

DOCÊNCIA

Dr. Eduardo L. F. de Araujo

Da opsonisação de germes do genero EBERTHELLA

PELO

BACTERIOPHAGO

(CONTRIBUIÇÃO)

These de Concurso



BAHIA-1927

7
576.8
A663

Dr. Eduardo L. F. de Araujo

*Director do Instituto Oswaldo Cruz da Bahia,
Medico Assistente do Hospital de Isolamento
e Ex-Interno do mesmo Hospital, Assistente
da Cadeira de Anatomia Humana, Bacharel em
Sciencias e Lettras pelo Gymnasio da Bahia.*

Da opsonisação de germes do genero **EBERTHELLA**

PELO

BACTERIOPHAGO

(CONTRIBUIÇÃO)

These de Concurso para a Docencia
Livre da Cadeira de Microbiologia.



BAHIA—1927



MEMORIAL

Cumprindo um dos dispositivos do Regimento interno da Faculdade de Medicina da Bahia, e o que preceitua o art. 135 do Decreto Federal n. 16782 A de 13 de Janeiro de 1925 que exige para a inscrição do candidato a concurso, de "memorial de que conste minudentemente toda a sua vida scientifica, funções que tenha exercido e trabalhos, publicados," apresento em seguida a relação dos cargos que tenho exercido e exerço, bem assim a enumeração de trabalhos de cunho scientifico que tenho publicado.

- 1906 - Bacharel em Sciencias e Letras pelo Gymnasio da Bahia.
- 1909-12 - Interno do Hospital do Isolamento em Mont'Serrat.
- 1912 - Auxiliar de Commissão Sanitaria enviada a Caravelas, para verificação de diphteria.
- 1912 - Doutor em Medicina. Faculdade de Medicina da Bahia.
- 1913 - Medico auxiliar interino do Hospital de Isolamento.
- 1914 - Bacteriologista interno interino do Instituto Bacteriologico, Antirabico e Vaccinogenico.
- 1915 - Preparador interino da Cadeira de Microbiologia (Faculdade de Medicina da Bahia)

IV

- 1916—Chefe da Comissão Sanitária enviada a Joazeiro para averiguação da existencia de peste bubonica.
1923—Assistente interino da Cadeira de Anatomia Humana.
1925—Assistente effectivo da Cadeira de Anatomia Humana.
1926—Viagem a America do Norte para estudos de Microbiologia, Immunologia e Anatomia Pathologica.
1927—Director do Instituto Oswaldo Cruz da Bahia.

Preparador extraordinario da Cadeira de Microbiologia para os cursos de Pharmacia e Odontologia em varios periodos lectivos.

Socio fundador da Sociedade Medica dos Hospitaes da Bahia.

Socio e actual Secretario geral da Sociedade de Medicina da Bahia.

Membro da "The American Electrotherapeutic Association".

Da pesquisa de Anticorpo e de Antigeno no soro dos pestosos. Valor diagnostico. These de Doutoramento. (Approvada com Distincção) 1912.

Determinações cutaneas da peste. Estatistica. Aspecto clinico. Pathogenia. G. Med. da Bahia. Vol. LII, Julho 1921, N. 1.

Localisações extra intestinaes de verminoses (Schistosomum Massoni) (com apresentação de preparados). G. Med. da Bahia e Bul. S. M. dos Hosp. Anno I Out. Nov. n. 3, 172, 1922.

Estudo histopathologico de Nodosidades juxta-articulares. In. These de Concurso do Prof. Dr. Flaviano Silva. 1922, 27 a 29.

Estudo histopathologico da Maduromycose produzida pelo "Indiella Brumpti" n. sp. em These do Dr. Paulo R. Pirajá da Silva 1922, 155 a 159.

PREFACIO

Certo, que ao termos pretendido concorrer á Docencia Livre da Cadeira de Microbiologia, mais de um assumpto foi mirado com interesse e algum eschematisado em suas linhas geraes.

Idéas que se nos affiguravam capazes de serem alicerçadas em processado experimental razoavel, foram abandonadas quando attentavamos nas condições ambientes e nas necessidades previsiveis que iríamos criar.

E dentro das aperturas dessa eleição, de que seríamos unicos responsaveis, o desanimo e a desistencia pretenderam assaltar-nos.

Era mister, então, que o thema escolhido fosse adaptavel ás nossas condições de trabalho, que não estivesse a precisar de vasto recurso bibliographico e que nos permitisse a contribuição minguada que quizemos offerecer á critica dos Mestres.

Resalta, por evidente, a difficuldade que tivemos de adaptar o assumpto a nós mesmos attendendo, de outro lado, aos recursos materiaes de que dispunhamos.

Interessando-nos no estudo do Bacteriophago, um dos pontos em fóco na sciencia contemporanea, campo vasto e fertil que tem sido e ainda vae sendo a cogitações e conjecturas, era natural que a elle nos ativessemos e que alguma das interessantes propriedades por que se revela nos servisse ao intento.

II

Melhor que commentarios previos, os factos expostos adeante e os protocollos que os precedem darão á justa impressão do cuidado que nos mereceu a uniformidade das condições de experiencia e de observação necessarias ao objectivo com as hypotheses estabelecidas.

Assim fazendo, utilisavamos factos adquiridos por outros, é certo, mas, em condições diversas e para fins differentes.

O registo dos factos averiguados por nósahi fica entregue á critica de doutos no que diz respeito á interpretação que acceitamos.

O assumpto parece á primeira vista muito restricto, porem, "*En resumem no hay cuestiones pequeñas: las que lo parecen son cuestiones grandes no comprendidas*"

Sobre histopathologia das Nodosidades de Lutz e Janselme. Em These do Dr. Jayme de Oliveira. 1923, 57 a 63.

Caso de Parasitose Humana pelo *Dipylidium Caninum*. Comunicação á Sociedade de Medicina da Bahia. 1924.

Resumos e commentarios. Peste. A sua fisionomia clinica e o seu tratamento pelo Dr. Salvio Mendonça, Maranhão 1922. G. Med. da Bahia V. LIV, Março 1924, n. 9.

Os corpos eosinophilos de Chalmers e Archibald e a diagnose dos paramycetomas. "Brasil medico" de 10 de Outubro de 1925.

Notas clinicas e bacteriologicas sobre a Febre Typhica na Bahia. (Gazeta Medica da Bahia, Vol. 55, N. 32, Setembro 1924)

Relatorio apresentado ao Dr. Director da Saude Publica. Janeiro de 1927. D. Official.

Relatorios annuaes apresentados ao Dr. Director do Hospital de Isolamento sobre molestias que ali se tratam.



Idéas Geraes

DENTRE os factos recentemente adquiridos e estudados profundamente nenhum sobreleva ao do phenomeno de D'Hérelle ou, como alguns o chamam, phenomeno de Twort-D'Hérelle.

Desde a interpretação do processado de que é consequencia, senão finalidade, a destruição de bacterias, até ás minulencias todas das suas propriedades perfeitamente caracterizadas e já amplamente buscadas e rebuscadas; desde as cogitações theoricas de natureza especulativa e scientifica até ás resultantes praticas hoje mais ou menos corriqueiras a se multiplicarem nas observações publicadas, o PROTOBIOS BACTERIOPHAGUS entrou victorioso nos dominios da experimentação, nos arraiaes da therapeutica e da hygiene.

Dentre as suas propriedades, por extranha e curiosa escolhemos, de preferencia, para estudo o poder opsonisante.

Aqui se affirma o que diziamos linhas acima ao dar uma vista summaria do bacteriophago e das consequencias delle emanadas.

Reportando nos a factos adquiridos sobre os phenomenos da phagocytose e analysando-os de modo breve, tanto quanto permite a especialisação deste trabalho, nós verificamos que foi Metchnikoff, principalmente estudando as phases da digestão intracelular em pequeninos crustaceos da agua doce sujeitos á infecção por Blastomyces ingeridos com os alimentos quem lançou as bases da theoria da immunidadade dita cellular e em que a phagocytose, provavel lucta entrevista por Panum e Roser, entre a bacteria e o phagocyto, devia ser o principal factor.

Com Bordet, estabelecendo e verificando a acção protectora do sôro do homem normal, dos animaes novos ou dos immunisados artificialmente, perquirindo sempre e sempre buscando demonstrar o valor da phagocytose no processado da lucta anti-microbiana, verificou-se que aquella era em funcção de elementos componentes dos liquidos organicos.

Ao interpetrar, porém, os factos observados, analysando-os Metchnikoff abandonou a hypothese da modificação dos germes pelas substancias capazes de fazê-la tornando-os mais facilmente englobaveis pelo phagocyto e se ateu ao proprio leucocyto como elemento activo e unico recebedor do estimulo trazido com a introduccção de principios contidos nos humores e particularmente no sôro do sangue.

Desse modo o grande sabio se acreditou autorizado a concluir como segue: *De tout l'ensemble des faits exposés, on peut tirer la conclusion que la présen-*

vation des lapins non vaccinés, mais traités avec le sérum, est due à une suractivité de la défense phagocytaire... agit en stimulant les phagocytes, en les rendant moins sensibles aux toxines, et en les excitant dans leur lutte contre les bactéries. (1)

Estavam assim creadas as *estimulinas* ou princípios capazes de excitar a capacidade fagocytaria das células em geral e dos leucocytos em particular.

Em 1895, Denys* e Leclef estudando o phenomeno com leucocytos de animaes immunisados ou normaes verificaram que o mesmo dependia menos dos leucocytos que dos sôros ajuntados e que destes os mais activos eram os sôros de individuos especificamente immunisados contra o germe em apreço.

Não vem a pêlo discutir ou mencionar os argumentos e razões que Metchnikoff dava contra o modo de opinar de Denys e Leclef.

Em seguida Leishman (1902) retoma essas pesquisas, já então bem trabalhadas por discipulos de Denys e Leclef, dentre os quaes Marchand que diz claramente: *que la phagocytose dépend de quelque propriété physique du microbe et se trouve par conséquent sous la dépendence des fonctions des leucocytes* (2)

Melhorando a technica, de modo a tornar possível observar o processo da phagocytose com sôro fresco e leucocytos *in vitro* (3) Leishman assignava novo progresso.

Seguem de perto os estudos de Wright e Dou-

(1) Metchnikoff. L'immunité dans les maladies infectieuses, 1901, 327.

(2) Apud Metchnikoff. op. cit. 177

(3) Apud Xisser. Infection and Resistance, 1910, 313

glas e seus colaboradores que, apoiados em amplos estudos e grande numero de factos, pretenderam transportar os informes colhidos para o rol das coisas praticas como precioso subsidio, senão criterio unico, no tratamento especifico das molestias.

Com elles creia-se e adopta-se a denominação de *opsoninas*, cuja raiz grega está a dizer bem alto de como olhavam o phenomeno.

As *opsoninas* modificariam a cellula bacteriana predispondo-a á phagocytose. Tambem esse foi o modo de pensar de Ehrlich e Morgenroth quando dizem que os anticorpos dos sôros antipneumococcicos e antiestreptococcicos não se ligavam aos leucocytos, porém, ás bacterias. (4)

Multiplicam-se as pesquisas. De verificação em verificação, transmudando es pontos de vista e os termos do problema, variando as causas determinantes afim de sabzrem até que ponto o effeito se mantinha integro e uniforme, os estudiosos do assumpto tornavam-no cada vez mais complexo.

Neufeld, como os da sua escola, chega, e assim a maioria dos autores allemães, a dividir as substancias dos sôros capazes de conduzir á phagocytose, em duas classes: *«die Tropine, welche einfach gebaute Stoffe darstellen, die der Mitwirkung eines Komplementes nicht bedürfen und daher auch im inaktivierten Serum erhalten bleiben, und die komplexen Oposone, bei denen ebenso wie bei den Bakterio -*

(4) Kollé e Wassermann. T. II, N. 1, 1913, 402

und Hämolysinen ein Zusammenwirken von Amboceptor und Komplement stattfindet;... (5), ambas, porém, actuando sobre a bactéria.

Quanto às tropinas e às immunopsoninas dos ingleses, diz o mesmo autor, (loc. cit.) que a diferença, de accordo com Gruber e a maior parte dos allemães, tem mesmo importância pratica, pois as primeiras podem se contrapôr ás outras e que, além disso, aquellas não necessitam de complemento, salientando ainda o que acontece segundo Mc Kenzie e Martin, Houston, Ciuca com o liquido cephalo-racheano dos atacados de Meningite, por isso que é pratico differenciar se os anticorpos promotores da phagocytose têm o character de tropinas ou de immunamboceptores opsonisantes.

No caso do sôro antimeningococcico que, via de regra, é injectado na cavidade racheana a introdução de anticorpos que necessitassem de complemento para actuar seria de nenhum proveito, e por isto, do ponto de vista da avaliação do poder curativo deste sôro o que se deve ter em mira é a dosagem das tropinas. Os amboceptores opsonisantes seriam de real valia aonde houvesse complemento livre. (6) Cumpre notar, entretanto, que estas considerações não tomam em apreço o facto da permeabilidade meningeia nestes casos não só ao complemento como a anticorpos específicos.

Assim, dentro das opsoninas de Wright, existentes nos sôros normaes activos, estabeleceram-se

(5) Kolle e Wassermann, op. cit., 409

(6) Kolle e Wassermann op. cit., 442

novos elementos que são compreendidos diferentemente e que se entremostram como possuidores de caracteres menos complexos e mais específicos.

Desse modo me expressei porque os elementos em questão (immunamboceptores opsonisantes, tropinas, opsoninas), embora considerados por Hectoen, Rüdiger e outros como receptores de 2.^a ordem de Ehrlich, não têm a especificidade estreita e constante de receptores da mesma categoria como, por exemplo, as agglutininas,

Emfim, das opsoninas, tropinas e immunopsoninas, o que deve ficar aceito é o facto primordial da influencia que as mesmas têm no sensibilisar os germes, no modificar-lhes a constituição de geito a torná-los presa facil do leucocyto, deixando-se em aberto os pontos referentes á identidade ou multiplicidade, á independencia e ao mecanismo intimo do processado e da sua especificidade relativa.

Respeito ás substancias leucoactivantes foram experimentadas: antisepticos (Manwaring e Rub); quinina, iodeto de potassio, estaphylolysinia (Neisser e Guerrini); quinina (Grünspan); nucleinas do "Deutschmann Serum" (Neisser e Guerrini) e das substancias leucoentorpecentes, alcool e chloroformio (Rubin); ether (Graham); antipyreticos (Kentzler e Benzur); narcoticos (Metchnikoff), de que algumas activariam outras impediriam ou retardariam o phenomeno da phagocytose (7). Iodoformio, camphora, therebentina, alcool, chloral, acidos gordurosos, balsamo do Perú são estimulantes da phagocytose em pequenas doses;

(7) Kolle e Wassermann, op. cit., 432.

o contrario se verificaria em concentrações mais fortes. saes como sulfato de magnésio, carbonato de sodio, chlorêto de calcio diminuiriam a phagocytose em soluto N/8 e em concentrações mais fortes não pareceriam estimular. (8)

As causas determinantes da excitação ou da paralysação leucocytaria por meio dessas substancias são mais facilmente aceitas que as dos outros casos anteriormente encarados, explicando-se o facto pela diminuição da tensão superficial do ectoplasma leucocytario ou, como pensa Hamburger por dissolução do ectoplasma do phagocyto e augmento de sua plasticidade. Hamburger e Hekma determinaram o valor de OH. Hectoen e Rüdiger verificaram que saes como o chloreto de baryo, chloreto de calcio, etc., (9) retardam a phagocytose.

Para Arkin (loc. cit.) as substancias que inibem a oxydação diminuem o poder phagocytario enquanto as que a activam accentuam este poder em determinados casos. Substancias com que esses efeitos não se fizessem sentir de modo notavel eram mais ou menos indifferentes.

E assim muitas outras substancias chimicamente definidas foram estudadas *in vitro et in vivo*.

Demais, as toxinas e as proteínas das bacterias desintegradas são substancias que, em geral, exercem acção activante ou chimiotaxia positiva para com os leucocytos.

(8) Kolmer. Infection, Immunity and Biological Therapy 1925, 130.

(9) Kolmer, op. cit., 130



Extractos de thyreoide, do hypophise e de testiculo injectados a animais e ao homem teriam mostrado a Marbé augmento da capacidade phagocytaria e augmento das opsoninas do soro como a outros (Hartoch e Sirensky), parecendo estar o facto ligado á influencia opsonica e ao accrescimento de complemento (10).

Os ultimos experimentos citados não devem estar incluídos nos do grupo das substancias leucoactivantes não só porque se admite effeito opsonisante, mas, tambem, porque foi verificado augmento de complemento.

Não permittindo, a restricção que viemos nos impondo nesta narrativa porque, certo, de outro modo exorbitariamos do plano do trabalho, maior relato e discussão mais ampla do material accumulado durante muitos annos sobre a acção das opsoninas e das tropinas do ponto de vista scientifico e pratico diremos tão somente, para firmar os pontos de reparo que nos servirão no estudo da propriedade opsonisante do *Protobios bacteriophagus* de D'Hérelle, que são a distinguir: as estimulinas ou substancias leucoactivantes, as opsoninas a Wright e as tropinas a Neufeld.

Tomando por base os caracteres fundamentalmente acceitos para estas substancias existentes nos soros, de logo vem; naturalmente, a pergunta: Como agirá o bacteriophago no exaltar o índice leucocytario? Como estimulina, como opsonina ou como tropina?

De coemço dada a acção do *Protobios bacterio-*

(10) Kole e Wassermann. op. cit., 432.

phagus sobre as bacterias, atacando-as directa e abruptamente, afastaremos a hypothese de estimulante leucocytario ou leucocytivante, cabendo lembrar, entretanto, que, substancias oriundas das proprias cellulas bacterianas desintegradas e dissolvidas no caldo de cultura, possam influir no sentido que lhes deu Metchnikoff.

Quanto ás duas ultimas (opsoninas e tropinas) difficil é assemelhá-las inteiramente, ao que existe na suspensão do bacteriophago, pois que as verdadeiras seriam elementos contidos nos sôros e certo de constituição muito differente daquellas «lysinas secretadas pelo *Protobios bacteriophagus*» de que nos fala D'Hérelle na edição de 1921, ou dos «*principes qui prennent naissance au cours de la bactériophage...*» (11).

Examinemos mais de perto o facto e veremos que o qualificativo de *opsonisante* para a propriedade indiscutida da suspensão do bacteriophago sobre o germe na verificação da phagocytose *in vitro* deve ser tomado no sentido que lhe deu Wright, mais ou menos figurativo, sem identificá-la, porém, com as opsoninas e bacteriotropinas dos soros que, certamente, só se equalam, como determinantes do phenomeno.

Repetimos as experiencias ao pé dos protocolos fornecidos por d'Hérelle na ultima edição do seu livro e pudemos verificar assim, que o nosso proceder permittia comparação segura dos resultados obtidos.

(11) Le Bactériophage et son comportement, 1926, 37

Como será mudamente explanado no capítulo seguinte, procuramos nos collocar de pontos de vista variados afim de nos permittirmos conclusões pessoais e verificações originaes. Tambem lá, parece ser o logar para ir examinando os dados colhidos das experiencias.

Entretanto, embora difficil, qual a explicação a tentar-se para os effeitos opsonisantes obtidos com as suspensões de bacteriophago?

Não sendo estas, como dissemos, em nada comparaveis, do ponto de vista de sua constituição chimica provavel, ás opsoninas e tropinas existentes nos humores e, sem duvida alguma, tambem, por serem fabricadas de modo diverso, porque não contribue a formá-las a complexidade da organização dos metazoarios e porque não são a resposta a excitações subentrantes ou constantemente reproduzidas por processos infecciosos devidos a bacterias e protozoarios determinados, vê-se claramente, que a hypothese a formular esbarra em impecilhos de certo vulto.

Se, por esse lado a differença é patente, por outro lado, refiro-me ao mecanismo de acção, as comparações são faceis e perfeitamente accitaveis.

Não ha duvida que o corpusculo bacteriophago se fixa sobre as bacterias e ha razões que fazem crer, esteiadas pela experimentação bem orientada, que ella é, mais ou menos integral.

D'Hérelle (12) verificou em suspensões de *Eberthella dysenteriae* a 250 milhões por cc. inoculadas

(12) D'Hérelle—op. cit. 91, 92.

com suspensão de bacteriophago anti e nas quaes a numeração de colonias feita immediatamente dava a media de 204 «*plages*» ou 1 milhão de corpusculos bacteriophagos havia, após 30 minutos de incubação, verdadeiro desaparecimento das «*plages*» se nova contagem fosse feita a esse tempo, pois que a media baixava a 5 colonias, ou sejam 125 mil corpusculos. . . . *il est donc certain que les corpuscules qui ont disparu du liquide ont été centrifugés avec les bacilles*, conclue d'Hérelle ainda mais firmemente, ao verificar que nas mesmas condições estabelecidas em tubos testemunhos (caldo esteril + Bacteriophago) a media de «*plages*» se mantinha mais ou menos igual pelas 4 contagens successivamente feitas; não tinha havido neste caso a desapareção momentanea dos corpusculos bacteriophagos introduzidos no caldo.

La fixation du corpuscule bactériophage sur la bactérie sensible constitue donc le premier acte de la bactériophagie, acrescentando, que, «*La fixation est, pour une bactérie, d'autant plus rapide et complète que le Bactériophage est plus active.*» (13)

Janzen e Wolf (14) encurtando o tempo de observação para 15 minutos e usando da filtração em experimentos com duas raças de Bacteriophago anti-typhico chegam a resultados semelhantes.

Kabelik e Kukula (15) dão a prova da afinidade verdadeira chinictaxia positiva (bacteriophago X germe) em dispositivo interessante.

(13) D'Hérelle—op. cit. 93

(14) D'Hérelle—op. cit. 94

(15) Kabelik e Kukula—C. R. S. Biolo, 1925, 92, 1058.

E embora Doerr (16) tenha querido assemelhar o facto ao da fixação dos anticorpos parece-nos não ser o motivo, conforme d'Hérelle explica, mostrando que o phenomeno da agglutinação, por exemplo é essencialmente diverso quando encarado do ponto de vista da saturação em que o poder agglutinante se esgota, desaparecendo do liquido onde havia a diluição do anticorpo agglutinante.

Seja dito de passagem que esse esgotamento do meio consecutivo á fixação do anticorpo, que no caso especial das agglutininas é conhecido com o nome de prova de Castellani e, em certos casos, dissociavel de accordo com as experiencias de Landsteiner e Sturli confirmativas da de Bordet em relação ás hemato-agglutininas.

Hahn e Tromsdorff usando soda diluida puderam libertar o anti-corpo agglutinante absorvido por bacterias. (apud Bordet).

As observações feitas de da Costa Cruz (17 e 18) mostrando a influencia dos electrolytos no phenomeno da bacteriophagia, refutadas por D'Hérelle que adduz, em abono do desaccordo, outras tantas verificações, estabelecem frisante parallelismo com os anticorpos.

Da Costa Cruz conclue do modo seguinte: *O bacteriophago não é de natureza viva; pelas suas propriedades physicas é uma substancia muito semelhante aos anticorpos.*"

Como o ultimo salienta, a importancia do facto é consideravel:

(16) Apud D'Hérelle—op. cit. 95.

(17 e 18) Da Costa Cruz. Bras. Med., 1923, Vol. I, 25, 341 e 3, 201.

Analogas condições demonstrou Bordet serem exigidas para que o phenomeno da agglutinação, tão commum e trivial, se manifeste aos nossos olhos. Além da agglutinina mister se faz a presença de electrolytos e a agglutinação, segundo Bordet, comprehenderia duas phases:

Le premier appartient à la science de l'immunité c'est l'union de l'antigène à l'anticorps c'est la formation d'un complexe, dû à l'intervention des affinités spécifiques. Le second est du domaine de la physico-chimie, c'est la réunion en amas, c'est le phenomène d'agglutination proprement dite. (19)

Com as experiencias, em contradita ás de da Costa Cruz, D'Herelle cita Bratsaert e Ciuca que, procurando explicar a controversia, dizem o facto depender das qualidades do bacteriophago e da reacção do meio. Com pH 7,8 a dissolução se realisaria com todas as raças. (20)

Relacionando, como conclue o pesquisador patricio, com electrolytos presentes no meio, ou não conforme os outros, o facto da bacteriophagia, um ponto parece estabelecido, é que o bacteriophago se liga á bacteria parasitando-a no sentido de D'Hérelle e desaparecendo momentaneamente do vehiculo cultural como ficou referido acima.

Ainda vem de molde citar que varios observadores notaram o poder adsorvente de bacterias mortas e o de substancias de natureza diversa o que

(19) Bordet. Immunité dans les maladies infectieuses, 1920, 295.

(20) Apud D'Hérelle. loc. cit., 60.

não constitue, segundo Hauduroy (21), propriedade especial ao bacteriophago por isso que os outros ultravírus também são adsorvidos.

Admittindo que o bacteriophago tenha as características da micella coloidal de carga electrica negativa (22) como a de muitas bacterias, e que do ponto de vista dos seus elementos constitutivos possa ser entendido como nucleoproteina, não julgamos, por nossa vez descabido, ao contrario razoavel, aceitá-lo como o *Protobios bacteriophagus*. Ainda mais, ficaremos embebidos desse modo de ver se attentarmos em outros caracteres que, como salienta D'Hérelle, formam o criterio da vida: *Le critère de la vie existe: il est constitué par l'ensemble des pouvoirs d'assimilation en milieu hétérogène et d'adaptation, avec leurs corollaires, la faculté de multiplication et la variabilité des caractères* (23).

Em apoio dessa maneira de comprehender devemos lembrar os estudos de Flu (24), que trabalhando com o bacteriophago (raça *DoelenA*), activo contra Coli, Shiga e Yersin verificou factos interessantes que, por sua vez, vêm reforçar as crenças em favor da natureza viva do agente descoberto por D'Hérelle.

O ultravírus, de dimensões reduzidissimas (20 a 30 millimikra D'Hérelle, Wollman, Prausnitz e Bechhold; 1 millimikra Stassano e Beaumont; 2,7 millimikra Levaditi e Nicolau; 5 millimikra Eliava

(21) Hauduroy. Le Bactériophage de D'Hérelle. 1625, 44.

(22) D'Herelle. loc. cit., 261.

(23) " " " 326, 327.

(24) Flu. Sur la nature du Bacteriophage D'Herelle. C. R. S. Biol. 1927, 14, 1148.

e Suarez) (25), capaz de atravessar ultrafiltros de colódio impermeáveis á micella de globulina serica, fixado forte e francamente, nos meios propicios, pelas bacterias sensiveis, actuaria sobre os germes modificando-os e permitindo assim aos leucocytos englobá-los facil, e digamos seguramente, porque é muito provavel que a actividade dos corpusculos de D'Hérelle e a capacidade digestiva do leucocyto se conjuguem para o objectivo que é a destruição do germe apreendido.

A acção opsonisante *in vivo* foi estudada por Sardjito injectando o bacteriophago a coelhos por via subcutanea, resultando disto o augmento do poder phagocytario nestes animaes subir de 100 a 200% (26).

Das nossas experiencias, algumas pretendem discernir entre a acção directa do bacteriophago sobre o germe e aquelloutra de ser «o poder opsonico exercitado, não pelo proprio *Protobios bacteriophagus*, mas, por principios que se originam no decorrer da bacteriophagia, sem que seja possivel precisar de qualquer modo a sua natureza.» (27)

(25) Eliava e Suarez. C. R. S. Biol., 1927, 462

(26) Apud D'Hérelle. loc. cit., 477.

(27) D'Hérelle. loc. cit., 372.





Material e Technica

Hypotheses estudadas e Conclusões

A raça de *Protobios bacteriophagus* utilizada nestas pesquisas foi a isolada por nós das fezes dum doente attingido de dysenteria bacillar, typo Flexner, no momento em que se manifestavam os primeiros signaes de melhora. O numero da suspensão bacteriophagica (3405) corresponde ao do livro de notificações do Instituto Oswaldo Cruz da Bahia e o material foi colhido por gentileza do Dr. Director do Hospital de Isolamento, onde o doente esteve em tratamento. Cumpre notar que até essa occasião o paciente não havia usado a *Bacteriophagina*, preparado posto no commercio pelo Instituto Oswaldo Cruz do Rio. Assim, esta raça deve ser considerada como genuinamente nossa e, certo, pela primeira vez isolada aqui.

Foi mostrada em placas de gelose na Sociedade



de Medicina da Bahia em uma das suas primeiras sessões, no corrente anno.

As fezes que serviam para a cultura e subsequente isolamento do bacteriophago ainda eram sangrentas e muco-purulentas e deve ser dito que, do dia da colheita em diante, a melhora clinica foi rapidamente progressiva e a cura logo se installou.

O primeiro filtrado da cultura em caldo, conforme preceitua D'Hérelle, foi preparado por filtração em terra de infusorios seguida pela passagem em vela Berkfeld.

O producto obtido, experimentado sobre culturas de *E. dysenteriae* (raça de collecção) e de *E. paradyenteriae*, typo Flexner, isolado do doente, mostrou, á leitura ao cabo de 24 horas de incubação, ter actividade igual a + + .

A semeadura em gelose mostrou algumas «plages» características.

Deste modo, verificado estar presente o bacteriophago passamos uma das colonias da placa com o fio de platina para caldo contendo germes do typo Shiga e, tendo se reproduzido o phenomeno da lyse, tentamos exaltar a virulencia por passagem em serie, tomando invariavelmente para a inoculação subsequente o material do tubo em que, com a menor quantidade de filtrado da passagem anterior, houvesse bacteriophagia completa, mantendo-se limpo dentro de 24 horas.

A' sexta passagem fizemos a contagem seguindo o methodo indicado por D'Hérelle, em placas de gelose e obtivemos 132000 milhões por cc.

Daqui por diante todas as repicagens foram feitas

com regularidade em suspensões de *E. dysenteriae* orçando, ao momento de escrevermos, por cerca de 75.

Conseguimos as características de virulência equivalente a++++.

De quando em vez experimentamos sobre culturas dos varios typos de germes dysentericos oriundas de varias fontes, tanto de collecção como recentemente isoladas e, com qualquer dellas, o resultado foi sempre identico, excepção feita para o typo Hiss em que a intensidade se mostrou igual a+++.

Passagens sobre varias amostras de *E. typhi*, *S. paratyphi*, *S. schottmüller*, *S. enteritidis* e *S. morгани* nunca deram lyse apreciavel nem impediram o desenvolvimento destes germes.

Esse o bacteriophago que serviu para as nossas verificações do poder opsonisante.

A technica para a opsonisação seguiu as linhas classicas pelo processo da mistura ao terço da suspensão de bacteriophago filtrado em vela Berkfeld, da suspensão de leucocytos fornecidos pela cobaya (injecção de agua peptonada no peritoneo) e da suspensão de germes (culturas de 18 horas) em agua physiologica. Incubação da mistura a 37° em estufa apropriada, dita de opsonisação, durante 15 minutos; espalhamento em laminas (sempre fizemos duas para cada prova) e coloração pela fuchsina de Ziehl ou pela thionina phenicada, fazendo em grande numero de casos a contraprova.

Miudeando, diremos que as suspensões de bacteriophago usadas provinham da 60ª passagem feita nas 24 horas anteriores á pesquisa (Protocollo A) e filtrada no dia. Para os outros o numero da passa-

gem variou, porem, as condições das experiencias foram mantidas integralmente.

Alem disso, utilizamos o filtrado da terceira passagem, que haviamos guardado em ampolas fechadas á lampada para verificações sobre a conservação da virulencia, de quando em quando, e mantidas ao abrigo da luz, á temperatura ambiente.

Antes, porem, de usarmos este filtrado nas pesquisas de opsonisação praticamos a inoculação de caldo contendo suspensões de *E. dysenteriae* e *E. paradysenteriae*, typo Flexner, tendo sido obtida a lyse da cultura normal dentro das 24 horas, ficando estereis as placas de gelose em que haviamos semeiado a diluição 10.⁻³

Verificamos assim que, com tres meses mais ou menos de guardada, a virulencia da suspensão se havia conservado quase integra. Em dois tubos sobre tres houve cultura secundaria.

Os leucocyts eram obtidos por injeção de agua de peptona no peritoneo da cobaya. A colheita era feita, sacrificando-se o animal mais ou menos 18 horas depois, em soluto de citrato de sodio a 1, 5 % e os leucocyts lavados por centrifugação com a agua physiologica, tão rapidamente quanto possivel, seguindo em suas grandes linhas a technica preconizada por Neufeld (28). Depois de lavados eram usados suspensos em agua physiologica.

Todas essas operações deviam estar realizadas de modo a utilizar os leucocyts antes de decorrida uma hora da extracção.

(28) Kolle e Wassermann. loc. cit., 418 a 420

O caldo usado nas provas testemunhas era o mesmo que nos servia para a cultura do bacteriophago (pH. 7, 8).

As culturas empregadas eram repicadas 18 horas antes da experiência em gelose inclinada, suspensas em agua physiologica a 0,85 % e deixadas em repouso por alguns instantes afim de permittir a sedimentação de pequenos grumos.

A mistura de leucocyto + bacterias + bacteriophago era feita conforme o methodo classico com pipetas capillares a Wright e vidros de relógio esteréis, tomando-se todas as precauções aconselhadas durante as manipulações.

Isso feito, procediamos a incubação durante 15 minutos a 37° na estufa especialmente construida para este fim.

O espalhamento em laminas (sempre fizemos duas para cada prova), a fixação ou pelo alcool methylico ou pelo alcool-ether e depois a coloração com fuchsina phenicada de Ziehl a 1:10 ou com thionina phenicada, nada têm de especial.

Os indices foram calculados com o fim de determinar o valor absoluto a Sauerbeck, isto é, a media de bacterias para cada leucocyto e ao modo de Wright, ou seja, a relação existente entre o indice phagocytario obtido com o sôro humano normal e aquelle fornecido pelo sôro do doente.

No nosso caso, como o testemunha de sôro humano normal activo não podia servir de ponto de referencia, o indice relativo foi feito baseado na cifra fornecida pelo testemunho de caldo esteril.

Não deviamos proceder de outro modo, princi-

palmente porque, se o tivéssemos feito cairíamos no erro grosseiro de comparar coisas heterogêneas.

Entretanto, os testemunhas da acção do soro humano forneceram com os seus valores absolutos, informações claras sobre os resultados do phenomeno.

— Com o fim de termos o ponto de partida para as verificações ulteriores, repetimos, seguindo bem de perto, o protocollo da Experiencia I de D'Hérelle. (29)

São nossas as cifras adiante:

Protocollo A

a) Testemunha:

Leucocyto + Shiga (Mg)* + Caldo esteril
Indice absoluto = 0,85

a) Leucocyto + Shiga (Mg) + Soro humano normal fresco
Indice absoluto = 3,58

b) Leucocyto + Shiga (Mg) + Bacteriophago 3405 (filtrado no dia)
Indice absoluto = 8,90
* relativo = 10,40

c) Leucocyto + Shiga (Mg) + Bacteriophago 3405 (3 meses)
Indice absoluto = 6,30
« relativo = 7,00

(29) D'Hérelle. loc. cit., 371.

(*)—(Mg) (P. D. O.), (I. O. C.) são convenções que servem para indicar as amostras de cultura de *E. dysenteriae* usadas.

- d) Leucocytos + Shiga (P. D. O.) + Bacteriophago 3405 (filtrado no dia)
 Índice absoluto = 7,65
 » relativo = 9,00
- e) Leucocytos + Shiga (P. D. O.) + Bacteriophago 3405 (3 menses)
 Índice absoluto = 7,28
 » relativo = 8,50
- f) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago 3405 (filtrado no dia)
 (Accidente de manipulação inutilizou este ensaio)
- g) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago 3405 (3 menses)
 Índice absoluto = 8,16
 » relativo = 9,60

Os valores obtidos com o filtrado do dia posto a actuar em as provas b) e d) com amostras diferentes mostram correlação notavel entre si.

Nas verificações procedidas com o bacteriophago filtrado, havia 3 menses, em semelhantes condições, os índices variaram pouco.

O testemunha de sôro humano normal forneceu o índice absoluto relativamente alto, mas, é mister lembrar que Wright (30) distinguindo e classificando as bacterias em grupos conforme o modo de se comportarem em face dos sôros bactericidas e das opsoninas, formou quatro grupos e dentre elles estão os germes dysentericos como muito susceptiveis à opsonisação. Por isso tambem, repetimos, não

(30) Apud Lustig, Mal. inf. d. uomo e d. anim 1913, 297.

serviria a cifra registada na prova *a*¹⁾ do protocollo A para confronto com os resultados obtidos sem a intervenção do sôro.

Se reunirmos os Algarismos obtidos nas varias provas com o filtrado do dia e com o filtrado de tres menses obteremos as medias seguintes, representativas dos indices opsonicos absoluto e relativo que resumirão as resultantes geraes para o Protocollo acima:

b), d) Índice absoluto 8,27

» relativo 9,70

c), e), g) » absoluto 7,24

» relativo 8,30

Para as duas primeiras os indices são representados pela contagem de 200 leucocytos e para as outras pela contagem feita em 300.

Nada que estranhar em termos reunido aquelles Algarismos, maximé em se tratando de amostra de *E. dysenteriae* que, como se sabe, é uma especie absolutamente homogenea em face do *Protobios bacteriophagus*.

Protocollo B

a) Testemunha:

Leucocytos + Flexner (Mg) + Caldo esteril

Índice absoluto = 0,92

a¹⁾ Lencocytos + Flexner (Mg) + Sôro humano normal fresco

Índice absoluto = 3,80

- b) Leucocytos + Flexner (Mg) + Bacteriophago
3405, (filtrado no dia)
Indice absoluto = 9,26
» relativo = 10,60
- c) Leucocytos + Flexner (Mg) + Bacteriophago
3405 (3 menses)
Indice absoluto = 6,85
» relativo = 7,40
- d) Leucocytos + Flexner (3215) + Bacterio-
phago 3405 (filtrado no dia)
Indice absoluto = 7,40
» relativo = 7,90
- e) Leucocytos + Flexner (3215) + Bacterio-
phago 3405 (3 menses)
Indice absoluto = 2,84
» relativo = 3,08

Caberiam aqui os mesmos commentarios feitos acerca das provas effectuadas com *E. dysenteriae*.

Como medias nós temos:

b), d),	Indice absoluto	8,30
	» relativo	9,25
c), e,	» absoluto	4,84
	» relativo	5,24

Foram contados os germes de 200 leucocytos para ambos os grupos.

Ainda aqui o indice obtido com o soro normal se mostrou bem elevado, mais alto mesmo que aquelle estabelecido para a letra e).

Cumpre tambem lembrar que o bacteriophago empregado provinha de um caso de dysenteria determinado por *E. paradysenteriae*, typo Flexner, e

que havia sido inoculado em successivas passagens a *E. dysenteriae*.

Devíamos esperar encontrar, o que aliás não se deu, valores perfeitamente comparaveis áquelles do protocollo A. As razões do facto escapam e qualquer commentario ficaria inevitavelmente no terreno das hypotheses, pois que, ambas as experiencias foram feitas no mesmo dia, com o mesmo filtrado e com os leucocyts do mesmo animal.

Protocollo C

a) Testemunha:

Leucocyts + Hiss (D) + Caldo esteril
Indice absoluto = 1,96

a') Leucocyts + Hiss (D) + Soro humano normal fresco
Indice absoluto = 2,02

b) Leucocyts + Hiss (D) + Bacteriophago (filtrado no dia)
Indice absoluto = 6,72
» relativo = 3,40

c) Leucocyts + Hiss (D) + Bacteriophago (3405) (3 meses)
Indice absoluto = 3,21
» relativo = 1,60

d) Leucocyts + Hiss (Mg) + Bacteriophago (3405) (3 meses)
Indice absoluto = 3,97
» relativo = 2,00

Aqui os indices, se comparados ao do testemunha a) não mostram differença sensível.

A cifra assignalada para o soro humano não apresenta diferença de vulto.

Só o índice absoluto registado em b) é evidentemente elevado.

Como media para a contagem feita, temos:

b) Índice absoluto = 6,72

Índice relativo = 3,40

Se bem que a acção opsonisante se tenha feito sentir embora fraca e sem dar margem para afirmações cathegóricas, ella o foi muito menos nitida que para os casos anteriormente relacionados.

Tambem não achamos que a menor virulencia da raça do bacteriophago em foco (+++) para *Eberthella paradysenteriae*, typo Hiss, possa servir como explicativa.

Protocollo D

a) Testemunha:

Leucocyto + Strong (Mg) + Caldo esteril

Índice absoluto = 1,04

a¹⁾ Leucocyto + Strong (Mg) + Soro humano normal fresco

Índice absoluto = 9,49

b) Leucocyto + Strong (Mg) + Bacteriophago (filtrado no dia)

Índice absoluto = 8,23

» relativo = 7,22

c) Leucocyto + Strong (Mg) + Bacteriophago (3 meses)

Índice absoluto = 7,76

» relativo = 6,80

Da analyse deste protocollo resalte evidente a alta dos indices obtido (com o bacteriophago em b) e c), entretanto, a pesquisa com o soro humano deu cifra muito baixa, o que se patenteia ainda mais, não só pondo-a de confronto com as outras cifras da mesma serie de provas, mas, tambem, em relação com as percentagens obtidas, em condições de experimentação identicas dos protocollos anteriores e levadas a cabo com outros representantes do grupo dos dysentericos.

Protocollo E

a) Testemunha:

Leucocyto + Eberth (11Mg) + Caldo esteril
Indice absoluto = 0,98

a') Leucocyto + Eberth (11Mg) + Soro humano normal fresco
Indice absoluto = 2,96

b) Leucocyto + Eberth (11Mg) + Bacteriophago (3405)
(filtrado no dia)
Indice absoluto = 1,84
» relativo = 1,87

c) Leucocyto + Eberth (11Mg) + Bacteriophago (3405) (3 meses)
Indice absoluto = 1,32
» relativo = 1,30

Constituido o grupo typico propriamente dito, isto é, o de *E. typhi* de especies heterogeneas em face do bacteriophago e por isso mesmo, ainda mais distanciadas do grupo dysenterico, o facto não nos surprehendeu reaffirmado os resultados registados

por D'Hérelle para com *E. typhi* (31), quando experimentado com bacteriophago anti-Shiga. A nossa raça não mostrou capacidade lytica em nenhum grau para com o germe de Ebert, mesmo após varias e successivas passagens.

Demais, este protocollo parece mostrar indirectamente, como o mostram os valores apresentados por Eliava e D'Hérelle, que a acção do bacteriophago se faz sentir, do ponto de vista da capacidade opsonisante, em parallelismo mais ou menos evidente com a actividade lytica do ultravirus em face de uma bacteria dada.

Protocollo F

a) Testemunha:

Leucocytos + Shiga (Mg) + Caldo esteril
Indice absoluto = 0,80

a¹⁾ Leucocytos + Shiga (Mg) Bacteriophago (filtrado no dia)
Indice absoluto = 5,65
Indice relativo = 7,62

b) Leucocytos + Shiga (Mg) + Sobrenadante de cultura de bacteriophago × Shiga de 20 minutos centrifugada.
Indice absoluto = 3,35
Indice relativo = 4,10

c) Leucocytos + Deposito de centrifugação do b) + Agua physiologica
Indice absoluto = 6,89
Indice relativo = 8,06

(31) D'Hérelle, loc. cit., 373.

- d) Leucocytos + Shiga (Mg) + Sobrenadante de cultura de bacteriophago \times Shiga de 40 minutos centrifugada.
 Índice absoluto = 1,26
 Índice relativo = 1,50
- e) Leucocytos + Deposito da centrifugação de d) + Agua physiologica
 Índice absoluto = 1,34
 Índice relativo = 1,67
- f) Leucocytos + Shiga (Mg) + Sobrenadante de cultura de Bacteriophago \times Shiga de 1 hora centrifugada
 Índice absoluto = 2,04
 Índice relativo = 2,55
- g) Leucocytos + Deposito da centrifugação de f) + Agua physiologica
 Índice absoluto = 4,72
 Índice relativo = 5,90

Este protocollo merece commentario mais demorado do que os outros, embora as cifras fornecidas não sejam a ponto de permittir conclusões absolutistas.

O indice relativo foi feito em comparação com a), embora nós tivéssemos usado em c), e) e g) de agua physiologica a 0,85% em vez de caldo esteril, como devêra ter sido para maior rigor.

Entretanto não cremos que a agua physiologica tenha grandemente influido nos resultados em um dos dois sentidos e arrastado as consequencias para longe das que teriamos de consignar no caso do caldo esteril.

Por isso é que aceitamos calcular os valores relativos do modo por que o fizemos.

Se compararmos as cifras absolutas de *b)* *d)* e *f)* entre si verificaremos o facto do indice menor em *d)* e *f)*.

De accordo com as experiencias já mencionadas de D'Hérelle e de outros sobre a desaparição momentanea dos corpusculos bacteriophagos nós iriamos a concluir que é justamente quando, usando sempre da terminologia daquelle auctor, o corpusculo bacteriophago se fixa á bacteria que o indice absoluto do caldo, que serve como meio de cultura, se acha mais baixo.

A contraprova foi feita em *c)*, *e)* e *g)* em que puzemos os germes atacados pelo *Protobios bacteriophagus* em face dos phagocytos.

Para isso punhamos a centrifugar a cultura inoculada com o bacteriophago e o deposito, constituido por germes que haviam estado de mistura com a suspensão de virus D'Hérelle, era lavado uma vez com agua physiologica a 0,85% e suspenso em volume do mesmo vehiculo que permittisse diluição conveniente para as pesquisas em mira.

Então a technica da mistura seguia os mesmos passos que para os outros experimentos.

Se, comparando os indices absolutos de *b)* e *e)* nós tivemos a satisfação de notar que o indice baixava no primeiro e era mais alto para o segundo, nós encontramos em *d)* e *e)* cifras quase identicas, tão proximas que não autorisam concluir.

De outro lado em *f)* e *g)*, isto é, com uma hora de incubação, vislumbra-se alguma differença entre os respectivos indices absolutos.

Se agora compararmos as cifras absolutas *b)*, *d)*, e *f)* com a semelhante registada em *a')*, experimento

realizado com leucocytes do mesmo animal, teremos que a diferença para menos se mostra do modo seguinte:

Índices absolutos
 para *b*) = 2,30
 para *d*) = 4,39
 para *f*) = 3,61

Estabelecendo os mesmos calculos para os indices relativos, teremos as cifras a seguir:

para *b*) = 3,52
 para *d*) = 6,12
 para *f*) = 5,07

Ainda comparando as cifras absolutas e relativas de *c*), *e*), e *g*), ás de *a*¹), verificaremos:

	Índices absolutos	Índices relativos
para <i>c</i>)	0,73	—
para <i>e</i>)	6,28	5,95
para <i>g</i>)	2,90	1,72

O indice relativo de *c*) é maior de 0,44 que o respectivo de *a*¹).

Do que ali fica resulta que, excepta a ultima, em todas as demais provas as cifras reunidas no protocollo F são inferiores ás dos indices padrão estabelecidos em *a*¹) da mesma serie.

E aqui vem de molde, lembrando palavras do capitulo anterior, pôr de relevo a investigação que fizemos sobre o mecanismo do processado opsonisante, da causa determinante mais provavel da subida dos indices phagocytarios, quando postos de mistura *in vitro*, leucocytes + germes sensiveis + bacteriophago.

Pareceu-nos, de principio, e essa a hypothese que serviu de ponto de partida para as provas realisadas e registadas no protocollo F, que fosse possivel por ahi verificar se, coincidindo com o desaparecimento mais ou menos fugaz do bacteriophago do meio que serve de vehiculo á cultura, havia differença sensivel do poder opsonisante quando comparados, em dado momento, o liquido sobrenadante e o deposito de bacterias sensiveis obtido por centrifugação rapida e lavado em agua physiologica.

Dos nossos experimentos esperavamos poder deixar perfeitamente firmado que a acção opsonisadora das suspensões de bacteriophago se faz por via directa sobre a bacteria sensivel, atacando-a, enfraquecendo-a e deste geito predispondo-a para ser apreendida facilmente pelos phagocytos. Isso, embora não tenha ficado nitidamente demonstrado, parece-nos ser, em parte, expresso pelas cifras acima reunidas

Ademais, por outro lado, separando, como que por analyse, os factores concorrentes, isto é, os productos oriundos da dispersão das nucleo-proteinas bacterianas, os productos do metabolismo e a propria micella bacteriophagica poderiamos aquilatar da influencia que os mesmos estivessem a desenvolver. Essa parte, que ficou assignalada em *b*), *d*) e *f*), é muito mais clara que a outra e seria de franca evidencia se não tivessemos termos de comparação em *c*), *e*) e *g*) a mostrarem divergencia quando assim considerados.

Infelizmente, não é possivel excluir dos liquidos que servem de vehiculo ao bacteriophago a complexidade chimica que, certamente, deste ou daquelle

modo, é influente decidida e regular dos elementos postos em jogo no caso vertente.

Entretanto, pensamos que, nas condições estabelecidas, o experimento exclue, em maxima parte, se não elimina, os factores existentes no caldo de cultura sejam elles os que preexistem á multiplicação das bacterias, á cultura symbiotica, aos productos de secreção do proprio bacteriophago ou os que resultaram da lyse bacteriana, porque é de julgar que, dentro do prazo de meia hora não tenha havido tempo para se formarem, pelo menos em abundancia, substancias oriundas do metabolismo normal ou consequentes á acção bacteriophagica. O prazo admittido para a divisão bacteriana orça por cerca de meia hora e a acção lytica do virus de D'Hérelle nunca, ao que nos consta, se fez sentir dentro do mesmo tempo.

Sendo assim, os valores obtidos para os indices absoluto e relativo, embora não sendo traduzidos por cifras que, até certo ponto, o raciocinio permittia esperar, (porque algumas não são bem frisantes) pateiteiam certa differença no tocante á acção do bacteriophago quando participante do phenomeno da opsonisação, e que elle a exerce de modo directo sobre o germe, comtanto que este seja sensivel.

Aliás vem de molde lembrar Rosenthal (32) que, ao mostrar as semelhanças entre a funcção esporogénica e o bacteriophago, diz: *D'ailleurs, le Bactériophage (Bruynoghe e Maisin) subit la phagocytose aussi bien que les spores.*

Se assim é, se o bacteriophago é de si mesmo facilmente englobavel pelos leucocytos e se elle pa-

(32) Rosenthal. C. R. S. Biol., 1926, 612, 613.

rasita a bacteria susceptivel, dois factores, então, se sommariam para contribuir na alta dos indices observados.

Na serie de experiencias a seguir, tivemos em mira pôr de novo em relevo este facto, engenhando methodo differente.

Protocollo G

a) Testemunha:

Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Caldo esteril

Indice absoluto = 1,08

a¹) Testemunha:

Leucocytos + Hiss (D) + Caldo esteril

Indice absoluto = 1,32

b) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago (filtrado no dia)

Indice absoluto = 5,05

» relativo = 4,67

c) Leucocytos + Hiss (D) + Bacteriophago (filtrado no dia)

Indice absoluto = 6,31

» relativo = 4,78

d) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago (precipitado)

Indice absoluto = 1,18

» relativo = 1,09

e) Leucocytos + Hiss (D) + Bacteriophago (precipitado)

Indice absoluto = 1,76

» relativo = 1,33

Com as experiencias enumeradas no Protocollo G tivemos em fito verificar se o bacteriophago precipitado segundo o processo usado por Kabeshima (33) e redissolvido seria capaz de determinar variação do indice phagocytario.

Para isso procedemos do modo seguinte: O filtrado do dia foi precipitado por tres partes de acetona e deixado em repouso até o dia immediato quando decantamos o sobrenadante, evaporamos a acetona ao calor brando (45°) até quase seccura do precipitado.

A este juntamos quantidade de agua physiologica, igual ao volume inicial do caldo precipitado, para dissolver o residuo obtido.

Obtivemos dissolução parcial, por isso que o liquido, ligeiramente leitoso, ainda continha alguns grumos bem visiveis e que não puderam ser dissolvidos.

Os experimentos foram feitos com a parte sobrenadante de leve leitosa e que, posto o tubo durante alguns minutos em repouso, se conservava homogeneamente turva.

Como para os outros Protocollos estabelecemos testemunhas que podessem servir de pontos de reparo para as avaliações respectivas.

Da analyse dos dados colhidos, verificamos que em d) e e) os indices, tanto o absoluto como o relativo, cahiram ás proximidades da unidade, a correr parellas, quer no caso de *E. dysenteriae* como no caso de *E. paradysenteriae*, typo Hiss, com os testemunhas a) e a') de caldo esteril.

(33) Kabeshima. C. R. S. Biol., 1920, 219.

Se, por outro lado, confrontarmos esses dados com aquelles de *b*) e *c*) notarmos grande differença em favor dos ultimos, cujos indices se approximam daquelles registados em os protoccollos anteriores.

Como se vê o exito da pesquisa foi diverso do que esperavamos e, sem maiores commentarios ficaria registado, se provas de outra natureza não tivessem permittido verificar outro facto que virá tornar comprehendidos e explicados os algarismos correspondentes a *d*) e *e*).

O facto a que nos reportamos é o seguinte: O soluto obtido da precipitação do bacteriophago foi inoculado a culturas normaes em caldo de *E. dysenteriae* e de *E. paradysenteriae*, typo Hiss e, a leitura, após 24 horas, mal permittia discernir entre os reactivos e os tubos testemunhas. O bacteriophago (3405) entretanto, produzia o clareamento do caldo, antes de precipitado pela acetona, em cerca de 8 horas.

Ora, depois de tratado pelo methodo de Kabeshima só á sexta passagem é que começamos de obter a lyse total do caldo de cultura em 24 horas com desenvolvimento secundario em quase todos os tubos.

Averiguado desse geito que o bacteriophago subsistira conservado no liquido empregado para as provas do Protocollo G, será razoavel admittir que aquelles indices baixos correspondam exactamente á diminuição da virulencia ou do numero de corpusculos.

Com a mesma ordem de idéas assentadas anteriormente parece justo vêr aqui a influencia, aliás

por prova indirecta, de que é capaz o bacteriophago em face de bacterias sensiveis. E' então uma prova negativa que vem confirmar as catalogadas nos Protocollos antecedentes.

Protocollo H

a) Testemunha:

Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Caldo esteril

Indice absoluto = 1,26

b) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago (filtrado no dia e diluido a 1/10)

Indice absoluto = 4,82

" relativo = 3,90

c) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago (filtrado no dia e diluido a 1/100)

Indice absoluto = 1,45

" relativo = 1,15

d) Leucocytos + Shiga (I. O. C.) + Bacteriophago (filtrado no dia e diluido a 1/200)

Indice absoluto = 0,99

" relativo = 0,78

Nestes experimentos os resultados mostram que com as diluições o bacteriophago perdeu rapidamente o poder opsonisante, conforme D'Hérelle e Eliava haviam demonstrado anteriormente.

Tambem aqui a falta de actividade verificada poderá ser attribuida á rarefação de corpusculos no vehiculo.

Conclusões

- 1—As bacterias soffrem por parte do bacteriophago anti acção inteiramente comparavel á das substancias opsonisantes;
- 2—O bacteriophago empregado mostrou possuir força opsonisadora muito mais energica e efficiente contra as bacterias mais sensiveis;
- 3—Tambem agora as especies *dysenteriae* e *parady-senteriae* se apresentaram como perfeitamente homogeneas respeito á acção do bacteriophago;
- 4—As tentativas feitas para provar que a acção se faz directamente sobre as bacterias sensiveis permittem concluir favoravelmente, embora as cifras devessem ter sido mais expressivas;
- 5—Os experimentos effectuados com o precipitado acetico redissolvido foram negativos do ponto de vista do poder opsonisante;
- 6—De tudo parece resultar evidentemente que o bacteriophago, actuando de modo semelhante ás opsoninas, seja o agente modificador das bacterias e assim a causa primordial do augmento dos indices absoluto e relativo;
- 7—A diluição da suspensão de bacteriophagos perde rapidamente o poder opsonisante;
- 8—O filtrado conservado á temperatura ambiente 3 meses mostrou capacidade opsonisadora comparavel á do filtrado fresco.