

Sobre a lise microbiana transmissível

(Bacteriophago de d'Hérèlle)

pelo

Dr. J. DA COSTA CRUZ

Historico.

Em 1917, d'Hérèlle communicou á Academia de Sciencias ter descoberto nas fezes dos convalescentes de disenteria bacillar um microbio filtravel, parasita do b. Shiga, capaz de se adaptar, em culturas mixtas, ao parasitismo do B. Flexner e Hiss, e verificou, logo a seguir, que o apparecimento desse microbio, que ele posteriormente de nominou "Bacteriophagum intestinale", coincidia em regra com a melhora dos doentes. Algum tempo passado, o mesmo autor obteve bacteriophago para b. Tifico, Paratificos A e B, b. Coli e b. Proteus.

A tecnica empregada para isolamento e cultura desse virus filtravel era das mais simples: semear fezes em caldo Martin e, depois de 24 horas a 37°, filtra-las em vela Chamberlain L 2. No filtrado existia um virus com a capacidade de em quantidade minima, adicionado a uma cultura adulta de um desses germes, parasitar e dissolver em 24 horas completamente a cultura. Toda cultura lisada por esse processo adquire a propriedade do filtrado primitivo, a de lisar outras culturas o que significa que o fenomeno segue em serie, facto interpretado por d'Hérèlle como prova de uma reprodução

do virus nas culturas lisadas. Todas as tentativas para demonstração microscopica do virus foram negativas e todos os trabalhos para obter culturas d'êlé, fóra das bacterias, infructiferos.

Desde logo, esse virus aparecia com algumas propriedades muito peculiares: embora de uma vitalidade pouco comum entre os seres desse grupo (conservação nos filtrados por mais de um ano sem perda da virulencia); de uma grande resistencia aos agentes fisicos (o calor que mata os germes não é suficiente para destruir o bacteriophago no mesmo tempo) e aos agentes quimicos (antisepticos), esse virus mostra uma grande exigencia no que concerne a capacidade de reprodução. Basta matar as bacterias por um processo fisico ou quimico para que ellas cessem por completo de oferecer condições de cultura ao virus. Mas mesmo nos germes vivos a exigencia para realizar essas condições é tão viva que um bacteriophago, habilitado ao parasitismo no b. Shiga, só com certa dificuldade consegue multiplicar-se no b. Flexner e vice-versa. Vê-se assim que as necessidades para reprodução do bacteriophago de d'Hérèlle percebem' com uma sensibilidade só comparavel á dos

anticorpos, qualquer variação insignificante mas especifica dos germens.

Esses e outros factos trouxeram a Kabeshima a ideia de que se não tratava de um ser vivo mas de um fermento de immidade existentes nos germens, uma pro-dias-tase capaz de ser activada por uma kinase do intestino, a qual teria actividade para agir mesmo em diluições consideraveis.

A opinião de Kabeshima perdeu credito depois que se chegou a tal numero de passagens que a diluição da quinase atingia numeros prodigiosos sem queo fenomeno mostrasse tendencia a enfraquecer.

A opinião de Bordet, a mais judiciosa até agora apresentada, considera o bacteriofago um fermento secretado pelos germens em consequencia de uma mutação produzida n'êles pela reacção dos organismos em estado de immidade.

Bordet acompanhou a sua hipotese com experiencias muito interessantes e por meio das quaes fil.ou experimentalmente o fenomeno da lise em serie aos processos de immidade.

Vacinando cobaias contra b. Coli, conseguiu retirar do peritoneo desses animaes um agente litico com propriedade em todos os pontos semelhantes ao virus de d'Hérèlle. Não escapou a Bordet a curiosa observação, inconciliavel com d'Hérèlle, que muitas vezes a lise nas culturas não era definitiva, isto é, que nas culturas lisadas (se o eram completamente na apparencia) se nota algum tempo depois a proliferação de germens, passíveis mais tarde de serem tambem lisados, e que esse fenomeno de lise e proliferação alternados se repete com intervalos regulares. Bordet crê que o fermento provem justamente desses germes que resistem á lise.

Contra a opinião de Bordet levanta-se uma objecção de certa importancia: é que sendo os germens resistentes á lise os agentes embora indirectos do fenomeno, a quantidade de fermento deveria, ate certo ponto, ser directamente proporcional ao numero de germens que proliferam em presença de virus. Ora è justamente o inverso que se dá:

a quantidade de bacteriofago nas culturas lisadas é proporcional ao numero de germens destruidos pela lise e aquelas culturas, em que a lise é menor, são exactamente as que dão filtrados menos activos. Tudo se passa aqui como se a opinião de d'Hérèlle prevalecesse e o agente do fenomeno se reproduzisse nas cellulas atacadas.

Bail, recentemente emitiu uma hipotese assaz arrojada: reconhecendo que o bacteriofago como foi dito acima provem das bacterias lisadas, Bail admite que o bacteriofago seja apenas uma fórmula filtravel do bacilo destruido que sob essa nova fórmula necessita para sua nutrição da substancia dos germens bacterianos. Actualmente a maioria dos autores, principalmente franceses, que se tem occupado com este assumpto, adoptam quasi sem discussão, a opinião de d'Hérèlle.

Tivemos o ano passado, ocasião de encontrar o bacteriofago de d'Hérèlle em 7 amostras de fezes provenientes do H. N. de Alienados, emitidas por individuos diferentes, tendo examinado oito. Uma o forneceu em 48 horas, as outras no fim de 8 dias, revelando-se o agente litico na segunda passagem com nitidez. Em individuos aparentemente normaes as fezes ora davam resultado positivo, ora negativo; ás vezes os resultados variavam no mesmo individuo conforme a emissão de fezes, assim um caso examinado 5 vezes forneceu tres vezes bacteriofago para b. Shiga. Em outros exames de individuos normaes os resultados negativos eram constantes, mesmo esvasiando o tubo digestivo por meio de purgativos salinos. Justamente um individuo assim estudado, tendo adoecido de tifo, forneceu depois de 18 dias de molestia um bacteriofago perfeitamente activo para b. de Eberth.

O bact. Shiga, primeiro isolado e que serviu posteriormente para todos os nossos estudos, conseguimos facilmente adapta-lo ao b. Flexner e Y. Fazendo-o actuar sobre a amostra de b. Tifico nº 1, não nos foi possivel obter lise completa mesmo depois de um trabalho penoso de varias passagens,

não obstante os filtrados resultantes da lise parcial dessa amostra agirem muito bem sobre a amostra nº 18, mostrando uma ação de intensidade gradual sobre uma serie de amostras. Fazendo passagens de acordo com o grau de sensibilidade de cada uma, conseguimos obter, graças ás amostras intermediarias, um bacteriofago que lizava completamente o b. Tifico nº 1. O b. Paratifico B pareceu-nos mais facilmente lisavel do que o A pelo bacteriofago Tifico nº 1.

Obtivemos muitas vezes bacteriofagos originaes sem deixar 24 horas as fezes na estufa. Com fezes de um individuo normal na apparencia, que nos fornecia intermitentemente bacteriofago, sempre que o encontramos com 24 horas, pudemos isola-lo solubilizando bem as fezes em caldo e filtrando.

A bacteriolise dá-se em meios privados de albumina, contendo apenas saes de ácidos aminados (aspartato e glicoolato de sodio), embora mais lentamente. A lise está ligada estreitamente á actividade vital das bacterias e é proporcional a essa actividade. Quanto mais abundante for a proliferação de um germen em um meio de cultura, não variando a acidez, tanto mais activo o filtrado obtido.

Em agua fisiologica não ha aparentemente lise, mas a prova que ela se dá, embora mal, é que dosando o poder anti complementar de uma emulsão de germens, adicionando-se-lhe algumas gotas de bacteriofago, esse poder baixa francamente. Os bacteriofagos gozam das propriedades dos extractos dos germens respectivos de fixar o complemento e de esgotar aglutiminas.

As relações do bacteriofago para outros germens do mesmo grupo não correm paralelamente ás relações entre a aglutinação e esses mesmos germens.

Gratia demonstrou que a reação do meio influe de maneira notavel sobre o fenomeno da lise pelo bacteriofago e verificou que só entre $Ph=7,2$ e $8,5$ e la se dá. Segundo as nossas experiencias, variando a actividade pela ação inibidora de proliferação, verifica-se que com uma concentração

de $Ph=5,1$, reação francamente acida ao tornesol, em que o b. Flexner ainda vegeta, o bacteriofago exerce perfeitamente a sua ação. A reação do meio parece exercer sobre o fenomeno uma ação indirecta pela influencia nociva que possa ter sobre a actividade vital da bacteria por isso o grau de acidez, que impede o bacteriolise, não deve er identico para todos os germens.

Conseguimos sempre obter raças resistentes á bacteriolise, semeando amostras sensiveis mesmo nos bacteriofagos mais activos. Essas raças que isolamos em cultura pura não apresentam capsulas como as descritas por d'Héréle. Dão em caldo culturas finamente aglutinadas, cujos grumos são mais grosseiros se se lhes adiciona novo bacteriofago.

As capsulas que se observam nas bacterias em contacto com bacteriofago, ao nosso ver, não iudicam maior resistencia ao virus, mas antes são um estado inicial da lise, que se observa nas culturas em meio solido já meia hora depois de se adicionar o bacteriofago. Mais tarde encontra-se homogeneamente distribuida a substancia coravel do germen dilatado (formas em levedo), que é levado á lise por arrebetamento. As bacterias mortas, mesmo pelo formol, não são passiveis de lise pelo bacteriofago; sem embargo as emulsões de bacterias mortas absorvem especificamente o bacteriofago.

Exp.: Uma garrafa de Roux semeada com b. Flexner cultura de 24 horas a 37° , foi emulsionada em 25 c. c. de caldo Martin e submetida á temperatura de 60° durante 1 hora afim de matar os germens. Depois de resfriamento adicionaram-se lne 5 g. de bacteriofago Flexner e manteve-se a mistura 24 horas na estufa a 37° . Filtrou-se em vela. O filtrado diluido a 1/10.000 parecia não impedir mais a proliferação de b. Flexner.

Uma emulsão de *Stafilococcus aureus* submetida ao mesmo tratamento, forneceu um filtrado que parecia não impedir a germinação de b. Flexner diluido a 1/10.000.000. Depois de mais dois dias na temperatura ambiente os tubos de diluição dos filtrados, os quaes apresentavam todos cultura de b. Flexner, foram aquecidos 1 hora a 58° e

verificou-se a presença de bacteriofago em cada um deles. Essas verificações concordam exactamente com os dados que nos tinha proporcionado a primeira leitura dos resultados. A diluição (10^{-8}) do tubo em que o bacteriofago do filtrado de *stafilococcus* impede a lise, é quasi aquela em que a realiza o bacteriofago puro empregado (10^{-9}). A adsorção do bacteriofago pelo *stafilococcus*, levando em conta a quantidade que ficaria adsorvida pela vela na filtração, é por isso insignificante. A adsorção pelos germens homologos é 1000 vezes maior.

Para se fazerem estas dosagens de bacteriofago, convem usar para cada tubo de diluição uma pipeta esterilizada, porque o bacteriofago adere ás paredes de vidro como um corante e a pequena porção que se desprende e passa para o liquido, em cada tubo de diluição, é suficiente para impedir o desenvolvimento da cultura. Com uma mesma pipeta, partindo de 1 cc. de bacteriofago, consegue-se obter impedimento da cultura em mais de 20 tubos. A falta desta observação, por isso, desnorteia completamente os resultados.

Em uma nota em colaboração com A. MACHADO aparecida no "Brasil-Medico", foi nosso intento chamar a atenção para a influencia que exercem os sôros especificos anti-microbianos, sobre o fenomeno da lise. Estabelecemos com uma nitidez insofismavel que esses sôros, tal como os sôros anti-bacteriofagos, impedem por completo o processo litico, sem que entretanto houvessemos podido obter das culturas, com que se inocularam os animaes fornecedores de sôro, um bacteriofago de contaminação.

Eis o quadro em que apresentamos esses resultados: Em uma serie de tubos de caldo Martin (10 cc. approximadamente) collocamos quantidades decrescentes de sôro Shiga aglutinante até $1/5000$ e uma quantidade fixa de bacteriofago. Depois de uma hora de contacto a 37° (dispensavel) semearam-se todos tubos com a mesma quantidade de b. Shiga.

	Serum Shiga	Bact. Shiga	Bacillus Shiga	Resultado com 24 h. 37°
10 tubo	10 gotas	16 gotas	3 gotas	Cultura aglutinada Como no tubo no 7.
20 "	5 "	" "	" "	Deposito menos aggl.
30 "	1 "	" "	" "	Deposito insignificante.
40 "	10 g. dil. 1/10	" "	" "	Deposito imperceptivel.
50 "	5	" "	" "	Idem, idem.
60 "	1	" "	" "	Idem, idem.
70 "	10 gotas	—	" "	Fortedeposito aglutinado
80 "	—	16 gotas	" "	Tubo limpido.
90 "	10 gotas	—	—	idem, idem.
100 "	—	16 gotas	—	Idem, idem.
110 "	—	—	3 gotas	Tubo.

Acrescentavamos que essa ação do sôro era *especifica* (1) e que influencia identica exercia o sôro de convalescentes de tifo sobre a actividade do bacteriofago tifico.

A analise mais minuciosa do fenomeno levou-nos depois ao conhecimento que o sôro, tal como os sôros anti-bacteriofagos (d'Hérèlle), não age neutralizando directamente o bacteriofago, mas apenas protegendo os germens contra a ação d'ele.

Por meio de varias dosagens sucessivas determinamos que 3 gotas de sôro Shiga eram capazes de netralizar cerca de 3 cc. de bacteriofago activo.

Juntámos a 3 cc. de sôro Shiga, 16 gotas de bacteriofago e, depois de um contacto de 24 horas a 37° , diluidos ambos em caldo Martin (10 cc.), transportamos a mistura para um balão de caldo, coutendo cerca de 200 cc. de liquido, e adicionamos diariamente uma emulsão de b. Shiga representando uma cultura de gelose de 24 horas. Obtido o esgotamento de anticorpos, isto é, ao fim de 4 dias, filtramos a cultura e o filtrado tinha propriedades liticas que se reproduziam em serie como as de um verdadeiro bacteriofago. Para outras proporções de sôro e bacte-

(1) Os bacteriofagos empregados, tinham-se tornado eespecificos por mais de 8 passagens sucessivas.

riofago 3 gotas de sôro, 16 g. bacteriofago) os factos são os mesmos e permitem, parece-nos concluir que o bacteriofago não é destruído directamente pelo sôro. Assim sendo, parece que a acção do sôro no fenomeno deva exercer-se sobre as bacterias. Para o verificar procedemos a seguinte experiencia:

A um tubo, contendo aproximadamente 10 cc. de caldo, juntou-se 1 cc. de sôro Shiga, e semearam-se 3 g. de uma emulsão de cultura nova de b. Shiga em gelose. No dia imediatos os germes proliferados e aglutinados foram tres vezes lavados em caldo que se substituiu quasi totalmente por ba-

cteriofago Shiga. Quarenta e oito horas mais tarde persistia ainda forte deposito constituido por germens aglutinados. A aglutinação, diminuindo muito a superficie de ataque das bacterias, podia ser uma causa de erro na interpretação desses resultados. Se de facto a acção do sôro se executasse exclusivamente protegendo os germens e fosse de todo independente do bacteriofago, seria uma conclusão logica que, para uma determinada quantidade de sôro, devesse sempre proliferar a mesma quantidade de germens, fosse qual fosse a quantidade de bacteriofago adicionado. Não é o que se dá conforme resulta do quadro abaixo:

	Bact. Shiga	Extrato Shiga	Caldo Martin	Sôro Shiga	Bacillus Shiga	Leitura com 24 horas à 37°
1° tubo	5 cc.	-----	-----	3 gotas	3 gotas	Flocos sem germes
2° «	10 gotas	5 cc.	-----	«	«	« « «
3° «	« «	-----	5 cc.	«	«	Germes aglutinados
4° «	4 cc.	-----	-----	«	«	Flocos sem germes
5° «	3 cc.	-----	-----	«	«	Flocos com alguns germes
6° «	2 cc.	-----	-----	«	«	Germes aglutinados
7° «	1 cc.	-----	-----	«	«	« «
8° «	10 gotas	-----	-----	«	«	« «
9° «	1 gota	-----	-----	«	«	« «
10° «	-----	-----	-----	«	«	« «
11° «	10 gotas	-----	-----	«	«	Limpido
12° «	1 gota	-----	-----	«	«	«
13° «	10 gotas	-----	-----	3 gotas	«	«
14° «	-----	-----	-----	-----	3 gotas	Turvo

Como se vê, 4 cc. de bacteriofago Shiga são capazes de determinar impedimento completo da cultura em presença de 3 gotas de sôro Shiga. Os tubos testemunhas do tubo nº 1 mostram: o nº 3, que a diluição não exerce influencia no fenomeno e o nº 2 o curioso facto de que mesmo 10 g. de bacteriofago são capazes de funcionar em presença das 3 gotas de sôro, desde que se lhe junte uma quantidade suficiente de extracto

Shiga (filtrado de uma cultura pura de B. Shiga tendo vegetado 8 dias a 37°).

Ao nosso ver, para interpretar este facto é necessario admitir que os varios anticorpos para um mesmo germem estejam ligados a uma mesma fação de globulina, que nesses tubos, devido a um fenomeno de precipitação, arrastou na queda os anticorpos de que ela é o substractum albuminoide. Esta acção dos extractos sobre o poder

impediente dos sôros específicos, pode servir-nos, entretanto, para demonstrar com toda clareza que o bacteriofago não é neutralizado directamente pelo sôro.

A um tubo, contendo 10 cc. de caldo Martin, juntaram-se 3 gotas de sôro Shiga e 10 g. de bacteriofago Shiga; depois de 3 horas a 37°, adicionaram-se 5 cc. de extracto Shiga e, a seguir, semeiou-se a mistura com 3 gotas de uma emulsão de b. Shiga. Acompanhavam a experiencia as testemunhas necessarias. Ao fim de 24 horas verificou-se que não houve no tubo acima proliferação de germens, isto é, que o bacteriofago, apesar de um contacto prolongado com o sôro, não perdeu a sua capacidade litica.

Podia parecer que o sôro exercesse sobre o bacteriofago uma ação precipitante, e que o extracto do germem fosse capaz de dissolver o precipitado formado, embora imperceptível á vista, mas tal não acontece:

Colocamos 3 gotas de sôro e 10 g. de bacteriofago homologo em cada um de 3 tubos contendo 10 cc. de caldo Martin. Ao fim de 24 horas a 37° filtramos o liquido do 1° tubo em vela e, isso feito, adicionamos ao filtrado colhido, assim como ao 2° tubo, 5 cc. de extracto correspondente. A seguir, semearam-se os tres tubos com o germem especifico (B. Shiga). Após mais 24 horas de estufa a 37° os dois primeiros tubos apresentaram-se limpídeos, enquanto o 3° mostrou deposito de germens aglutinados.

A ação impediente da lise, realisada pelos sôros específicos, é pois indubitavelmente exercida sobre os germens e exercida por anticorpos, de modo que só pode ser devida a um fenomeno de bloqueio.

Que a aglutinação não intervem no fenomeno é facil de verificar porque o sôro Shiga, por exemplo, ainda em titulo fortemente aglutinante para b. Shiga ou Flexner, não os protege contra a ação dos bacteriofagos correspondentes; por sua vez o titulo de diluição, em que o sôro inibe a lise, afasta logo do espirito qualquer papel que se quizesse attribuir ás precipitinas neste fenomeno. Se são, como parece, os ambocepto-

res os responsaveis por ele, só um estudo mais demorado o poderá dizer.

O que se pode desde já concluir, e que nos parece altamente importante do ponto de vista deste estudo com a imunidade, é que o *bacteriofago adere ao germem pelo mesmo processo de adsorção especifica por que o germem fixa o anticorpo, ou o que é o mesmo, falando na terminologia de Ehrlich, que existe um anticorpo identico ao bacteriofago pelo seu grupo citofilo.*

Como acima dissemos, os factos relatados até aqui referem-se a sôros obtidos ou de convalescentes de uma infecção natural, ou de animaes imunizados com culturas vivas de bacterias.

Poder-se-ia, querendo fazer prevalecer a opinião de d'Hérèlle, admitir que tanto pela vacinação artificial quanto pela infecção natural, a penetração de bacterias vivas na economia dos organismos, oferecesse bom meio de cultura ao virus filtravel, que acaso existisse previamente n'esses organismos, o qual se generalisaria então, e em consequencia disso, appareceriam nos sôros respectivos propriedades anti-bacteriofagicas.

Essa hipotese é, entretanto, invalidada pelo facto de que os sôros dos animaes (cães) inoculados repetidamente com bacterias mortas apresentam propriedades antiliticas especificas tão altas como os que foram por nós mencionados em detalhe.

Nós acreditamos que os sôros anti-bacteriofagos pouca diferenca tem dos sôros anti-infectuosos, mas não o podemos afirmar categoricamente senão de nma maneira geral porque, devido a dificuldades de os obtermos em quantidade suficiente para procedermos a um exame completo, preferimos, com os que possuimos, examinar outros pontos do problema.

Entretantos dada a semelhança entre os sôros específicos para os germens e os sôros anti-bacteriofagos, procuramos ver como eles procediam pela fixação do complemento em face de bacteriofagos heterologos.

Fixação do complemento: 1 h. a 37°.

Leitura da hemolise: 1 h. a 37°.

Dóse não impediante de bacteriofago Shiga: 1 cc. Dóse não impediante de bacteriofago Flexner: 1 cc. Dóses empregadas: 0,5.

Fixação do complemento

Bact. Shiga	Sôro Shiga	Sôro Flexner	Sôro Pestoso	Resultado
0,5	0,1	-----	-----	++++
0,5	0,05	-----	-----	++++
0,5	0,025	-----	-----	++++
«	0,01	-----	-----	h. total
«	-----	0,1	-----	«
«	-----	0,05	-----	«
«	-----	0,025	-----	«
«	-----	0,01	-----	«
«	-----	-----	0,1	++
«	-----	-----	0,05	h. total
«	-----	-----	0,25	«

Bact. Flexner	Sôro Shiga	Sôro Flexner	Sôro Pestoso	Resultado
0,5	0,1	-----	-----	++
0,5	0,05	-----	-----	h. total
0,5	0,025	-----	-----	« «
0,5	-----	0,1	-----	++++
«	-----	0,05	-----	++++
«	-----	0,025	-----	h. total
«	-----	-----	0,1	++
«	-----	-----	0,05	h. total
-----	0,1	-----	-----	« «
-----	-----	0,1	-----	« «
-----	-----	-----	0,1	++
-----	-----	-----	0,05	h. total

Vê-se que, se esses sôros são anti-bacteriofagos, o bacteriofago fixa o complemento só em presença de sôros homologos. Não é o que afirma d'Hérèlle. Segundo esse autor em colaboração com Eliava qualquer bacteriofago, específico seja para que germem fôr, e independente da proveniência d'êlé quanto á especie animal em que fôr colhido, fixa o complemento em presença de um sôro anti-bacteriofago. Assim esses autores obtem fixação do complemento em presença de sôro anti-bacteriofago Shiga, não só com bacteriofago Shiga, mas também com bacteriofago para o Barbone e bacet-

riofago pestoso, quer tenha sido isolado de homens convalescendo de peste, quer tenha sido encontrado nas fezes de ratos vivendo em logares em que a peste é endêmica.

No nosso entender essa afirmativa é até hoje o mais forte argumento que se produziu em favor da hipótese de d'Hérèlle, e parece-nos mesmo tão importante que com êle dificilmente se poderiam manter duas opiniões a respeito da natureza do bacteriofago.

Eis o resultado das experiencias em que cuidavamos confirmar d'Hérèlle:

Sôro anti-bacteriofago Flexner: obtivemo-lo inoculando um coelho de 7 em 7 dias com 2, 4, 8 e 10 cc. de um bacteriofago fortemente activo; e sangrando o animal 12 dias depois da ultima inoculação. O sôro obtido, que age impedindo especificamente a lise, foi inactivado a 56° durante meia hora.

Bacteriofago Flexner: diluido em uma serie de tubos até á diluição aproximada de 10⁻¹⁰ impediu totalmente o desenvolvimento de 3 gotas de b. Flexner em emulsão (cultura de gelose em 10 cc. de caldo Martin).

Bacteriofago Shiga: diluido até 10⁻¹⁰ impediu, como precedentemente, a proliferação do b. Shiga.

Extracto Flexner: filtrado de uma cultura de b. Flexner mantida na estufa a 37° durante 8 dias.

Extracto Shiga: filtrado de uma cultura de b. Shiga mantida na estufa a 37° durante 8 dias.

Caldo Martin (da partida com que se prepararam os bacteriofagos e os extractos): obtido segundo a tecnica usual, deixando a fermentação executar-se durante 24 horas a 50° em presença de acido chloridrico a 10^o/100.

Reacção de fixação.

Tanto os antigenos (bacteriofagos e extractos) como o caldo Martin foram usados na dose de 0,5 cc., metade da dose não impediante.

A fixação foi feita em 1 h. a 37°; a leitura de hemolise em 1 h. a 37°.

Sôro antibactériophago Flexner

	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025
Bact. Shiga	++++	++++	+++	h. total	h. total
« Flexner	++++	++++	++++	++++	++
Extrato Shiga	++++	++++	+++	h. total	h. total
« Flexner	++++	++++	++++	+++	++++
Caldo Martin	++++	++++	+++	h. total	h. total
Agua physiologica	h. total				

Mostramos aqui uma reacção feita simultaneamente em que foi empregado o sôro Flexner em lugar do sôro anti-bacteriophago.

Sôro Flexner

	0,1	0,05	0,025	0,01
Bact. Shiga	++	h. total	h. total	h. total
« Flexner	++++	++++	+++	h. total
Extrato Shiga	++	h. total	h. total	h. total
« Flexner	++++	++++	+++	++

Vê-se por consequencia, que apesar da grande actividade de nossos bacteriophagos os extratos dos germes respectivos nem por isso deixam de fixar menos o complemento, tanto em presença do sôro Flexner como em presença do sôro antibacteriophago.

Vê-se portanto que, não obstante a grande actividade dos nossos bacteriophagos, os extractos dos respectivos germens não fixam menos o complemento do que eles, tanto em presença do sôro Flexner quanto em presença do sôro anti-bacteriophago. Os resultados obtidos por d'Hérelle só se podem attribuir a uma fixação aleatoria determinada por principios do caldo, a que a digestão pepsica não tinha reirado completamente a propriedade antigenica. O facto de que ao bacteriophago não se possam attribuir com fundamento propriedades antigenicas nem pela fixação do complemento nem pelo estudo da acção antilitica dos sôros especificos, leva a crer que não se trata na bacteriolise em serie de um ser vivo.

ticorpo do antigeno, recentemente desenvolvida á luz de novos conhecimentos por Herzfeld e Klinger, não estava talvez tão longe da verdade quanto os trabalhos, sobretudo de Knorr Roux e Madsen, fizeram acreditar.

Pensamos que o bacteriophago seja um fermento ou, melhor, um catalizador existente no germem e empregado no metabolismo normal d'ele para desintegração de certas substancias que entram na constituição da membrana.

Um processo de digestão apropriado, tal como se dá no intestino ou no meio interno, quando o antigeno é introduzido por via parenteral, põe em liberdade esse catalizador que, livre nessas condições do equilibrio a que está sujeito dentro da celula viva, age sobre os germens provocando a destruição das partes que lhe correspondem na membrana e produzindo um desequilibrio osmotico, do qual resulta a hidratação desordenada e a ruptura da celula por arre-

O estudo do bacteriophago nos parece particularmente interessante porque vem levantar outra vez a suspeita de que a primitiva teoria de Buchner, que faz provir o an-

bentamento, pondo em liberdade mais catalizador. O mecanismo intimo do processo não pode naturalmente sair do dominio das conjecturas. O facto de que o bacteriofago não é dializavel, apesar de não ser quimicamente muito complicado (falta de propriedades antigenicas), atesta que o catalizador é um coloide; a faculdade que ele tem de aderir, sem lizar, aos germens correspondentes mortos, faz pensar que do processo participa uma substancia labil da bacteria, uma especie de endo-complemento não secretavel. Tambem que se trata de uma ação sobre a membrana, é o que parece não deixarem duvida as figuras de perturbação osmotica que apresentam as bacterias atingidas pela ação do bacteriofago.

Para nós portanto o bacteriofago não representa um estado de imunidade, mas apens uma faze (decerto das mais importantes) do processo de vacinação anti microbiana, em que se inicia a desintegração do antigeno, quer tenha sido introduzido por via enterica quer por via parenteral.

N'este ultimo caso o bacteriofago, levado a um estado de simplicidade ainda maior, como outros catalizadores do antigeno, entra nas celulas do organismo como alimento, onde se inicia o trabalho celular de integração em que ele é incorporado a uma pseudo-globulina, que é em ultima analyse um anticorpo. A passagem desses catalizadores assim trabalhados para o plasma, por secreção ou excreção celular, traz como consequencia a imunidade humoral; a retenção de pequenas porções d'ele no interior de certas celulas por tempo indeterminado condiciona a imunidade celular. Desta maneira de ver resulta imediatamente uma illação passivel de ser submetida á experiencia.

Se os grupos citofilos dos anticorpos são catalizadores não antigenicos, não devem existir anti-anticorpos no sentido estricto da palavra, isto é, anticorpos que saturem especificamente o grupo especifico de outros anticorpos.

Embora as opiniões não sejam concordes não nos parece exista nenhuma expe-

riencia que demonstre a existencia de anticorpos para anticorpos; pelo contrario, os trabalhos que conhecemos neste assunto manifestam-se pela negativa. Se se vacina um coelho com sôro de cavallo fortemente anti-toxico, verifica-se que o sôro do coelho é capaz de neutralizar a anti-toxina de cavallo, mas não exerce a menor ação sobre a mesma anti-toxina originada de cabra ou de boi.

Dehne e Hamburger em um trabalho notavel, que nós repetimos e confirmamos inteiramente, demonstraram com toda a evidencia que se trata de uma simples precipitação, isto é, a parte antigenica do anticorpo é apenas o substractum albuminoide a que está presa a parte especifica

A anti-toxina tratada pela pseudo-anti-anti-toxina cae no precipitado, donde se pode regenerar dissolvendo-o em sôro normal de cavallo; por outro lado obtem-se a mesma anti-anti-toxina inoculando coelhos com sôro normal dos animaes da mesma especie dos que fornecem anti-toxina, isto é, com simples sôros precipitantes. A precipitação da anti-toxina é um processo absolutamente especifico no que diz respeito a especie animal donde provem a anti-toxina.

Com o fim de poder esclarecer o que pudesse ficar mascarado, embora especifico nessa netralização, Fonteyne, procurou vacinar animaes com sôros ricos em anti-toxinas de animaes da mesma especie. Bem que para esses animaes o grupo especifico fosse perfeitamente extranho, o sôro d'eles não mostrou nunca os mais ligeiros traços de anti-toxinas.

Kraus e Pribam, Von Eisler e Tsuru, confirmaram, quasi sem divergencia, para outros anticorpos os trabalhos de Dehne e Hamburger.

A analyse imparcial dos trabalhos executados neste sentido mostra que, realmente, nunca se conseguiu demonstrar a existencia de verdadeiros anti-anticorpos, isto é, demonstrar que o grupo especifico para o antigeno de um anticorpo, fosse por sua vez antigenico.

Se admitirmos, assim, que a parte específica dos anticorpos seja constituída por catalizadores do antígeno, a especificidade perde muito do maravilhoso que n'ela havia e entra no quadro comum das nossas observações quotidianas. *A especificidade na imunidade fica sendo não uma criação fácil e rápida do organismo que se imunisa, mas apenas o aproveitamento de uma especificidade que já existia no germem e que ele adquiriu, como todos os outros seres vivos, num longo e penoso trabalho de evolução.*

Um anticorpo difere assim do bacteriofago só pela estrutura do seu substractum albuminoide e esse substractum é, também, o que faz diferir dois anticorpos para o mesmo antígeno provenientes de espécies animaes diferentes.

Esta maneira de ver tem a vantagem de interpretar factos isolados no estudo do bacteriofago.

Sabe-se que a introdução dos mais diferentes antígenos por via oral, raramente concede aos animaes tratados um estado de imunidade eficaz, o que prova que apesar da digestão no tubo digestivo não se dá absorção da parte util do antígeno para a imunidade. Isto está de acordo com o facto de que, pelo menos, alguns catalizadores são eliminados como prova a presença de bacteriofago nas fezes. Parece-nos que no tubo digestivo normal o aparecimento do bacteriofago coincide com a passagem do antígeno no intestino delgado. Alimentando coelhos com emulsões de *b. Flexner* mortos a 60° — 1 h., correspondendo a um tubo de gelose diariamente, ao fim de 7 dias o filtrado das fezes (pastosas) colhidos no cecum forneceu um bacteriofago muito activo.

Isso poderia explicar o facto do aparecimento intermitente do bacteriofago nas fezes de certos individuos, aparentemente normaes, porque o que tivemos ocasião de examinar, era sujeito a prisões de ventre e nas urinas d'êles se encontrava frequentemente indol, o que prova que a miúdo o seu tubo delgado se contaminava com a flora do intestino grosso. Um dos phenomenos, porém, que sobresaem mais neste estu-

do pelo seu aspecto paradoxal, é o a que já atrás nos referimos, mencionado pela primeira vez por Gratia, e confirmado por varios pesquisadores e denominado das ondas.

Quando se junta uma quantidade sufficiente de bacteriofago a uma cultura adulta obtem-se em algumas horas da lise. O tubo de cultura aparece limpido, mas curioso é que muitas vezes essa lise não é definitiva e, dentro de um determinado tempo, apparece uma ligeira turvação, que torna a desaparecer para aparecer de novo, e assim successivamente.

D'Hérèlle para interpretar este facto, admite que as bacterias em contacto com o seu virus infeccioso, assim como os organismos superiores em face de bacterias, se vacinem e adquiram um estado de imunidade passivel de oscilações deante de modificações *inexplicaveis* de virulencia do bacteriofago. Esta explicação não satisfaz; em primeiro logar, porque o fenomeno se repete alternativamente com intervalos regulares; em segundo logar, porque as bacterias, que se lizam, depois de terem vegetado em presença do bacteriofago, nunca deixaram de estar em contacto com o virus vacinante. A nossa maneira de ver interpreta com alguma felicidade este fenomeno até agora inexplicavel. Nós sabemos que todos os anticorpos, quando se juntam em grande excesso ao antígeno, não o podem impressionar: é o que se chama desvio do complemento para as sensibilizadoras; é o que se denomina zona de aglutinoides e precipitoides para as aglutininas e precipitinas. A reacção antígeno-anticorpo só se realiza quando ambos se encontram em proporções comprehendidas dentro de certos limites. (1). É o que se deve passar com o bacteriofago.

Quando se junta a uma cultura adulta de um germem uma gota de bacteriofago correspondente, dá-se a lise e enquanto a concentração do bacteriofago aumenta (admi-

(1) Bordet acaba de demonstrar que ha também inibição de lise quando se usa um excesso de bacterias. A analogia entre estes phenomenos torna-se ainda mais intima.

tindo a hipótese que apresentamos) diminuem progressivamente o número de germes vivos. Chega um momento em que a quantidade de bacteriófago em relação ao número de germes é tão excessiva que a reação cessa. Os germes resultantes das últimas divisões (o bacteriófago não impede a reprodução) podem então reproduzir-se, livres da ação do fermento, até atingirem o número suficiente para se estabelecer outra vez a condição de uma nova lise, e assim sucessivamente.

Este fenómeno não deve ser confundido com o da formação de bactérias resistentes à lise, resultantes da proliferação definitiva de bactérias em presença de bacteriófago. O isolamento em placa permite aqui obter culturas que durante algumas repicagens fornecem bactérias insensíveis ao bacteriófago. Foi desta observação que d'Hérèlle partiu para adoptar a opinião de que as bactérias se vacinavam contra o vírus. O facto de que esse vírus é destruído pelos saes de quinno, como aliás as sôro-lipazes (Peter e Reinicke) leva d'Hérèlle a lembrar a hipótese de que se trata talvez de um protozoário. É interessante notar que até agora nos seres unicelulares não se conhece nenhum fenómeno de resistência adquirida contra o parasitismo de protozoários. Assim, as hemátias que, se as compararmos às bactérias, como se tem feito e se pode fazer pelo menos do ponto de vista da imunidade, não adquirem resistência ao impaludismo, à piroplasmose etc. e quanto acaso se encontram com um desses hematozoários são inevitavelmente destruídas.

As reinfecções, principalmente no primeiro caso, são sempre possíveis, mesmo em indivíduos que foram longo tempo parasitados.

Outro é o caso quando se trata de venenos, em que temos exemplos frizantes que muito se aproximam, no nosso ponto de vista, do estudo da formação de raças resistentes ao bacteriófago.

Camus Gley vacinando coelhos contra sôro de enguia, que é fortemente hemolítico, para hemátias desses animais, verificaram

que ao fim de algum tempo não só os soros desses animais continham uma anti-toxina específica, mas que os próprios globulos separados do sôro e lavados, para afastar qualquer traço de anticorpo eram insensíveis ao sôro de enguia.

O estudo desta imunidade celular mostra a que ela não ocorre paralelamente à imunidade humoral anti-toxica, mas que só se estabelece quando o teor em anticorpos do sôro começa a baixar, sem que haja no fim, entretanto, substituição absoluta da imunidade humoral pela imunidade citológica.

Ehrlich com a sua teoria admite que as anti-toxinas, idênticas pelo receptor toxoforo aos receptores dos globulos, fixam os alimentos intermediários (Zwischenprodukt), a que se destinam esses receptores, provocando um verdadeiro desvio nutritivo com prejuizo dos globulos que, não empregando mais esses receptores, os deixam caducar por inúteis.

Na nossa opinião a explicação seria ainda mais simples porque, possuindo a anti-toxina o mesmo grupo citofilo que a toxina, os receptores não caducariam por inúteis mas seriam saturados pela anti-toxina que impediria obrigatoriamente depois a fixação da toxina. É o que nós pensamos que também se dê com as bactérias resistentes ao bacteriófago. Nelas os receptores são destruídos pela ação do bacteriófago, que os satura, e a perda desses receptores é um caracter adquirido que se transmite naturalmente segundo as leis da herança.

Recentemente Watanabe, pelo motivo de que é possível, por diluições sucessivas isolar (como já tinha feito d'Hérèlle) em placas semeadas com bactérias sensíveis, pontos perfeitamente distintos de lise, permite-se concluir que esses pontos só se podem explicar admitindo a natureza viva do bacteriófago, isto é, admitindo a pululação *in loco* do bacteriófago.

Se se fizer a consideração de que o bacteriófago é um coloide (e não uma solução verdadeira), produzido pela bactéria, com a capacidade de em condições adequadas, des-

truindo as bacterias, espalhar no meio mais substancia litica, é evidente que no ponto da placa bacteriana. onde cahir uma partícula coloidal, se forme uma pequena zona de lise independente, sem que para isso seja necessario obrigatoriamente admitir a pululação de um ser vivo.

Sem querermos ter a pretensão de afirmar verdades definitivas pensamos que o nosso modo de ver não seja unicamente um arranjo artificioso com a só vantagem de interpretar alguns aspectos do problema na apparencia inexplicaveis, porque êle, sobretudo, estabelece o elo entre o fenomeno da eiles m serie e o da formação da imunidade humoral, factos que ao primeiro relance se afiguram inteiramente disparatados.

Além d'isso, sem entrar na essencia dos fenomenos fisico-quimicos que contribuem para estas reacões, ele nos exprime com toda a claresa, em palavras familiares a todos, a maneira de ser provavel dos factos, fazendo reverter a especificidade na vacinação á unica especificidade verdadeira, aquella que os seres vivos, diferenciando-se adquirem pela evolução em face das vicissitudes contingentes do meio externo.

Antes de terminar queremos agradecer aos Drs. A. MACHADO, F. CARNEIRO, GODOY e C. WERNECK o auxilio que nos prestaram todas as muitas vezes que a eles recorremos.

Rio, 30 de Março de 1922.

BIBLIOGRAPHIA.

- BABLET —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 83, pg. 1322.
- BAIL, O. —Wiener Klin. Wochensh. Nov. 17, 1921.
- BORDET ET CIUCA —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 84, pg. 747, 748; 276, 278, 280.
vol. 83, pg. 1293 e 1297.
- BRUYNOGHE ET MAISIN —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 84, pg. 847.
- BRUYNOGHE —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 85, pg. 20 e 258.
- CAMUS ET GLEY —Arch. Intern. de pharmacodyn. 1898. *vol.* 5, pg. 304.
- COSTA CRUZ —Brasil-Medico. Jan. 28 e Fevereiro. 1922.
- DEBRÉ E HAGUENAU —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 83, pg. 1348 e 1368.
- DEHNE UND HAMBURGER —W. KLIN. Woch. 1904, pg. 807.
- DUMAS —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 83, pg. 1314.
- EISLER, V. UND I. TSURU —Zeitchr. f. Imm. orig, t. VI 1910 pg. 608.
- ELIAVA ET POZERSKY —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 84, pg. 701. *vol.* 85, pg. 139.
- FONTEYNE —Centralblatt, f. Bakt. Orig. *vol.* 52. 1909.
- GRATIA, H. —C. R. Soc. de Biol. *vol.* 84, pg. 275, 750, 751, 753, 755
vol. 85, pg. 251.
- d'HÉRÈLLE —Proceed. Soc. of exp. biol. and med. *vol.* 18, pg. 192.
—Le bactériophage et son rôle dans l'immunité. Monographie de l'Institut Pasteur. 1921.
- d'HÉRÈLLE ET ELIAVA —C. R. Soc. Biol. *vol.* 84, pg. 719.
- HERZFELD UND KLINGER —Bioch. Zeirschrift. 1917, t. 83, pg. 42 e 228. 1918, t. 85
pg. 1; t. 87, pg. 36.
- KABESHIMA, T. —C. R. Acad. des Sciences *vol.* 169, pg. 1061, *vol.* 170, pg. 71.
C. R. Soc. de Biol. *vol.* 83, pg. 219 e 471.
- KUTTNER —Proced. Soc. of exp. biol. and med. *vol.* 18, pg. 158.
- KRAUS E PRIBRAM —Centra b. f. Bakt. Orig. *vol.* 39, pg. 72.
- KAISIN —C. R. Soc. Biol. *vol.* 84, pg. 467 e 468, 755.
- MACHADO E COSTA CRUZ —Brasil-Medico. Dezembro, 1921.
- MÜLLER, TH. —Vorlesungen ueber Infekt. und. Immunitäts.
- METALNIKOW —C. R. Soc. Biol. *vol.* 83, pg. 667.
- RONA, PETER E DORA —Bioch. Zeitschrift, *vol.* 118, pg. 213.
- REINICKE
- SALIMBENI —C. R. Soc. Biol. *vol.* 83, pg. 1548.
C. R. Acad. des Sciences. *vol.* 171, pg. 1241.
- WATANABE, Tai. —Wiener, Klin. Woch. 19 Jan. 1922.
- WOLLMAN —C. R. Soc. Biol. *vol.* 84, pg. 7.