11	"	"	"	"	"

B. *Individuos immunizados com a vaccina commum ha menos de 2 annos e ulteriormente inoculados com o virus puro filtrado*

Nome	Idade (annos)	Residencia	Inoculação do virus filtrado (data)	Resultado
R. K.	35	Butantan	12 - XII - 1929	Negativo : R. de immunidade
A. F.	28	"	"	"
L. P.	40	"	14 - XII - 1929	"
M. D. C.	29	"	"	"
J. A.	8	Pinheiros, (Escola Butantan)	12 - II - 1930	"
P. G.	7	"	"	"

SERVIÇO SANITARIO DE S. PAULO

VARIOLA

Observações de primo- e revaccinados com o virus puro e filtrado

N.º	Data	NOME (iniciais)	Idade	Primo- vaccinado	Revac- cinado	Virus puro filtrado	RESULTADO			OBSERVAÇÕES
							Primo- vaccina	REVACCINAÇÃO		
								Vaccina p. dita	Vaccl- noide	
	1929					F. I				
1	12-XII	A. S.	22	Sim		4624	P			
2	" "	R. K.	4,6	"		"	"			
3	" "	R. K.	35		Sim	"		P		
4	" "	R. K. F.º	3	Sim		"	P			
5	" "	L. C. C.	45	"		"	"			
6	" "	L. R.	6	"		"	"			
7	" "	A. F.	28		Sim	"			P	— Vaccinado ha dois annos com resultado posi- tivo.
8	" "	M. D. G.	24		"	"		P		
9	" "	J. G.	2	Sim		"	P			
10	" "	R. C.	32	"		"	"			
11	" "	M. D. N.	60	"		"	"			
12	" "	A. P.	32	"		"	"			
13	" "	M. G. P.	24	"		"	"			
						F. II				
14	14-XII	M. P. F.	4	"		4630	"			
15	" "	L. P.	40		Sim	"				Resultado des- conhecido.
16	" "	A. C.	37	Sim		"	P			
17	" "	V. S.	3	"		"	"			
18	" "	E. F.	2,6	"		"	"			
19	" "	A. F.	30		Sim	"		P		
20	" "	D. G.	3	Sim		"	P			
21	" "	S. G.	0,7	"		"	"			
22	" "	C. A.	0,10	"		"	"			
23	" "	J. M. A.	1,6	"		"	"			
24	" "	A. M. M.	33		Sim	"		P		
25	" "	A. M. M.	3,4	Sim		"	P			
26	" "	M. D. C.	29		Sim	"		P		
	1930									
27	7-II	A. R.	11	Sim		"	P			
28	" "	J. N.	8	"		"	"			
29	" "	A. R.	11	"		"	"			Mantido o filtra- do durante 65 dias no "frigo".
30	" "	A. L.	8	"		"	"			
31	13-III	B. P.	9		Sim	"			P	
32	" "	J. M. P.	8		"	"			P	
33	" "	J. G.	8		"	"			P	
34	" "	A. R.	8		"	"			P	

Observações de primo- e revaccinados com o virus puro e filtrado

(Continuação)

N.º	Data	NOME (iniciais)	Idade	Primo- vaccinado	Revac- cinado	Virus puro filtrado	RESULTADO			OBSERVAÇÕES
							Primo- vaccina	REVACCINAÇÃO		
								Vaccina p. dita	Yac- cinoide	
35	13-III	B. P.	7		Sim	F. II 4630				P
36	10-IV	T. K.	1	Sim		"	P			
37	22-IX	S. G.	2	"		"	P			
38	" "	V. S. V.	1	"		4659	P			
39	" "	A. F. S.	1	"		"	P			
40	" "	M. C.	0,11	"		"	P			
41	1-X	O. C. B.	28		Sim	"				P
42	" "	R. C. B.	5		"	"		P		
43	" "	J. C. B.	6		"	"				P
44	" "	R. C. B.	1,6	Sim		"	P			
45	" "	B. K.	20		Sim	"				P
46	" "	E. R.	24		"	"		P		
47	16-X	M. H.	5	Sim		4672	P			
48	29-XI	R. M.	21		Sim	"				P
49	12-XI	F. S. S.	4	Sim		"	P			
50	" "	D. S. S.	3	"		"	P			
51	" "	G. S. S.	2	"		"	P			
52	" "	A. S. S.	6		Sim	"				P
53	13-XII	A. C.	0,3	Sim		"	P			

Verificação da immumidade conferida pelo virus filtrado em relação á vaccina commum

1	1930 17-III	R. K. F.º	3		Sim	4619				P	Estes resultados confirmam a immumidade conferida pelo virus filtrado e puro.
2	" "	L. R.	6		"	"				"	
3	" "	J. M. A.	1,8		"	"				"	
4	" "	J. N.	8		"	"				"	
5	" "	A. L.	8		"	"				"	
6	" "	A. R.	11		"	"				"	

REFERENCIAS

1. *Barbará, B.* — Revista Inst. Bact. Dep. Nac. Higiene Buenos Aires :306-307.1916.
2. *Belin, M.* — Rev. Int. Vaccine IV(1):40.1913-1914.
3. *Blazall, B. et Frank* — Revue Int. Vaccine III(5):373.1913.
4. *Camus, L.* — C. R. Soc. Biol. Paris II:699.1913.
5. *Camus, L.* — Rev. Int. Vaccine IV(1):16.1913-1914.
6. *Camus, L.* — Rev. Int. Vaccine II(4):320.1912.
7. *Camus, L.* — Rev. Int. Vaccine IV(4):294.1913.
8. *Carrel, A.* — J. Exper. Med. XXXVIII:407.1923.
9. *Chaumier* — Rev. Int. Vaccine I(1):28.1910.
10. *Fornet* — Rev. Int. Vaccine IV(1):93.1913.
11. *Friedberger, E. et Yamamoto, J.* — Rev. Int. Vaccine IV(5):401.1913-1914.
12. *Godinho, Raul* — Com. V Congresso Bras. de Higiene Recife, 1929, in Arch. Hygiene IV(1):75.1930.
13. *Green* — The Lancet :1738.1903.
14. *Levaditi, M. et Nicolau, L.* — C. R. Acad. Sc. Paris CLXXVI(4):1768.1923.
15. *Monteiro, J. Lemos* — Com. Soc. Biol. S. Paulo 1927; Com. V Congresso Bras. de Higiene, Recife 1929, in Arch. Hygiene IV(1):67.1930.
16. *Noguchi, H.* — J. Exper. Med. XXI(6):589.1915.
17. *Reynals, F. D.* — Stud. Rockefeller Inst. Med. Res. LXV:237.1928.
18. *Santori* — Annali Igiene Sperimentale XIV:586.1904.
19. *Sacquepée* — These 1897, cit. in These Tanner de Abreu.
20. *Tanner de Abreu* — These 5-27:1916.
21. *Tomarkin et Serebrenikoff* — Rev. Int. Vaccine I(6):531.1911.
22. *Yaoi, H. et Kasai, H.* — Japan. J. Exper. Med. VII(2):241.1929.
23. *Yaoi, H. et Kasai, H.* — Japan. J. Exper. Med. VII(3):389.1929.
24. *Yaoi, H. et Kasai, H.* — Japan. J. Exper. Med. VII(2):243.1929.
25. *Voigt, L.* — Rev. Int. Vaccine IV(4):243.1913-1914.
26. *Ward, H. K.* — J. Exper. Med. L(1):31.1929.

Fig. B.
Vaccina n.º 4578 (purificada)



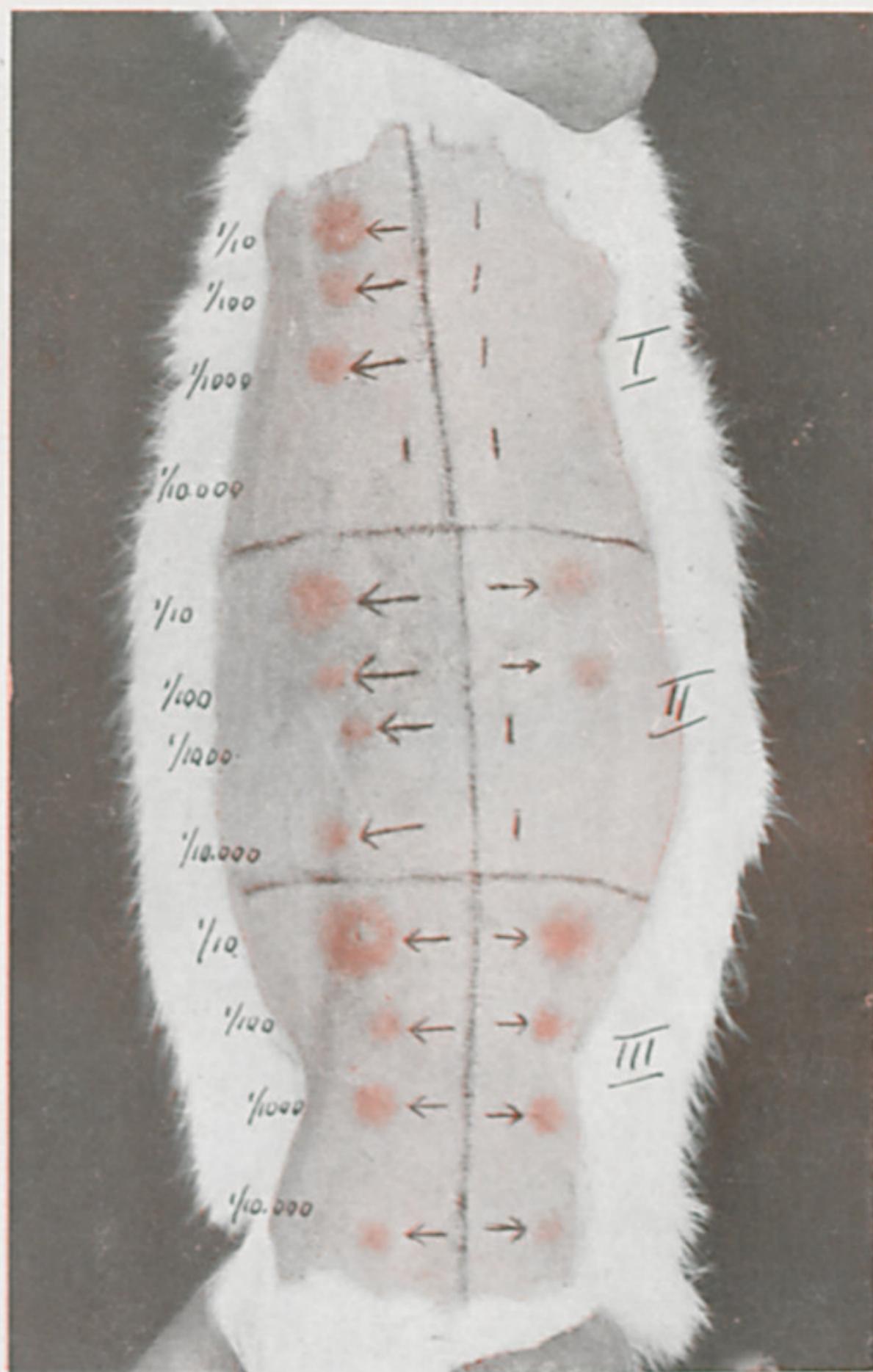
Evolução típica, sem confluência das pustulas,
apesar do pequeno espaço propositalmente dei-
xado entre as escarificações

Fig. A.
Vaccina n.º 4578 (não purificada)



Reacção local e erupção confluyente
dando cicatriz defeituosa

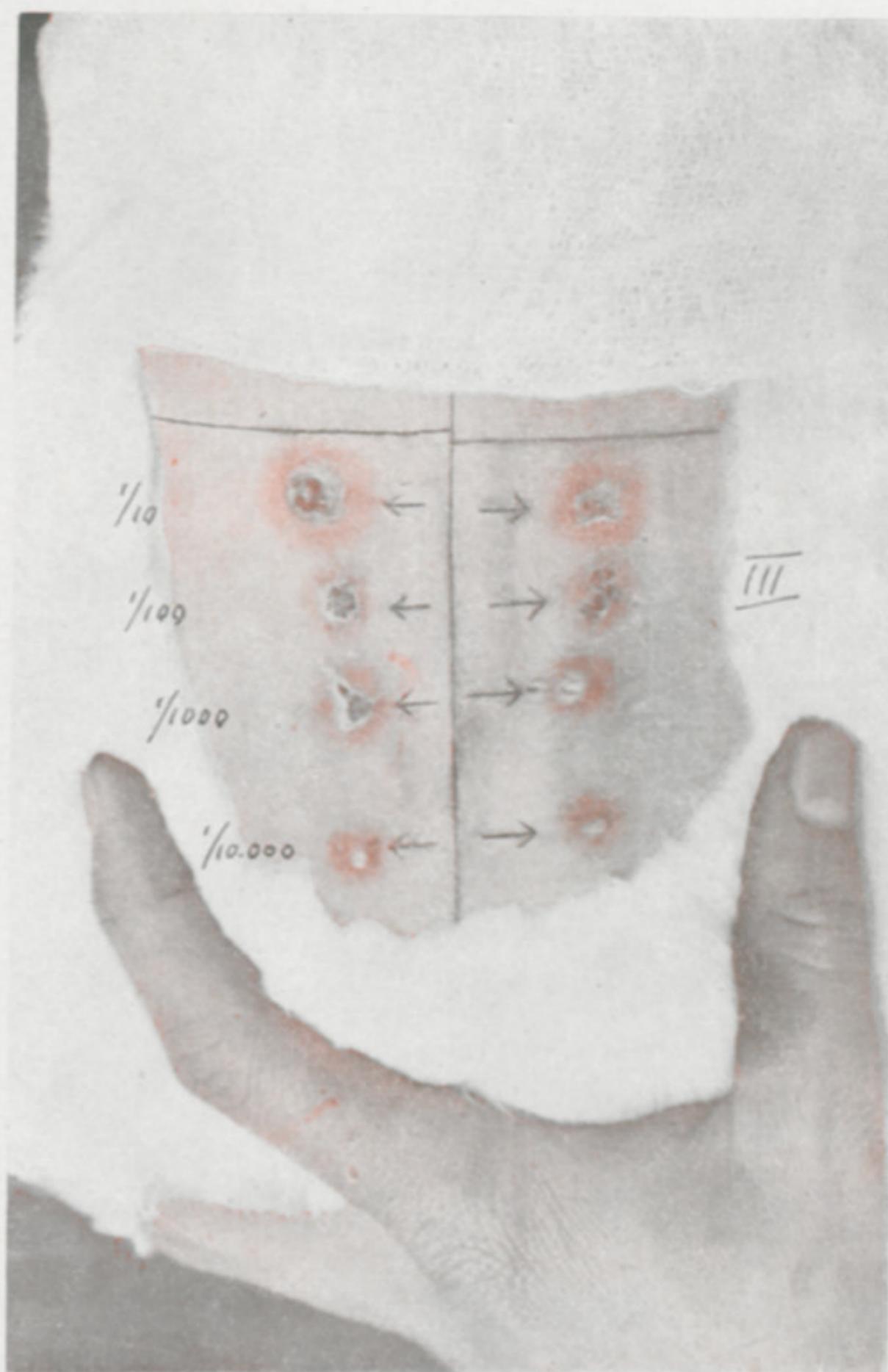
Fig. C.



Verificação da actividade da lympha em diferentes meios,
pelo methodo de Groth:

- a) á esquerda — lympha não filtrada
 b) á direita — lympha filtrada
 I — em agua physiologica
 II — em caldo commum
 III — em caldo glycosado

Fig. D.



Ampliação da zona III (a e b) da Fig. C, relativa á verificação, pelo methodo de Groth, da actividade da lympha, não filtrada ou filtrada e suspensa em caldo glycosado

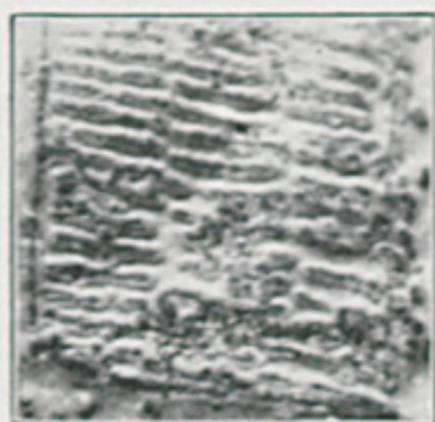


Fig. 1
Evolução da vaccina
no vitello
(virus não filtrado)



Fig. 2
Evolução da vaccina
no vitello
(virus filtrado fresco)



Fig. 3
Evolução da vaccina
no vitello
(virus filtrado de 2 mezes)



Fig. 4
Vaccinação do vitello com virus filtrado para produção industrial

Vaccinação humana com virus filtrado

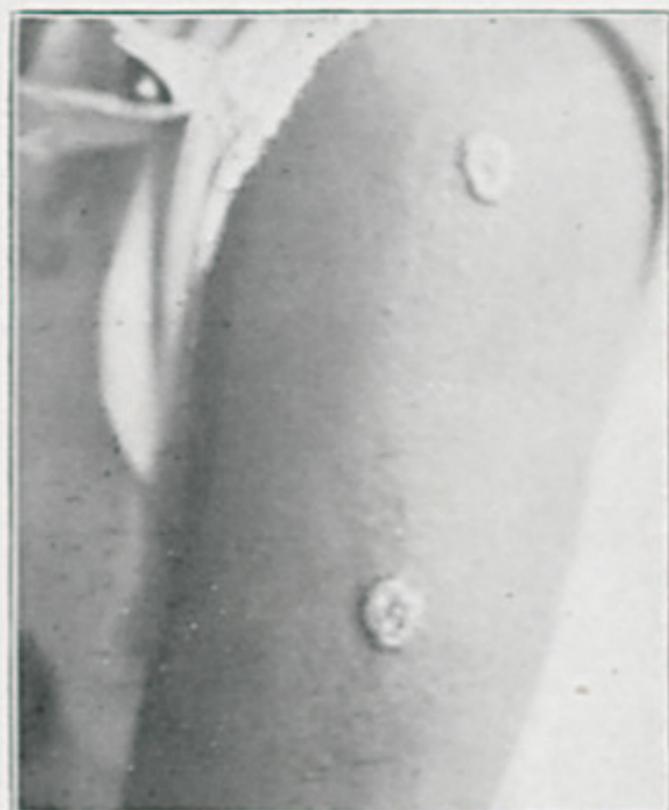


Fig. 5
Caso da observação n.º 21



Fig. 6
Caso da observação n.º 6



Fig. 7
Cicatrices após 3 mezes



Fig. 8
Cicatrices após 3 mezes