

Formas desde simples granulo isolado a cocos, coco-bacilos, bacilos com granulações polares e centrais e filamentosas finamente granuladas.

Figs. 9-21 — Bacilo coli.

Fig. 9 — Amostra recentemente isolada de fezes em um cazo de enterite.

Colônia de 6 horas em geloze distendida sobre lamina, fixada e corada pelo MAY-GRUNWALD e supercorada pelo GIEMSA.

Formas bacilares mostrando nitidamente a substancia cromatica condensada nos polos e no centro sob a forma de granulos volumozos e deixando ver o citoplasma da célula. Observadas essas formas em pequenos grupos, nota-se certa relação de paralelismo entre as granulações. O fundo da colônia claro com a tonalidade rozea do meio de cultura.

Figs. 10-11 — Outros campos do preparado, mostrando diversas formas da bacteria, desde poeira granular, granulações isoladas, cocos até a forma de bastonetes com a substancia cromatica nitidamente granulosa ou sem diferenciação apreciavel.

Figs. 12-14 — Cultura obtida em geloze distendida sobre lamina. Observação a fresco 4 horas apoz a sementeira. Estufa a 37° C.

Bacilos com pontos refrinjeentes polares e centrais. Em algumas formas não se vê diferenciação apreciavel. Em outras formas nota-se estreita relação entre os pontos refrinjeentes polares de uns e outros bacilos. Uma ou outra forma mostra um pontô refrinjeente parecendo a ela apenas.

Fig. 15 — Preparado por impressão. Fixação pelo subli-

mado-alcool. Coloração pela hematoxilina-ferrica HEIDENHAIN. Mesma cultura. Formas em bastonete sem diferenciação apreciavel.

Figs. 16-17 — Mesmo preparado.

Formas mostrando nitidamente algumas delas a condensação da substancia cromatica sob a forma de granulos no interior dos bacilos e outras mostrando granulações exteriores ao corpo bacilar parecendo derivar dele.

Uma ou outra granulação isolada.

Figs. 18-19 — Mesmo preparado.

Poeira granular e bacilos com granulações apensas.

Fig. 20 — Mesma cultura. Coloração pelo azul de metileno sem coloração.

Disposição dos bacilos em colônia.

Fig. 21 — Fragmento de colônia corado pelo azul de metileno sem fixação e observado em suspensão no liquido corrente.

Formas mostrando intima relação entre as granulações do corpo de um bacilo e as de outro.

Fig. 22 — B. difterico. Coloração pelo NEISSER. Contrôle das culturas de difterico.

Fig. 23 — B. dizenterico. Tipo SHIGA. Cultura em geloze distendida sobre lamina fixada e corada pelo MAY-GRUNWALD e supercorada pelo GIEMSA.

Colônia de 12 horas.

Disposição dos bacilo sem colônia.

Nota: deixo de apresentar as figuras relativas aos outros preparados de bacilos dizentericos por nada apresentarem de interesse, que fosse diferente do que se observou com o coli.

SOBRE A FORMA FILTRAVEL DA TUBERCULOZE (1)

Sr. Presidente.
Minhas senhoras.
Meus senhores.

O Sr. Prof. KRAUS teve a bondade de convidar-me para trazer ao conhecimento desta sociedade as investigações que orientei no estudo da "Tuberculoze" e que me conduziram á crença na existencia de uma faze filtrante do virus.

Estes rezultados, por se afastarem das noções classicas admitidas, difficilmente serão reconhecidos como exatos.

Entretanto, como derivaram da experimentação, tenho-os como certos e espero ve-los confirmados por todos.

Para ser claro na exposição, devo remontar ao inicio das minhas pesquisas, demonstrando assim que as idéas, por mim hoje admitidas, se orjtinaram de fatos experimentais e deles decorreram como concluzões forçadas.

Historico

Os trabalhos de METALNIKOFF, sobre a infecção da Galleria melonella pelo bacilo de KOCH, traziam novas esperanças á soroterapia antituberculoza. A verificação que esse autor havia feito da destruição do bacilo no interior do tubo dijestivo daquele inseto em consequencia da saponificação das ceras e gorduras do corpo

bacilar, permitia supor ser possivel, por qualquer artificio de tecnica, obter a reabsorção dos bacilos de KOCH, e assim ser conseguida a produção de anticorpos especificos aproveitaveis em soroterapia.

Meu saudozo Mestre, OSWALDO CRUZ, orientára então seus primeiros estudos em caminho paralelo, investigando a reabsorção das gorduras vejetais e animais, por via linfatica.

Em 1906 incumbiu-me do estudo dos problemas concernentes á "Tuberculoze" no Instituto que havia fundado.

Tive como meu primeiro cuidado o estudo da natureza quimica do corpo bacilar, e desse estudo rezultou a noção da complexidade da estrutura do bastonete, em cujo interior, fortemente granuloso, havia granulações de vario tamanho que, a meu ver, representavam papel importante e essencial na biologia da bacteria.

O metodo de coloração que por essa ocasião propuzera para o diagnostico diferencial microscopico entre o bacilo de KOCH e os pseudo-tuberculozos, prestava-se magnificamente ao estudo da estrutura do bastonete, revelando no interior dele granulações intensamente coraveis pelo GRAM, variaveis em tamanho, em colocação, mesmo em forma, e que por sua constancia me davam a certeza de serem necessarias ao metabolismo da bacteria.

Dai a idéa de proceder no seu estudo citologico. Com esse objeto, servi-me de diversos metodos de coloração, da observa-

ção a fresco, e, em meu cado em 1910 nas *Memor Oswaldo Cruz*, eu concluia *lações do bacilo da tuberculoides por substancias de tica, e que FIZIOLOGICAMENTE MORFOLOJICAMENTE* (1) acompanhar as fazes do de divizão da granulação *elas o mesmo papel dos rjeticos na reprodução dos*

Afirmava eu então: a mente o papel das granulas na tuberculoze, é analc conidios dos cogumelos; e zos trata-se do elemento g nismo primitivo; no cazo I cilo da tuberculoze elas oi ções menores que se col por delgados filamentos, c um esboço de organizaçã A identificação com o m melos não poude, contudo não se observar a formaçã ter sido possivel accompan intimo da organizaçã gra

O estudo da infecção t trava ainda pelos trabalho los meus, contemporanean a forma granular deveria lizada pela natureza infec ria em estudo; deveria el verdadeiro *virus tubercul* então como forma de de lar, como demonstrara p mento lipolitico existente culozo, contemporaneamen investigações de BERGEL e granulação deveria ainda zada como o elemento ge netes, mais tarde cara acido-alcool-rezistencia.

Para verificar biolojio cepção que o estudo mo cilo me havia sujerido, t sario obter as granulações bacilos acido-rezistentes, e desse material realizar a in

Para esse fim tomei c cubicos de puz de gangli cobaia, infectada com baci mana e dilui em vinte cer de agua fiziolojica.

Procedi á filtração em modelo NORDMEYER, á pro trompa dagua. Empreguei viamente experimentadas luida em agua fiziolojica sarcina lutea e colera gall mostraram desta sorte

(1) Conferencia realizada na *Wiener Gesellschaft für Mikrobiologie*, em sessão de 22 de junho de 1926.

ção a fresco, e, em meu trabalho publicado em 1910 nas *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, eu concluía: *que as granulações do bacilo da tuberculose são constituídas por substancias de natureza cromática, e que FIZIOLOGICAMENTE e não MORFOLOGICAMENTE* (porque não pude acompanhar as fazes do processo intimo de divizão da granulação), *representam elas o mesmo papel dos nucleos polienergeticos na reprodução dos protozoarios.*

Afirmava eu então: ainda fisiologicamente o papel das granulações reprodutoras na tuberculose, é analogo ao papel dos conidios dos cogumelos; em ambos os casos trata-se do elemento gerador do organismo primitivo; no cazo particular do bacilo da tuberculose elas orijnam granulações menores que se conservam ligadas por delgados filamentos, como si houvesse um esboço de organização de micelio. A identificação com o micelio dos cogumelos não pode, contudo, ser feita, por não se observar a formação de septos, nem ter sido possível acompanhar o fenomeno intimo da organização granular.

O estudo da infecção tuberculosa mostrava ainda pelos trabalhos de MUCH e pelos meus, contemporaneamente feitos, que a forma granular deveria ser responsabilizada pela natureza infectuosa da bacteria em estudo; deveria ela representar o verdadeiro *virus tuberculoso*. Considerada então como forma de desagregação bacilar, como demonstrara pela ação do fermento lipolitico existente no puz tuberculoso, contemporaneamente ainda com as investigações de BERGEL e de FIESSINGER, a granulação deveria ainda ser responsabilizada como o elemento gerador dos bastonetes, mais tarde caracterizaveis pela acido-alcool-rezistencia.

Para verificar biologicamente a concepção que o estudo morfologico do bacilo me havia sujerido, tornava-se necessario obter as granulações separadas dos bacilos acido-rezistentes, e pela inoculação desse material realizar a infecção do animal.

Para esse fim tomei cinco centimetros cubicos de puz de ganglio cazeificado de cobaia, infectada com bacilo de orijem humana e dilui em vinte centimetros cubicos de agua fisiologica.

Procedi á filtração em vela BERKEFELD, modelo NORDMEYER, á pressão de 760 em trompa dagua. Empreguei trez velas, previamente experimentadas com emulsão diluida em agua fisiologica do vibrio-colera, sarcina lutea e colera gallinarum e que se mostraram desta sorte impermeaveis á

passagem desses germens, por verificação em culturas.

O liquido obtido pela filtração da emulsão do puz tuberculoso foi dividido em duas porções eguais: uma foi centrifugada e o sedimento obtido mostrou em preparado microscopico corado pelo metodo de GRAM a existencia de granulações e de detritos de bacilos que não eram revelados pelo ZIEHL, acido azotico ao terço.

A outra porção foi inoculada sob a pele de uma cobaia. *Não se formou cancro no ponto de inoculação*; o material inoculado tinha se reabsorvido todo sem reação aparente quando, 15 dias apoz á inoculação, *começou a esboçar-se sinal de reação ganglionar que se traduzia por aumento de volume e endurecimento dos ganglios inguinais correspondentes ao ponto onde fôra praticada a inoculação.*

O animal, sacrificado um mez depois, mostrou por autopsia ganglios inguinais aumentados de volume, duros e hiperemiados. Os *frottis* feitos com esse material não mostraram a existencia de bacilos da tuberculose; encontravam-se somente granulações incluídas nos linfocitos, reconheciveis por serem GRAM positivas. O baço aumentado de volume e conjesto, mostrou, por cortes, infiltração linfocitaria, hemorragias intersticiais, presença de granulações incluídas em celulas embrionarias e auzencia de bacilos.

Uma quarta parte do baço desse animal foi finamente dividida e emulsionada em agua fisiologica, e inoculada sob a pele de uma outra cobaia. Oito dias depois formou-se um nodulo duro no ponto da inoculação; permanecendo ainda um mez depois e havendo pequeno aumento de volume dos ganglios da rejião correspondente, foram essas duas lezões retiradas para biopsia.

Examinadas por cortes em serie não mostraram reação tuberculosa; de anormal nelas só se encontrou pigmento hematico.

Essa cobaia conservou-se com saude aparente durante cinco mezes, prazo durante o qual ela permaneceu em observação. Ao cabo desse tempo foi sacrificada. A autopsia não mostrava alteração macroscopica dos orgams, a não ser diminutos focos hiperemiaveis na baze do pulmão e pequeno aumento de volume do baço. Foram retirados fragmentos dos ganglios, baço e pulmões para exame microscopico.

Os cortes dos ganglios e pulmões mostraram bacilos da tuberculose em numero muito pequeno, caracterizaveis pela hema-

toxilina e pelo ZIEHL, acido azotico ao terço, e pelo ZIEHL-GRAM (alcohol acetona ao terço)."

Não se observou reação tuberculoza constituida nitidamente. Observou-se somente grande infiltração linfocitaria.

A analize deste fato experimental conduz a observações interessantes. Durante cinco mezes o animal não reagiu por nenhum sinal macroscopico. Não houve constituição de cancro no ponto de inoculação, não houve formação de puz no interior dos ganglios, o volume destes era normal. Nada indicava haver bacilos nos ganglios, nem nas vicerias. O exame dos orgams desse animal, por cortes, mostrou, entretanto que *nessa cobaia que viveu durante cinco mezes, sem sinal de molestia, sem reação alguma que fizesse presumir tuberculose e que sendo sacrificada não mostrou lezão mais notavel que a infiltração linfocitaria, encontravam-se em seus ganglios e pulmões bacilos acido-rezistentes com as características morfolojicas e tintoriais do bacilo de KOCH.*

Conclui eu então que, tratando-se de um animal sensível á tuberculose como a cobaia, esses fatos indicavam que no homem, em que os cazos de tuberculose latente são previstos pela clinica, a noção de terreno tuberculizavel deveria ser substituida pela noção de terreno com tuberculose em potencial.

Essas experiencias tinham para mim bastante importancia, conduzindo-me por uma via de experimentação inteiramente nova, para que eu pudesse abandona-la. Tratei pois de repeti-las. Em uma nova serie de seis animais, empregando não mais o puz cazezo de cobaia mas o puz proveniente de um escarro cavernoso, somente em um animal que viveu seis mezes em apparencia de saude, sacrificando-o ao cabo desse tempo, encontrei bacilos nos pulmões, caracterizaveis em córtes desses orgams. Todas as pesquisas feitas nos outros animais foram negativas. Repeti novamente a experimentação sem que pudesse obter novos resultados positivos.

Naceu então a duvida no meu espirito sobre a exatidão da tecnica seguida, apesar do rigor que eu havia empregado na experimentação e que me deveria assegurar a veracidade de minhas concluzões. Apresentei esses trabalhos então ao Congresso de Tuberculose reunido em Roma em abril de 1912 e por minha volta ao Brazil razões de ordem diversa orientaram minha atividade na investigação de outros problemas.

Estado atual da questão

Em 1912 PHILIBERT retoma as minhas experiencias. Utilizando-se de 10 amostras de puz provenientes de lezões diversas (coxalja, tumor branco, ganglios etc.) verifica que todas elas apresentam bacilos, umas por exame direto, outras apoz homojenização. Certifica-se da virulencia desse material inoculando cobaias que morrem todas com tuberculose generalizada. Filtra o material em experiencia com grandes dificuldades. A inoculação do filtrado em cobaias não determina um só cazo de tuberculose, salvo em um animal, no qual PHILIBERT acredita ter sido possivel uma contaminação accidental, ou que o filtro utilizado tenha sido permeavel á passagem dos bacilos. PHILIBERT, em rezumo, contesta as minhas experiencias.

Passaram-se 12 anos apoz as minhas verificações sem que o assunto tenha despertado maior atenção. Em maio de 1922, VAUDREMER que vinha ha tempos procedendo ao estudo do desenvolvimento do bacilo da tuberculose em meios pobres, em artigo no jornal *La Médecine*, e em sessões da *Sociedade de Biologia* (9 de junho e 22 de dezembro de 1923), assinalou a possibilidade da passagem atravez a vela CHAMBERLAND L³, de formas atipicas não acido-rezistentes.

O filtrato semeado em PÉTROFF dava origem a colonias de bacilos acido-rezistentes ao cabo de oito dias. VAUDREMER conclue que o bacilo da tuberculose possui formas filtrantes.

BEZAÇON e HAUDUROÏ retomam os estudos de VAUDREMER e confirmam-nos inteiramente. BEZAÇON e PHILIBERT assinam a mesma concluzão.

PLA y ARMENGOL filtrando uma emulsão de puz tuberculoso em vela BERKEFELD, inoculando a parte que não atravessa o filtro, obtem uma tuberculose tipica com bacilos de KOCH, e inoculando a porção que atravessa a vela obtem lezões atipicas, sem bacilos que reinoculadas, porem, determinam a evolução de uma tuberculose tipica, com bacilos acido-rezistentes.

ARLOING, DUFORT e MALARTE obteem ainda resultados positivos filtrando culturas de bacilos de KOCH, recentemente isolados. ARLOING e DUFORT renovam suas experiencias utilizando-se não mais de culturas e sim de lezões tuberculozas, em cazos de tuberculose infantil (gommas, ganglios, liquido celafo-raqueano de meningite, puz de piotorax). Em 30 ensaios conseguiram obter 16 vezes filtratos que in-

fectavam as cobaias. Esficados apoz trez mezes zentado cancro no ponto ganglios correspondentes mentados de volume, as sãs. Os ganglios traqueovicaes normais ou lever dos. O exame histolojico zões, mas o suco dos ganilos acido-alcool-reziste tipicos.

Estas constatações cormente com as verificações feito em 1910.

Em abril de 1923, C. VALTIS o encargo de r experiencias. Assim se dois autores em trabalho "Les éléments virulents cille tuberculeux".

"Nous avons d'abord c les éléments filtrables du en nous adressant à de culeux autolysés à l'autodant trois jours, selon le par F. BEZAÇON, MATH Dans de tels autolysats, constaté l'existence de n lations. Celles-ci, accumu de centrifugation, étaient l'eau physiologique stér travers un filtre CHAM l'imperméabilité aux micr blement contrôlée.

Dans ces filtrats, de leurs culots de cent n'avons pu découvrir au ble. Leur ensémenement le milieu à l'œuf de BES et sur pomme de terre, I est resté constamment st

Cependant ces mêmes sous la peau du cobaye 10 cc. ont déterminé, d'experiences, des phéno dont voici une bref desc

Les ganglions voisins se tuméfièrent légèrement 15ème jour, puis seml normaux. La plupart des mouraient entre le 3ème A leur autopsie on ne tr sion ganglionaire, mais lymphatique, et surtout chéobronchiques, étaient trophiés. Quelques anim de petits foyers d'hép naire. Ceux-ci et les ga contenaient toujours de

fectavam as cobaias. Esses animais sacrificados apoz trez mezes não haviam apresentado cancro no ponto de inoculação; os ganglios correspondentes não estavam aumentados de volume, as vicerias pareciam sãs. Os ganglios traqueo-bronquicos e cervicais normais ou levemente hipertrofiados. O exame histológico não mostrou lesões, mas o suco dos ganglios mostrou bacilos acido-alcool-rezistentes tuberculozos tipicos.

Estas constatações concordam absolutamente com as verificações que eu havia feito em 1910.

Em abril de 1923, CALMETTE confia a VALTIS o encargo de repetir as minhas experiencias. Assim se exprimem esses dois autores em trabalho ainda inedito "Les éléments virulents filtrables du bacille tuberculeux".

"Nous avons d'abord cherché à obtenir les éléments filtrables du bacille de KOCH en nous adressant à des crachats tuberculeux autolysés à l'autoclave à 38° pendant trois jours, selon le procédé indiqué par F. BEZANÇON, MATHIEU et PHILIBERT. Dans de tels autolysats, nous avons déjà constaté l'existence de nombreuses granulations. Celles-ci, accumulées dans le culot de centrifugation, étaient émulsionnées dans l'eau physiologique stérile et passées à travers un filtre CHAMBERLAND L² dont l'imperméabilité aux microbes était préalablement contrôlée.

Dans ces filtrats, de même que dans leurs culots de centrifugation, nous n'avons pu découvrir aucun élément visible. Leur ensémençement sur PÉTROFF, sur le milieu à l'œuf de BESREDKA et JUPILLE et sur pomme de terre, bouillon glyceriné, est resté constamment stérile.

Cependant ces mêmes filtrats, inoculés sous la peau du cobaye à la dose de 5 à 10 cc. ont déterminé, dans trois séries d'experiences, des phénomènes identiques dont voici une bref description:

Les ganglions voisins du point inoculé se tuméfiaient légèrement du 10ème au 15ème jour, puis semblaient redevenir normaux. La plupart des cobayes injectés mouraient entre le 3ème et le 4ème mois. A leur autopsie on ne trouvait aucune lésion ganglionnaire, mais tout le système lymphatique, et surtout les ganglions trachéo-bronchiques, étaient un peu hypertrophiés. Quelques animaux présentaient de petits foyers d'hépatisation pulmonaire. Ceux-ci et les ganglions tuméfiés contenaient toujours des bacilles acido-

résistants caractéristiques, en petits amas et rares. Il fallait les rechercher longuement.

Dans une autre série d'experiences nous avons encore pu mettre en évidence des éléments filtrables dans le pus d'un ganglion mésentérique caséux d'un singe mort de tuberculose. Le filtrat de ce pus, comme celui des produits d'expéctoration étudiés précédemment, ne renfermait aucune granulation visible à l'examen microscopique du culot de centrifugation, et son ensémençement sur les divers milieux, est toujours resté stérile.

Inoculé sous la peau des cobayes, il a déterminé des lésions analogues à celles produites par le filtrat de crachats autolysés et en plus, de petits tubercules pulmonaires typiques, contenant des bacilles.

Après nous DURAND et VAUDREMER, puis DURAND, inoculant dans le péritoine d'un cobaye le filtrat sur bougie L³ d'un pus tuberculeux d'origine humaine, ont trouvé chez cet animal, quatre mois plus tard, des lésions tuberculeuses contenant des bacilles.

Enfin, dans une troisième série d'experiences, nous avons filtré des cultures en milieux glycerinés, agées de trois à huit semaines et nous en avons obtenu des filtrats ne contenant aucune granulation visible au microscope, aucun germe cultivable, mais qui, inoculé aux cobayes, produisaient constamment des lésions analogues à celles que nous avons précédemment décrites.

Les faits enoncés en 1910 par FONTES se trouvaient donc pleinement confirmés et nos experiences avaient permis d'établir que les filtrats de cultures de crachats et de pus tuberculeux renferment des éléments qui, quoique invisibles et non cultivables dans les milieux que nous avons utilisés, sont virulents et tuberculigènes."

Esses mesmos autores levam adiante a sua experimentação. Com BOUQUET e NEGRE conseguem a infecção de ganglios traqueo-bronquicos e do *carrefour* hepatico de fetos de cobaias injectadas em periodo de gestação, sob a pele com produtos filtrados de natureza tuberculosa. Resultados semelhantes foram obtidos tambem por ARLOING e DUFORT.

E' de notar que nenhum desses experimentadores obteve culturas com o material filtrado, á exceção de VAUDREMER, BEZANÇON e HAUDUROY.

DURAND e CHARCHASKI obteem a infecção de uma cobaia com 1 cc. de um filtrado de exsudato pleural tuberculoso, por via subcutanea. Trez semanas depois o ani-

mal sendo sacrificado mostrou uma linfadenite com bacilos de tuberculose.

VANUCCI estudando si com os produtos tuberculosos, nos quais a pesquisa do bacilo pelo exame microscópico fôra negativo, mas em que a prova biológica havia sido positiva, seria possível obter ainda a prova biológica apoz filtração do material através vela BERKEFELD LILIPUT W, em trez cazos sobre 10, obteve com o filtrado injetado no peritoneo de cobaias um quadro anatomo-patológico experimental completo de tuberculose, o que fez com que esse autor admitisse uma forma filtravel do bacilo de KOCH.

VEBER demonstrou que em um derrame de pneumotorax artificial rico em bacilos, filtrado em vela CHAMBERLAND e inoculado em uma cobaia, podia determinar uma tuberculose experimental caracterizada pela ausencia de ulcera de inoculação e pela presença de notavel tumefacção dos ganglios traqueo-bronquicos nos quais demonstrou a presença de bacilos de KOCH.

VERDIÑA, em magnifico trabalho, fortemente documentado, refere que filtrando material tuberculoso de diversas proveniências (puz, excreta, culturas e bacilo de KOCH) em repetidos exames obteve resultados positivos, os quais o autorizam a concluir pela existencia de uma forma filtrante ultra-microscópica para o virus tuberculoso.

VASILIU e IRIMINOIU filtram culturas de tuberculose dezinvolvidas em meio de PÉTROFF, obtidas por sementeira de escarros. As cobaias inoculadas com o produto da filtração mostram bacilos nos ganglios abdominais.

Os mesmos resultados obteem com produtos tuberculosos humanos. Experimentando em um cazo de linfogranulomatose obteem material filtrante que, passando através a vela L 3 e inoculado sob a pele e no peritoneo de cobaias, determinou ao cabo de dois mezes uma hipertrofia ganglionar traqueo-bronquica e abdominal, com a presença de bacilos acido-rezistentes característicos.

Das experiencias contrarias eu só tenho conhecimento exato das que foram feitas aqui em Viena por FESSLER e das feitas por MONTEMARTINI.

FESSLER, em seu esplendido trabalho, feito com um notavel espirito científico, conclue pela negatividade das experiencias de VAUDREMER e de seus colaboradores.

MONTEMARTINI, experimentando em 86 cobaias, contesta as experiencias de VANUCCI e considera os pequenos focos necroticos no tecido sub-cutaneo, nos ganglios e no baço como devidos á ação dos produtos toxicos tuberculosos.

Crítica

Até aqui os fatos experimentais. Proccedamos agora á sua critica.

Do que expuz resulta o conhecimento de diversos fenomenos de ordem biológica verdadeiramente notaveis e que demandam um estudo aprofundado para á sua completa elucidacção.

1.º E' possível separando em uma cultura tuberculosa, *in vitro* ou *in vivo*, as formas bacilares acido-rezistentes das formas granulares, obter com estas a reproducção do bacilo com as suas características classicas?

Penso ter dado resposta com a experimentação que aprezeitei em 1910. A verificação de bacilos acido-alcool-rezistentes em animais infectados em serie com material tuberculoso filtrado, não deixa duvida de que as granulações sejam organismos geradores de bacilos. Considerarei-as mesmo como *unidade vital infectante*. A experimentação posterior de todos os autores acima citados e que confirmam o meu modo de ver demonstra ainda que o virus tuberculoso é um *virus filtravel*.

2.º As formas geradoras do bacilo serão as formas granulares viziveis (granulos de MUCH, granulações de FONTES, *splitter* de SPENGLER), ou serão elementos inviziveis não revelaveis sinão por culturas posteriores, ou por inoculações em animais sensiveis?

Até 1922 acreditava eu serem as formas granulares viziveis as unicas capazes de rejenerarem o bastonete acido rezistente. Observações posteriores feitas com o bacteriofago em culturas de coli e de dizenteria, levaram-me ao estudo dessas bacterias, por considerar já então o fenomeno observado com a tuberculose como fenomeno de ordem geral, ligado ao grande capitulo dos ultra-virus. Do estudo a que então procedi e o qual referirei no final da minha conferencia, estabeleceu-se-me a segurança de que em todas as bacterias ha uma fase ultra-vizivel e, por consequencia, filtravel ligada ao ciclo da vida desses micro-organismos. E' essa aliaz a corrente na-

tural do pensamento de quem dedicado a esses est confirmado as minhas in

3.º A inoculação de filtrado tuberculoso pode deprender a sensibilidade do germen e ser sensivel sem determinantes?

As minhas experiencias de VALTI, as de FOURT respondem a esta

4.º Porque motivo não se observa a infecção experim quando se emprega infectante o virus fi

E' uma questão de que se acreditava eu em 1910 que a possibilidade de uma infecção se atenuava por p os filtros. Ainda hoje p neira com algumas res As experiencias de VALTI a possibilidade de uma ir zada põe em cheque o meu primeiro modo de j entretanto ainda *que na vizivel ou na fase invizive gredo do material vacinan essa idéa baseado na obs em que os cazos de tuberc tuberculose local, mostran tencia á evolução da infec visceral ou generalizada.*

5.º O aparecimento de f acido-alcool rezistent experimentados corri defeito de tecnica, pe tuberculose espontan mais, ou de fato rep mento de uma for que se apresenta adulto já conhecido?

Não posso compreender tão variados pesquisadores erros de tecnica e de obst trabalhando em laboratoric orientações diferentes em chegam a conclusões ident riencias contrarias como feitas com tecnica rigore conclusões positivas obtida autores.

Acredito que por força d quer cauza que nos esc explicar essa contradicção rente. E' fato por todos mesmo naqueles virus filtri versalmente admitidos nen

tural do pensamento daqueles que se tem dedicado a esses estudos e que tem confirmado as minhas investigações.

3.º A inoculação de filtrados de natureza tuberculosa pode determinar a presença do germen em um organismo sensível sem determinar lesões aparentes?

As minhas experiências, as de VAUDREMER, as de VALTIS, as de ARLOING e DUFOUR respondem a esta duvida.

4.º Porque motivo não se obtém sempre a infecção experimental classica, quando se emprega como material infectante o virus filtrado?

É uma questão de difícil resposta. Acreditava eu em 1910 que o material virulento se atenuava por passagem através os filtros. Ainda hoje penso dessa maneira com algumas restrições, porém. As experiências de VALTIS demonstrando a possibilidade de uma infecção generalizada põe em cheque o absolutismo do meu primeiro modo de pensar. Acredito entretanto ainda que *na forma granular vizível ou na fase invisível se acha o segredo do material vacinante*. Sou levado a essa idéa baseado na observação clinica, em que os casos de tuberculose latente, de tuberculose local, mostram grande resistência á evolução da infecção sob a forma visceral ou generalizada.

5.º O aparecimento de formas bacilares acido-alcool resistentes nos animais experimentados corre por conta de defeito de tecnica, pela existencia de tuberculose espontanea nesses animais, ou de fato representa o crescimento de uma forma microbiana que se apresenta em seu aspeto adulto já conhecido?

Não posso compreender como tantos e tão variados pesquisadores incidam em erros de tecnica e de observação, quando trabalhando em laboratorios diversos, com orientações diferentes em suas pesquisas chegam a conclusões identicas. E as experiências contrarias como as de FESSLER, feitas com tecnica rigorosa, contrariam conclusões positivas obtidas pelos outros autores.

Acredito que por força deva haver qualquer cauza que nos escape que possa explicar essa contradição para mim aparente. É fato por todos conhecido que mesmo naqueles virus filtraveis hoje universalmente admitidos nem todas as veri-

ficações são positivas. E mesmo em tuberculose, nas mãos de todos os experimentadores incluzive nas minhas proprias, as experiencias positivas alternam com experiencias negativas.

Ha uma incognita que precisa ser elucidada. Cuidar-se-á da falha do determinismo experimental nas condições conhecidas relativas quer ás velas filtrantes, quer á pressão ou, o que para mim é mais provavel, haverá necessidade de se surpreender a *faze filtrante* em periodo desconhecido do ciclo da vida desses organismos?

Faze ultra-microscopica integrante do ciclo vital das bacterias

Dos estudos que eu havia feito sobre a forma granular do virus tuberculoso reconhecendo o papel preponderante das granulações na citologia do bacilo, e ainda e principalmente reconhecendo a possibilidade de produzir a presença de bacilos no organismo da cobaia, utilizando-me de material obtido por filtração do puz tuberculoso através um filtro de porcelana porosa, resultou-me a noção de *ser a forma granular um fenomeno geral na biologia das bacterias*. Retomei então em 1922 estes estudos e das observações feitas com o bacilo difterico, com o bacilo coli e com os dizentericos em trabalho publicado em 1925 eu concluia pela presença da forma granular nessas bacterias *em uma faze vizível verificada morfolojicamente e na existencia de uma faze invisível presentida no desenvolvimento das colonias*.

Escrevi então:

"Acredito, pois, que no ciclo da vida das bacterias se passe uma faze ultra-microscopica, não revelavel pelos atuais metodos de investigação."

A razão prevê a realidade de tal faze. Sabe-se que a transplantação de qualquer germen a novo meio de cultura determina, até que se estabeleça a adaptação dos elementos transplantados ás novas condições de vida, a lize de grande numero deles. Esta lize produz a libertação da substancia cromidial sobre a superficie do meio. Em faze mais adiantada a observação de preparados corados que confirmam as observações dos preparados feitos sem fixação, mostrou-me nas colonias em gelose, zonas de cultura onde os elementos morfolojicos se organizam no seio de substancia finamente pulverulenta, mas que pode ser reconhecida pela

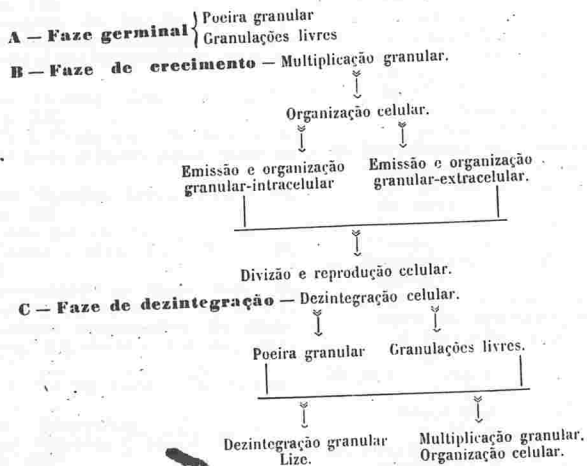
tecnicamente usual. Concluiu eu ainda no estudo do fenómeno de HERELLE que em relação á célula lizada "desde que os fermentos dissociadores autolíticos, ou exojenicos não rompem o equilibrio intragranular, uma nova morfojenez permite a reconstrução do elemento figurado." Cheguei assim ás seguintes conclusões gerais:

1.º As granulações cromidiais que compõem a célula bacteriana são individualmente capazes de reproduzir a espécie.

2.º A forma que caracteriza a bactéria na sistemática microbiológica representa uma fase de evolução da substância viva, que corresponde a um organismo complexo.

3.º A forma granular representa no ciclo da vida das bactérias uma fase asseguradora da perpetuidade da espécie.

4.º As bactérias apresentam um ciclo de vida que pode ser compreendido em sinopse nas seguintes fases de actividade nuclear:



Um pouco de teoria

Vemos assim sob um aspecto esquemático relativamente simples toda a complexidade do ciclo da vida desses micro-organismos. A poeira granular por sua extrema pequenez atinge a um limite ótimo da vizibilidade, confundindo-se com a matéria viva em estado coloidal. Nesse estado essas partículas de vida melhor se denunciam por seus efeitos que por suas massas.

Na energia vital das células os fermentos desintegrantes ajem concomitantemente com os fermentos organizadores, e nem de outro modo pode ser compreendido o metabolismo nutritivo. Ora esses atos, quer digam respeito á desintegração da matéria, quer á sua organização, são representados objetivamente pela forma granular, última representação morfica da matéria viva.

Como dissociar o ato bio-químico da representação morfica si ambos se confundem no turbilhão dos mols pelas reações coloidais, na síntese ou desintegração da matéria viva pelas ações fermentativas que se apoiam na imaterialidade da catalize.

A noção dos virus se aproxima assim da noção dos fermentos e das toxinas.

A separação das células das partículas da vida que as constituem e que pode ser obtida empiricamente por meio de filtros, conduz-nos ao estudo dos ultra-virus.

Nestes a divisibilidade da matéria viva atinge a limites que vão muito além da nossa compreensão, e por vezes vemos que a virulência se acha ligada á extrema divisão da matéria viva como sucede com o fenómeno descrito por NICOLLE na infecção experimental produzida pelos espiroquetas da febre recorrente.

A literatura da protozoologia de indícios desta natureza. O imunologista se abre em novas ligações. Na própria infecção já o genio de BEHRING havia *Restbacillus* ou TC "um ajen um grande numero de qualidades ordinarias".

Este agente exerce no bac de substancias formativas. possui qualidades fermentativas cataliticas. Este fixar de um modo eletivo, por tras substancias (fenomeno de minou adsorção); ainda mais condições, possui qualidades ras. Em uma palavra, representa substancia que VON BEHRING papel preponderante na imunitando que exercia uma ação no interior das células orgânicas dos elementos celulares.

BI

1. Vacinação e soroterapia Teze (1903).
2. Tratamento da tuberculose lina T. O. A. *Brazil-Medico* — Ano : nas 399 e 411 (1907)
3. Sobre a existência nos ganhos de uma substancia causadora dos bacilos da tuberculose. *Brazil-Medico* — 1908, p. 391.
4. Diagnostico microscopico de tres bacillos da tuberculose acidoresistentes. *Brazil-Medico* — 1908, p. 401.
5. Untersuchungen ueber die Charaktere der Tuberkelbacillen und Wachstumsarten, und ueber die Säureresistenz, die Virulenz und die Eigenschaften der Tuberkelbacillen. *Tuberkelbacille Central bl. Bakt. Orig.* n. 3, p. 317.
6. A propos de la communication de HAWTHORN sur les "Bacilles émulsionnés dans la glycérine émulsionnés sur le cobaye." *C. R. Soc. Biologie* — 1
7. Ueber eine in den Tuberkulose druesen vorhandene toetende Substanz. *Central bl. Bakt. Orig.* —

A literatura da protozoologia está cheia de indícios desta natureza. O capítulo da imunologia se abre em novos caminhos que devem ser perustrados nestas investigações. Na própria infecção tuberculosa é o genio de BEHRING havia previsto no *Restibacillus* ou TC "um agente dotado de um grande numero de qualidades extraordinarias".

Este agente exerce no bacilo a função de substancias *formativas*. Alem disto possui qualidades fermentativas e especialmente cataliticas. Este agente pode fixar de um modo eletivo, por contato, outras substancias (fenomeno que se denominou adsorção); ainda mais, em certas condições, possui qualidades assimiladoras. Em uma palavra, representa o principio, quazi vital, dos bacilos. Era a esta substancia que VON BEHRING atribuia o papel preponderante na imunização, acreditando que exercia uma ação simbiotica no interior das celulas organicas, em particular dos elementos celulares que deri-

vam dos centros germinativos do tecido linfatico.

Assim eu penso que a forma granular vizivel, só ou acompanhada da fase invizivel, por não podermos separa-la com inteira segurança, pelos atuais metodos de investigação, é a forma do virus que a observação clinica e experimental mostra ser aquela, que se apresenta com *virulencia atenuada* nas lezões especificas, ou aumentada na infecção dos organismos sensiveis, não permitindo o estabelecimento dessas lezões por ocasionarem a morte somatica antes que a reação de defeza celular se produza.

A forma acido-alcool-rezistente do bacilo de KOCH é um epifenomeno no curso da evolução do parazita.

A forma granular vizivel e a fase invizivel representam o elemento virulento.

EU ACREDITO QUE A INCOGNITA DA IMUNIZAÇÃO REZIDA NO ENTRETENIMENTO DA FORMA GRANULAR COMO FORMA ATENUADA DO VIRUS.

BIBLIOGRAFIA DE A. FONTES

TRABALHOS ORIJINAIS

1. Vacinação e soroterapia antipestosas — Teze (1903).
2. Tratamento da tuberculose pela Tuberculina T. O. A.
Brazil-Medico — Ano 21, n. 41, paginas 399 e 411 (1907).
3. Sobre a existencia nos ganglios tuberculosos de uma substancia capaz de destruir os bacilos da tuberculose. Nota preliminar.
Brazil-Medico — 1908, Ano 22, n. 40, p. 391.
4. Diagnostico microscopico diferencial entre os bacillos da tuberculose e os outros acido-resistentes.
Brazil-Medico — 1908, Ano 22, n. 41, p. 401.
5. Untersuchungen ueb, die chemische Natur der den Tuberkelbacillen eigenen Fett- und Wacharten, und ueb das Phänomen der Säureresistenz. Differentialdiagnose der Tuberkel- und Pseudotuberkelbacillen. Tuberkelbacillengranulationen.
Central bl. Bakt. Orig. — Bd. 49, 1909, n. 3, pj. 317.
6. A propos de la communication de M. Ed. HAWTHORN sur les "Bacilles de KOCH" en émulsion dans la glycérine. Effets de ces émulsions sur le cobaye.
C. R. Soc. Biologie — 1909, t. 66, n. 15.
7. Ueb eine in den tuberkuloesem Lymphdruesen vorhandene Tuberkelbacillentoetende Substanz.
Central bl. Bakt. Orig. — 1909, Bd. 50, p. 78.
8. Estudos sobre a tuberculose.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1909, t. I, n. 1, pp. 51 e 68.
9. Relatorio ao D. G. S. P. sobre o aparelho Clayton — 1906.
10. Relatorio sobre a analyse de aguas do Maranhão — 1906.
11. Algumas considerações sobre a infecção tuberculosa e o seu respectivo virus.
Mm. Inst. Oswaldo Cruz — T. II, n. 1, pp. 141-6.
12. Estudos sobre tuberculose.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1910, t. II, n. 2, pp. 186-205.
13. Estudos sobre tuberculose.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1911, t. III, n. 2, p. 195.
14. Sobre a applicação do bi-iodureto de cobre em therapeutica (Indicações desse sal nas infecções de natureza mycosica e especialmente na tuberculose). (Nota prévia).
Brazil-Medico — 1912, ano 26, n. 31, p. 317.
15. Comunicação apresentada ao Congresso Internacional contra a Tuberculose, reunido em Roma sobre a influencia dos extractos de ganglios tuberculosos sobre a morphologia do bacillo de Koch e sobre a evolução da respectiva infecção. 1912, abril (Premiado com diploma de honra).

16. Sobre um novo methodo de homogeneisação de escarros.
Brazil-Medico — 1913, ano 27, n. 22, p. 213.
17. Sobre o bi-iodureto de cobre. Ensaio de pharmacodynamica.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1913, t. V, n. 3, p. 239.
18. Therapeutica da tuberculose.
Archivos Bras. de Med. — 1914, ano 4, n. 5, p. 345.
19. Estudos sobre tuberculose. Variações do poder catalasico do sangue na infecção tuberculosa e relações que esse poder mantém com a crase corphologica sanguinea (com PINTO jnr., A.).
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1914, t. VI, n. 3, p. 192.
20. Sobre a pesquisa do bacillo da tuberculose nos escarros, contagem de bacillos referindo a um determinado peso de material.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1914, t. VI, n. 3, p. 221.
21. Soro de leite e PETRUSKY. Simplificação da technica para preparo desse meio de cultura.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1914, t. VI, n. 3, p. 250.
22. Sobre a questão das vaccinas polyvalentes.
Brazil-Medico — 1915, ano 29, n. 30, p. 153.
23. Relatório apresentado ao EXMO. SNR. DR. OCTAVIO CARNEIRO, Prefeito de Nitheroy, sobre o estudo comparativo de tratamento biologico e electrolytico das aguas de esgoto.
Relator A. FONTES (com o DR. ALCIDES GODOY).
24. Estudos sobre tuberculose.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — T. IX, n. 1, p. 143, 1917.
25. Um novo modelo de tubos para culturas de tuberculose.
A Patologia Geral — 1917, n. 5, setembro.
26. Ação exercida pelos lipoides sobre o virus da tuberculose e seu aproveitamento na tuberculino-terapia. Comunicação apresentada á 2ª Conferencia Sul-Americana de Hygiene, Microbiologia e Pathologia.
A Patologia Geral — 1918, n. 6, novembro.
27. Tuberculino-terapia.
1918 (opusculo em separado).
28. Relatório apresentado á Comissão Executiva do Congresso de Pecuaria sobre tuberculose bovina.
1918.
29. Relatório do serviço de Saude Municipal, apresentado ao EXM.º SNR. DR. OSCAR WEINCHENCK, Prefeito de Petropolis.
1919.
30. Do bocio endemico em Petropolis. Nota preliminar (*Directoria de Saude da Prefeitura de Petropolis*).
31. Tuberculinoterapia. (O que se pode deduzir da applicação da T. O. B. 2 durante o periodo de trez anos na clinica de tuberculose).
A Patologia Geral — 1919, novembro n. 6.
32. Tuberculose e tuberculinoterapia. Conferencia realizada em 25 de janeiro de 1920, na Faculdade de Medicina de Porto Alegre.
33. Sobre a infecção da tuberculose. Conferencia realizada no Instituto de Hygiene da Faculdade de Medicina de S. Paulo, em fevereiro de 1921.
34. Propriedade impediende de determinados oleos sobre as culturas de acido-resistentes.
Brazil-Medico — 1921, ano 35, n. 8.
35. Prophylaxia da Tuberculose. Conferencias realizadas na Sociedade de Medicina e Cirurgia, em sessões de junho e julho de 1921.
Brazil-Medico — 1921, ns. de 2 a 23 de julho, e de 3 de setembro.
36. Morbilidade da tuberculose. Comunicação apresentada á Sociedade de Med. e Cir. do Rio de Janeiro, em sessão de 23 de agosto de 1921, em resposta aos Drs. PLACIDO BARBOSA, GUTAVO LESSA e LEONEL GONZAGA.
37. Prophylaxia da tuberculose. Contribuição apresentada ao 1º Congresso dos Praticos, reunido na cidade do Rio de Janeiro em setembro de 1921.
A Patologia Geral — N. 6 Novembro, 1922.
38. Sobre a estrutura e o modo de desenvolvimento do bacillo tuberculoso.
Brazil-Medico — 1922, ano 36, vol. 2, n. 31, p. 71.
39. Fonction exercée par les granulations du bacille de KOCH dans la structure du même bacille. Passage des granulations à travers les filtres suffisamment poreux. Infection latente.
A Patologia Geral — 1923, ano 8, n. 5, setembro.
40. Sobre a perda da acido-resistencia e a desagregação granular nos bacillos de Koch em outras culturas.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz — 1912, t. XV, n. 1, pp. 181-185.
41. Tuberculinoterapia. Applicação da tuberculina T. O. B. 2. Noticia sobre alguns casos clinicos.
Jornal dos Clinicos — 1924, 15 de janeiro.
42. Sobre a vacinação anti-tuberculosa.
Jornal dos Clinicos — 1924, 30 de junho.
43. Sobre o "cyclo vital" das bacterias. Contribuição ao estudo da forma granular. No prelo. (*Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*).
44. Über Filtrierbare Formen des tuberkulose. Conferencia realizada na Wiener Gesellschaft für Mikrobiologie, sessão de 22 de junho de 1926.

A PAT

REVISTA

Redação e administração:

Rua Buenos Aires, 108

Rio de Janeiro

Diretor:

PINHEIRO GUIMARÃES

Redator-gerente:

LUIZ P. GUIMARÃES

Pour la publi

DETERMINAÇÃO DE MASSAS MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO NA QUÍMICA DE ANDRADE; NOTAS, ANÁLISES

ARTIGOS ORIGINAIS

DETERMINAÇÃO

A orientação atual vinculado fenômenos sob condições de experimental, libertou a e investigações das variáveis, permitindo que assiste a ciência

(*) Na opinião de questão, teria a denotação da fórmula estrutural designação dada aconso. Em apoio ao critério cumpre citar o livro TORIA que, além de ser litor reconhecido em lista consumado versar as moléculas. O traço se Los Pesos Moleculares

A PATOLOGIA GERAL

REVISTA DE MEDICINA E CIÊNCIAS AFINS

<p>Redação e administração: Rua Buenos Aires, 108 Rio de Janeiro</p> <p>Diretor: PINHEIRO GUIMARÃES</p> <p>Redator-gerente: LUIZ P. GUIMARÃES</p>	<p>REDATORES:</p> <p>Marcel Labbé — Augusto Vianna</p> <p>Antonio Fontes — Paulo Cezar de Andrade</p> <p>Paulo Parreiras Horta — Abel de Noronha</p> <p>Luiz Felício Torres — Ugo P. Guimarães</p> <p>Americo Valerio — Mario Magalhães</p>	<p>Assinatura anual:</p> <p>Brazil..... 10\$000</p> <p>Estrangeiro..... \$3 (dolares)</p> <p>Numero avulso 2\$000</p> <p>Numero atrazado 3\$000</p> <p>A correspondencia deve ser endereçada ao Sr. Luiz P. Guimarães</p>
--	--	---

Pour la publicité française s'adresser exclusivement à Mr. R. AUBERTEL, 30, rue d'Enghien, 30, Paris (X^e)

SUMARIO:

DETERMINAÇÃO DE MASSAS MOLECULARES PELO METODO REFRACTOMETRICO, por Luiz P. Guimarães; DO METABOLISMO BAZAL E SUA APLICAÇÃO NA CLINICA, por Xavier Pedroza; OCLUZÃO INTESTINAL E APENDICITE, por Paulo Cezar de Andrade; NOTAS, ANALIZES ETC.; NOTICIARIO; FORMULARIO DO LABORATORIO; BIBLIOGRAFIA; INDICE.

ARTIGOS ORIJINAIS

DETERMINAÇÃO DE MASSAS MOLECULARES PELO METODO REFRACTOMETRICO (1)

A orientação atual da fisico-química, vinculando fenomenos ainda interpretados sob condições de exclusivismo experimental, libertou a apreciação de fatos e investigações das conveniências doutrinarias, permitindo realizar o avanço a que assiste a ciencia contemporanea.

(1) Na opinião de alguns, o processo, em questão, teria a denominação de verificação da fórmula estrutural pela refractometria. A designação dada acompanha uso generalizado. Em apoio ao criterio por mim adotado, cumpre citar o livro do PADRE EDUARDO VITORIA que, alem de ser uma autoridade de valor reconhecido em quimica, é um especialista consumado versando o problema das massas moleculares. O trabalho referido intitula-se *Los Pesos Moleculares* — Madrid — 1922.

Entre os problemas da quimica moderna, estudados com vantagem sob o impulso dessas ideias dominantes, a determinação de massas moleculares pelo metodo refractometrico presta-se a uma exemplificação concreta.

A importancia crescente das medidas fisico-quimicas que tornam muito expedita a pesquisa quimica vence já as dificuldades naturais de quimicos apenas iniciados na pratica de metodos mais conhecidos á custa de especulações teoricas.

Si, na realidade, a determinação de massas moleculares é, essencialmente, um problema abordavel á luz da fisico-quimica, com maior evidencia, acentua