

Sobre a passagem de germens através de membranas de colodio *

1ª. nota

por

A. J. L. de Nin Ferreira

(Trabalho do Laboratorio do Prof. A. Fontes)

(Com 1 estampa)

Comquanto já existam numerosos trabalhos sobre este assunto, por divergirem os seus resultados, resolvemos verificar a questão, tendo em vista as conclusões a que chegou o prof. Fontes sobre o ciclo da vida das bactérias, em seus ultimos estudos.

Usámos a seguinte técnica para a preparação dos sacos de colodio:

Em tubo de ensaio collocámos 2 cc. de colodio a 4% pro-analysis de « Merck » e girámos o tubo de maneira a distribuir completamente o colodio pelas paredes do mesmo. Houve o cuidado de fazer a rotação uniforme para que a parede do saco formado conservasse espessura igual. O tempo de rotação tem influencia na porosidade dos sacos, pois esta varia com a rapidez da secagem.

Uma vez sêco o colodio, descolámos o saco obtido sob agua e montámos o mesmo provisoriamente na extremidade de um tubo de vidro, afim de sofrer fervura durante 10 minutos. Deve haver o cuidado de encher o mesmo com agua afim de evitar o enrugamento do colodio, que poderia prejudicar a resistencia da membrana.

Segundo Sanarelli (1) o emprego do autoclave deteriora a membrana de colodio, recomendando este autor, que se faça a esterilização a frio por meio de uma solução de fenol e acido tartarico sob técnica especial.

Como verificámos em experiencias prévias que, quer um quer outro método davam resultados identicos, preferimos o da esterilização em autoclave por ser de mais facil execução. O saco foi montado defi-

* Recebido para publicação a 9 de Março de 1939 e dado á publicidade em Outubro de 1939.

nitivamente na extremidade ligeiramente estrangulada do tubo de vidro e amarrado fortemente com linha de seda. A junta foi soldada com colodio elastico afim de evitar soluções de continuidade entre o vidro e o saco.

Ligados os sacos aos respectivos tubos, estes ultimos foram montados por meio de algodão em rama em balões contendo caldo simples.

A extremidade superior dos tubos foi fechada com algodão.

A montagem de sacos duplos de que tambem nos servimos em algumas das nossas experiencias obedeceu a seguinte técnica:

Um saco de menores dimensões é amarrado da maneira já descrita em um tubo semelhante aos que servem para os sacos simples, mas de calibre menor. Este tubo por sua vez é fixado a outro tubo de maior calibre por meio de algodão em rama. Neste ultimo tubo montamos pela técnica já mencionada o saco externo. Uma melhor idéa do conjunto é dada pelos desenhos que acompanham a presente nota.

O meio de cultura no interior do balão só deve atingir a metade inferior do saco afim de ser evitada uma possivel comunicação com a soldagem.

Por meio de pipêta estirada introduzimos 5 cc. de caldo no interior do saco e de maneira que o nivel fique ligeiramente superior ao nivel do caldo contido no balão. Este modo de proceder tem por fim notar se o saco se acha perfeito, pois que, em caso de ruptura, haveria equilibrio de niveis.

O conjunto assim oblido é esterilizado em autoclave a 110° durante 20 minutos e guardado por 24 horas em estufa afim de verificar a completa esterilidade e integridade do aparelho. A integridade dos sacos é reconhecida pela diferença de nivel do caldo existente dentro dos sacos e no balão.

Antes de passarmos a descrever as experiencias, achamos conveniente relatar a técnica usada para a verificação posterior da integridade dos sacos usados, como tambem, a técnica de que nos servimos para a verificação dos limites de porosidade das membranas obtidas.

O processo usado para a verificação posterior da integridade dos sacos servidos nas experiencias foi o de insuflação de ar mantendo o saco mergulhado em agua acima de seu ponto de soldagem com o tubo de vidro, de maneira a verificarmos a presença de qualquer fenda que se tenha formado posteriormente á sementeira, revelada pela formação de bolhas.

A determinação da porosidade não pode ser feita para cada saco em particular, pois o processo inutiliza os mesmos para o fim a que

nos propuzemos; mas nos foi possível obter membranas cujos limites de porosidade estão compreendidos entre os seguintes valores: 20 my. e 40 my. (milimicra) tanto para sacos de 1 camada de colódio como para os de 2 e 3 camadas respectivamente.

Estes valores foram determinados com solução de hemoglobina a 1% e vermelho Congo na mesma diluição. (Kopaczewski) (2).

As membranas permitem a passagem de hemoglobina e retinham o vermelho Congo.

EXPERIENCIAS

EXPERIENCIA N.º 1.

Com a técnica já descrita montamos 1 balão em cujo saco contendo 5 cc. de caldo semeamos 2 cc. de uma cultura de 24 horas de *B. Coli*.

Semeamos os sacos com 2 cc. de cultura em caldo em pleno desenvolvimento, pretendendo favorecer a passagem de elementos ultra-microscópicos, em virtude de possível presença de princípios líticos na cultura desenvolvida.

Ao cabo de 24 horas não notámos passagem de germens e ao fim de 18 dias de permanência em estufa a 37°, não havendo desenvolvimento de cultura no balão, demos por encerrada a experiência.

EXPERIENCIA N.º 2.

Série de 3 balões em que foram usados sacos com 1, 2 e 3 camadas de colódio, respectivamente para os balões 1, 2 e 3.

Semeados por técnica idêntica à da experiência 1, verificámos a passagem de germens no balão 1 ao fim de 24 horas. Os balões 2 e 3 não apresentaram modificações e ao fim de 4 dias testamos todos os sacos, constatando a perfeita integridade dos mesmos.

RESULTADO

Balão n.º 1 positivo em 24 horas.

Balão n.º 2 e 3 negativos.

EXPERIENCIA N.º 3.

Série de 3 balões com sacos de espessura crescente respectivamente 1, 2 e 3 camadas de colódio, foram semeados pela técnica citada

anteriormente. Perdemos, ao semear, o balão n.º 2, cujo saco tinha duas camadas de colodio.

10 dias após a sementeira verificámos a passagem de germens no balão com saco de 3 camadas, depois de leve agitação.

Ao fim de 17 dias notámos a passagem de germens no balão cujo saco era feito com uma só camada de colodio, tambem depois de ligeira agitação.

Os sacos testados após a experimentação mostraram-se integros.

RESULTADO

Balão n.º 2 prejudicado.

Balão n.º 1 positivo ao fim de 10 dias.

Balão n.º 3 positivo ao fim de 17 dias.

EXPERIENCIA N.º 4.

3 balões com sacos duplos, cujas membranas correspondiam a 1 camada de colodio, foram experimentados do seguinte modo:

No sacco interno foram depositados 2 cc. de caldo recém-semeado com coli.

Depois de uma permanencia na estufa durante 24 horas, notámos passagem de germens do sacco interno para o externo em um dos balões. Não verificámos nada nos outros dois balões ao fim deste tempo.

48 horas depois um outro balão mostrava-nos a passagem de germens do sacco interno para o externo, e 4 dias mais tarde verificámos a passagem de germens do sacco interno para o externo no ultimo balão.

Em dois destes balões houve passagem de germens do sacco externo para o caldo do balão, mas não nos foi possivel determinar a data em que este fenomeno se verificou.

Resultado 2 balões positivos e 1 negativo.

EXPERIENCIA N.º 5.

Série de 7 balões com sacos singelos de 1 camada de colodio.

Semeiados com 2 cc. de uma cultura de 24 horas de B. Coli.

Constatámos a passagem de germens através de membranas de colodio em 4 balões ao cabo de 36 e 48 horas respectivamente para os 2 primeiros balões e ao fim de 5 a 10 dias para os dois ultimos.

Estes balões testados segundo o processo já descrito, nos mostraram a sua perfeita integridade.

RESULTADO

7 balões.

4 positivos e 3 negativos.

RESULTADO GERAL

Balões positivos	13
Balões negativos	7
Balões perdidos	1

CONCLUSÃO

Como podemos verificar pelas nossas experiencias, a passagem de germens é possível através de membranas de colódio dentro dos limites de 20 e 40 my. (milimicra). Esta passagem não se mostrou constante em nossas experiencias.

A passagem se verifica em tempo muito variavel, e só constatámos a mesma quando notámos a turvação do caldo contido no balão, pois, tanto preparações coradas como exames a fresco não mostraram formas microbianas antes de ser percebida a turvação.

A turvação se processa da mesma maneira da que usualmente observamos nos desenvolvimentos normais de culturas.

Uma ligeira agitação dos aparelhos pareceu facilitar a passagem dos germens, sem que, todavia, se pudesse pensar em lesão do saco consequente á agitação, pois que, os tests mostraram a perfeita integridade dos mesmos.

Os elementos capazes de atravessar as membranas de colódio são de dimensões menores do que as moleculas das toxinas diftérica e tetânica, pois, segundo Sanarelli (3) estas ultimas não atravessam membranas de colódio feitas nas condições acima citadas.

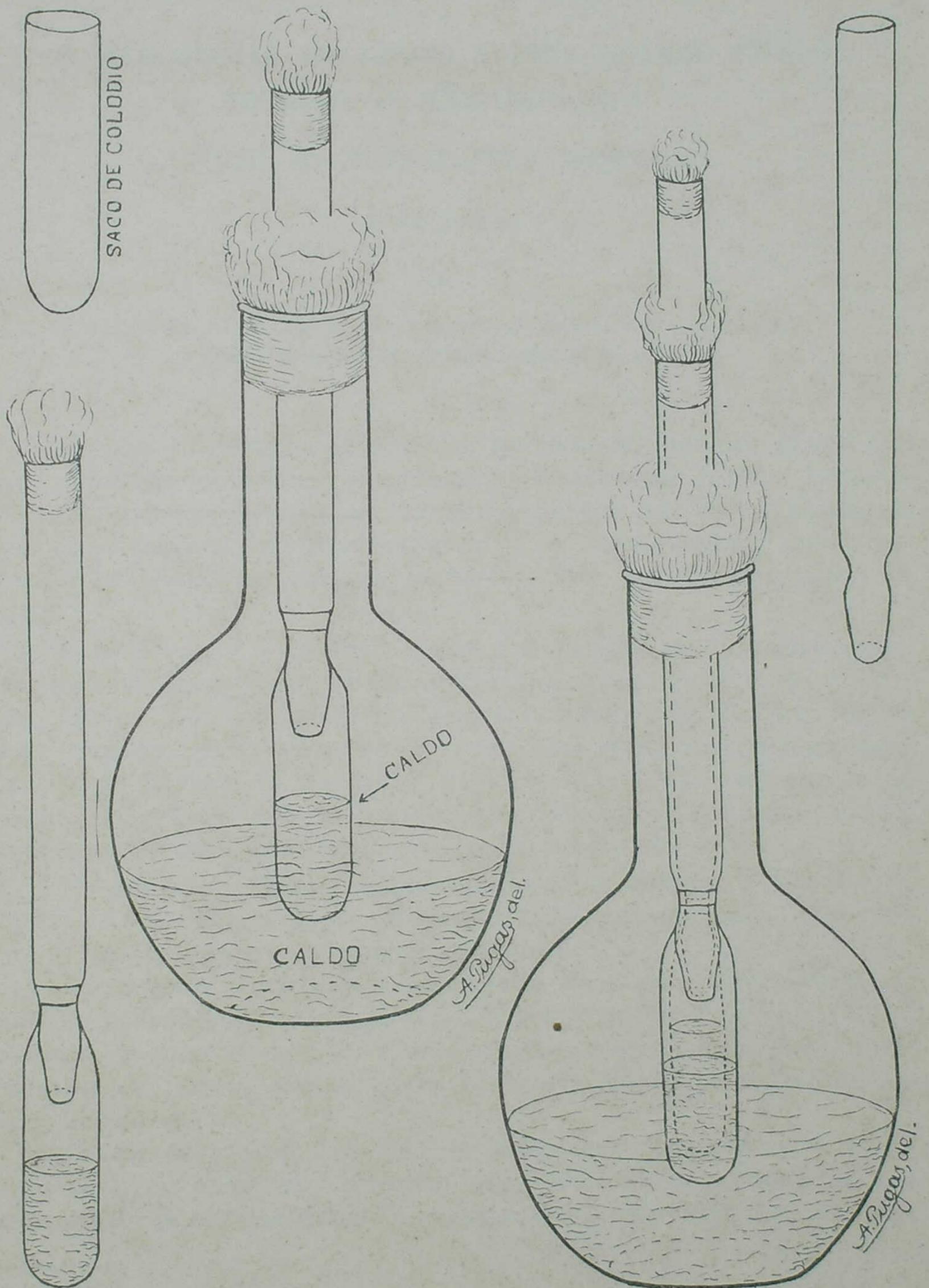
BIBLIOGRAFIA

- 1) SANARELLI, G. & ALESSANDRINI, A.
1932. Studi sull'ultravirus tubercolare. Annali d'Igiene. An. 42, 2 e 3, pp. 65 e 129.

- 2) KOPACZEWSKI
 Traité de Biocolloidologie, **1** (1).
 - 3) SANARELLI, G. & ALESSANDRINI, A.
 1930. *C. R. Soc. Biol.*, **104** : 1241.
 - 4) SANARELLI, G. & ALESSANDRINI, A.
 1931. *C. R. Soc. Biol.*, **107** (18) : 443.
-

Estampa 1

Saco de colodio á esquerda ao alto.
Tubo de vidro á direita ao alto.
Tubo montado á esquerda em baixo.
Balões montados com sacos simples e duplos ao centro.



Ferreira: Germens através de membranas de colódio.