

ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE TOXINA ESTAPHYLOCOCCICA

POR

J. TRAVASSOS

Breve historico,

- I — Preparação da toxina *in vitro*.
- II — Poder toxico: *a)* acção erythrocytolytica; *b)* acção leucocytolytica; *c)* outras acções cytolyticas; *d)* acção necrosante; *e)* acção coagulante do plasma e acção fibrinolytica; *f)* acção mortal; *g)* acção tetanizante; *h)* acção gastro-intestinal.
- III — Unidade versus pluralidade de principios activos.
Relação quantitativa entre as varias acções toxicas.
- IV — Propriedades geraes: resistencia ao calor, á luz, ao envelhecimento; acção dos acidos do alcool e do formol; adsorpção pelo caolim e pelo alume; filtração, concentração e deseccamento.
- V — Produccção da toxina *in vivo*.
- VI — Poder antigenico da toxina: antitoxina estaphylococcica. *a)* vias de immunização experimental; *b)* neutralização das varias acções toxicas da toxina; *c)* relações quantitativas do poder de neutralização das varias acções toxicas; *d)* immunização activa e passiva e acções toxicas dos filtrados; *e)* poder curativo da antitoxina em relação aos effeitos toxicos da toxina.
- VII — Immunização activa e passiva e infecção sob condições experimentaes.
- VIII — Anatoxina estaphylococcica: *a)* preparação; *b)* poder antigenico; *c)* poder flocculante; *d)* emprego therapeutico.
- IX — Produccção de antitoxina em escala industrial: *a)* processos de immunização; *b)* processos de doseamento; *c)* novo processo de doseamento; *d)* concentração.
- X — Discussão. Summario.
-

ESTUDO

EXPERIMENTAL SOBRE TOXINA ESTAPHYLOCOCCICA

POR

J. TRAVASSOS

Em janeiro de 1928, em Bundaberg, Queensland, a contaminação por estaphylococcus de mistura toxina-antitoxina diphterica, usada em imunização preventiva, causou a morte de 12 dentre 21 crianças então inoculadas, perecendo todas de septicemia estaphylococcica em 24 horas ou mais. Este desastre veio mais uma vez focalizar a necessidade de uma investigação mais completa desta bacteria, sobretudo de seus productos toxicos, para os quaes a "Royal Commission", encarregada do estudo dessa occorrenca, chamou em especial a attenção, nos seguintes termos: "massive production of toxic substances must have taken place in the fatal cases if staphylococci were the responsible agents" (1).

A's septicemias estaphylococcicas, por vezes occorrendo em individuos aparentemente sãos, sem o desenvolvimento de uma infecção geral e somente reveladas pelos abcessos metastaticos, provavelmente oriundos de embolias bacterianas partidas de focos em evolução ou de focos latentes em remissão, contrastam-se as toxemias estaphylococcicas que apresentam um quadro typico, quasi sempre de prognosticos desfavoraveis e de mortalidade elevada, conforme se depreheende dos artigos de Otten (40) que verificou 80% de casos fataes em 55 tratados; de Soper (59) que constatou 72 % de morte em 40 casos; de Lowenstein (29) que refere 57 casos com 51,4% de mortalidade. Estas septicemias, quasi sempre de marcha fulminante, seriam consequencia, não só da menor resistencia do organismo, como da maior virulencia da bacteria infectante (Bowler e Boardman) (7). "Parasita constante da superficie do corpo e das mucosas, geralmente de fraco poder invasor, não se poderia explicar este augmento rapido e sensível da virulencia do estaphylococco si não por uma accentuada diminuição da resistencia individual, embora se admittisse a hypothese de uma contaminação externa por organismos altamente virulentos" (Lowenstein). As septicemias por estaphylococcus de fraca virulencia, em organismos de resistencia diminuida, seriam mesmo de prognosticos mais desfavoraveis do que as causadas por estaphylococcus altamente virulentos, mas em organismos de resisten-

cia normal. Só assim se poderia comprehender a alta mortalidade das septicemias e particularmente daquellas resultantes das amostras de estaphylococcus ordinariamente de fraca virulencia (Lowenstein). Ora, as septicemias secundarias a furunculos (forma erysipelatoide de George e Giroire) (17), em organismos de resistencia normal, de marcha fulminante e quasi sempre fataes [Peet (42), Reed e Stiles (55), Lowenstein, George e Giroire], não justificavam certamente esse modo de pensar. A resistencia organica contrapor-se-ia á fraca virulencia do germe, oriundo de identico modo da superficie do corpo. Nestas condições, um novo elemento, o poder toxigenico do estaphylococco, deveria ser chamado á explicação do facto. Com effeito, a virulencia nem sempre acompanharia o poder toxigenico nas bacterias. O proprio quadro toxemico dessas septicemias, observado pelos clinicos, não deixando duvidas quanto á intoxicação profunda do organismo, falaria accentuadamente em favor desta hypothese. A toxina estaphylococcica, elaborada mais ou menos intensamente, afastando as defesas naturaes, facilitaria a invasão do organismo e agindo sobre os pontos mais vulneraveis seria responsavel pela morte, tantas vezes observada no decurso das septicemias provocadas por esta bacteria.

Poderia o estaphylococco produzir uma toxina soluvel? Teria esta toxina propriedades que inhibiriam as defesas organicas? Agiria ella, por si só, sobre certos orgãos, provocando a morte pelo modo brutal e rapido tantas vezes observado nas septicemias estaphylococcicas? Qual o mecanismo de sua acção mortal?

Uma rapida digressão pela literatura do assumpto deixar-nos-á a par da questão:

Pesquisas experimentaes, algumas bem antigas, demonstram o poder toxico de filtrados de culturas de certas amostras de estaphylococcus. Leber (31), Christmas (10), Rodet e Courmont (56), Mosny e Marcano (32), Lingelsheim (30), entre os mais antigos, Kraus e Pribram (27), Nicolle e Cesari (35), Parker (43 a 46), mais recentemente, entre outros, estudaram um principio activo existente nos filtrados de cultura de estaphylococcus, com poder pyogenico, necrosante e letal para animaes de laboratorio. Os effeitos erythrocytolytico e leucocytolytico desses filtrados, ficaram bem conhecidos através das publicações de Kraus (26), Van de Velde (64 e 65), Bail (4), Lingelsheim e Neisser e Wechsberg (36), tendo sido posteriormente objecto de numerosos estudos por varios experimentadores. A producção de uma gelatinase, de um fermento proteolytico de acção sobre o leite, albumina do ovo e soro, coagulados; e acção coagulante do plasma e o effeito fibrinolytico — já constituíram assumpto para numerosas pesquisas experimentaes.

Russ (57), Kellaway, Burnet e Williams (25), investigando a pharmaco-dynamica da toxina, em preparações de coração-pulmões isolados de animaes inoculados por via venosa, verificaram que ella tem um effeito nocivo sobre a circulação pulmonar, parecendo produzir grande damno sobre os capillares e sobre os pequenos vasos. A morte dos animaes dando-se minutos após a inoculação da toxina por via venosa, seria consequencia de uma queda brusca da pressão sanguinea.

Os trabalhos de Burnet (1), ultimamente apparecidos e realizados em consequencia aos desastres occorridos em Bundaberg, reuniram uma serie de pesquisas sobre a toxina estaphylococcica e não deixaram margem para que seja posta em duvida a capacidade toxigeni-

ca de certas amostras desta bacteria. As publicações de Gross (14), de Parish e Clark (47 a 49), Gengou (15), Panton, Valentine e Dix (51 e 52), Dolman (12), Burky (3), Nelis (37 a 39) e de outros, posteriores aos de Burnet, confirmaram os seus magnificos estudos.

No decorrer de nossos estudos sobre a toxina estaphylococcica, alem das propriedades já assignaladas, tivemos occasião de verificar, tambem, o effeito tetanizante da toxina quando inoculada directamente no cerebro de animaes [Travassos (63)]. Este effeito tornaria este principio activo responsavel pelas chamadas meningites e meningismos, evidenciados com frequencia em clinica, na phase terminal das septicemias ou consequentes a infecções oto-rhinologicas.

Tambem uma substancia de acção gastro-intestinal foi descripta e recentemente estudada por Jordan (20 a 22), Woolpert e Dack (66) e outros.

Esta ligeira revisão da literatura mostra-nos de relance todos os effeitos conhecidos dos filtrados de culturas de estaphylococcus. O effeito lytico sobre as cellulas do sangue e dos tecidos, o poder coagulante do plasma e o fibrinolytico, e o mecanismo d amorte rapida dos animaes inoculados por via venosa, explicariam provavelmente a pathogenia da maioria das lesões estaphylococcicas: trombozes, necroses e consequentes abcessos e o mecanismo da morte nas septicemias, caso outros factores não interviessem.

Dando á toxina e ás secreções da cellula estaphylococcica a responsabilidade das lesões causadas por esta bacteria, facto aliás cabivel ante as differentes acções toxicas dos filtrados, o antigo problema novamente se focaliza: em que condições o estaphylococco, parasita da pelle e das mucosas do homem e dos animaes, se pode tornar virulento e altamente toxigenico? O problema encarado por este prisma, já tão debatido nos primordios da bacteriologia, acarreta o estudo de uma serie de factores, inherentes ao organismo infectado e á propria cellula bacteriana e dos quaes a maioria permanece ainda desconhecida.

Nesta publicação, mostraremos os resultados dos nossos estudos sobre a toxina estaphylococcica e, tambem, sobre a antitoxina e a anatoxina, de tão promettedor alcance therapeutico nas estaphylococcias localizadas e generalizadas.

No decorrer destes estudos experimentaes tivemos a assistencia da dra. Jandyra Planet, presentemente em estagio de aprendizagem em nosso laboratorio. Agradecemos-lhe aqui a sua eficiente cooperação technica.

I — Preparação da toxina *in vitro*.

As condições necessarias para a producção da toxina *in vitro*, já bem estabelecidas por Walbum (57), Parker, Oppenheimer (41), Bigger e colaboradores (8 e 9) e recentemente por Burnet, referem-se em particular á reacção do meio de cultura e a certas substancias que favorecem ou impedem a sua maior elaboração.

Tanto em meio liquido (Walbum, Parker, Burnet), como em agar semi-solido (Oppenheimer, Bigger e Burnet), pode-se obter uma toxina bem activa, si a concentração do ião H se mantem entre 6,0-7,0. Walbum, que melhor estudou o problema sob este aspecto, affirma que um pH inicial de 5,0 é o mais apropriado, embora possa variar entre 5,0 e 10,0; porem, em um caldo commum, após 5 dias de desenvolvimento, a reacção final deve estar entre 7,6 e 8,6. Para esse fim, um soluto tampão de phosphato poderia ser usado, conforme posteriormente tambem fez Parker, mas, quando se emprega uma quantidade sufficiente do soluto tampão, o resultado é bem inferior. O fim almejado seria, entretanto, obtido indirectamente, desde que se conservassem as culturas em uma atmospheria que contivesse de 10 a 25 % de CO². Os estudos de Walbum e Parker mostram que este gas age como uma verdadeira substancia tampão, diminuindo a progressiva alcalinidade do meio durante o crescimento do germe. Burnet, em estudos mais minuciosos, suggere que, sob a acção do CO², as cellulas estaphylococcicas do typo *aureus*, se tornariam mais permeaveis aos iões H, ficando o meio interno mais acido, condição necessaria para a elaboração e diffusão da toxina. As variantes *albus*, naturalmente permeaveis aos iões H, requereriam exclusivamente um pH do meio para o lado da acidez, dispensando todo e qualquer traço de CO². Combiesco e colaboradores (11) substituiram, com resultado, o CO² pelo gas de iluminação.

Certas substancias adicionadas aos meios de cultura favoreceriam a producção da toxina, enquanto que outras a inhibiriam. Os saes de magnésio, segundo Walbum, seriam até certo ponto essen-

ciaes, sendo sufficiente a addição de pequena dose de 0,03% de sulfato de magnesio para que a elaboração da toxina fosse maior. Os saes de potassio, nickel, manganez, ouro e platina teriam o mesmo effeito. Ao contrario, o chloreto de sodio, commummente usado na dose de 0,05%, bem como os saes de calcio, seriam substancias inibidoras. A glycose, como diz Parker, teria poder impediente, podendo isso ser explicado, ou pela acção de poupança da proteina (protein sparing action), demonstrada por Kendall (28), ou pelo facto de ser impossivel a manutenção do pH pela formação de acido (*).

Cultivos em anaerobiose mostraram a Burky, que, apesar de não conterem uma forte hemolysina, os filtrados se mostram toxicos para coelhos por via venosa.

Dos differentes meios de cultura que usamos para a preparação da toxina estaphylococcica (caldo commum, caldo Martin, meio de Parker, etc), destacamos os 2 seguintes que nos deram filtrados mais activos: a) meio de Walbum modificado por Burnet — a 1 litro de agua de carne preparada com coração de boi (250,0 para 1 litro de agua), addiciosar 5,0 grs. de peptona Witte, 2,0 grs. de phosphato de potassio (KH^2PO^4) e 0,3 grs. de sulfato de magnesio (MgSO^4); dissolver, filtrar e ajustar o pH entre 6,0 e 7,0; distribuir em frascos de 50 cc. e esterilizar a 120° por 20 minutos; b) agar commum a 0,8%, de pH 6,0.

Cultivos em caldo de 24 horas são transplantados para os frascos com o meio a) ou para placas contendo o meio b). Estes frascos ou placas são collocados em uma campanula munida de 2 tubuluraduras. Veda-se com parafina toda a reborda da campanula e, em seguida, faz-se passar uma corrente de CO^2 , preparada num aparelho de Kipper, ligado directamente a uma dessas tubuluraduras. A outra, ligada a um tubo recurvado na extremidade e que penetra numa proveta graduada repleta dagua e, por sua vez, invertida numa cuba cheia desse liquido, serve para dar passagem ao ar deslocado. 20% do volume do ar da campanula é substituido por uma corrente de CO^2 , vedando-se então os orificios das tubuluraduras. A campanula permanece na estufa a 37° , por 6 dias, sendo que geralmente no 4.º dia é renovado o CO^2 . As culturas de 6 dias, adicionadas de uma camada de toluol para matar os germes, permanecem no frigorifico por 24-48 horas, quando são então filtradas ou centrifugadas fortemente. A conservação faz-se sob toluol e no frigorifico, ou após desseca-

(*) Recentemente Nélis (37) diz ter obtido toxinas estaphylococcicas em meio de Ramon, usado na preparação da toxina diphterica, as quaes não só se mostravam mais activas (acção hemolytica) do que as preparadas em meio de Walbum, como attingiam um alto titulo já no fim de 48 horas.

mento. Antes do uso verifica-se a esterilidade da toxina por sementeira em caldo e agar commum.

Varias experiencias por nós realizadas demonstraram que se obtêm toxinas mais activas: a) quando o pH do meio era ajustado entre 6,0 e 7,0 antes da esterilização; b) quando o volume do liquido não ultrapassava de 50 cc.; c) quando o cultivo era feito em recipientes de larga superficie.

Para se obter a toxina dos meios de cultura semi-solidos, procedia-se do seguinte modo: as culturas de 24-48 horas de varias placas eram cortadas com uma espatula em pedaços bem finos e estes amassados com um bastão de vidro até que fosse formada uma massa bem homogenea. Esta era fortemente espremida em gaza, o liquido centrifugado, adicionado de toluol e conservado no frigorifico.

II — Poder toxico: a) acção erythrocytolytica; b) acção leucocytolytica; c) outras acções cytolyticas; d) acção necrosante; e) acção coagulante do plasma e acção fibrinolytica; f) acção mortal; g) acção tetanizante; h) acção gastro-intestinal.

Os auctores que estudaram o assumpto verificaram que nem todas as amostras de estaphylococcus pathogenicos são boas productoras de toxina. Russ (57), trabalhando com 250 amostras, achou que somente 80 eram hemolyticas e, destas, apenas 16 produziam toxina capaz de matar o coelho por via intravenosa. Burnet (1) achou que os resultados de Russ, seriam bem melhores si este auctor tivesse realizado suas experiencias usando meios de culturas em condições mais adequadas.

Nas nossas experiencias em meio de Walbum, de 67 amostras de estaphylococcus pathogenicos estudadas sob este ponto de vista, sómente 7 deram toxinas de accentuado poder erythrocytolytico. Nesse estudo, não verificamos nenhuma relação entre a virulencia das amostras e o poder toxigenico das mesmas.

Certas amostras isoladas de casos graves (septicemias, meningites) não mostraram actividade toxigenica mais elevada que outras, isoladas de lesões bem localizadas (ulceras, osteo-myelite) e aparentemente sem maior gravidade.

Algumas das amostras mais toxigenicas faziam parte da nossa colleção e foram isoladas ha varios annos (1928 a 1932), o que revela que o poder toxigenico é mantido por longo tempo. Por outro lado, algumas das amostras isoladas recentemente não mostraram maior poder toxigenico.

O augmento da virulencia dos estaphylococcus por passagens successivas no organismo do coelho, não modificou o poder toxigenico de 3 amostras ensaiadas.

Ha portanto uma verdadeira dissociação entre a virulencia e o poder toxigenico.

As acções toxicas das culturas ou dos filtrados de culturas estaphylococcicas, até agora estudadas são as seguintes: erythrocytolytica, leucocytolytica, lytica para as cellulas dos tecidos e particularmente acção necrosante para a pelle; acção coagulante do plasma e effeito fibrinolytico; as acções proteolyticas sobre o soro, leite e albumina do ovo coagulados, e acção dissolvente sobre a gelatina; poder mortal, quando inoculada por via intravenosa; acção tetanizante, quando inoculada directamente no cerebro, e, ainda, um veneno gastro-intestinal.

No decorrer dos nossos trabalhos tivemos occasião de estudar varios desses effeitos de filtrados de culturas de estaphylococcus e resumimos a seguir os resultados obtidos.

a) ACÇÃO ERYTHROCYTOLYTICA — Os filtrados de culturas de certas amostras de estaphylococcus têm o poder de lysar mais ou menos intensamente os globulos vermelhos do sangue dos differentes animaes. Essa acção lytica, pela qual é responsavel um principio activo filtravel, é destruida pelo calor e pela acção dos acidos e do formol e provoca, quando inoculada em animaes, o apparecimento de um anticorpo que a neutraliza.

Para a avaliação quantitativa da acção erythrocytolytica dos nossos filtrados, usamos a seguinte technica: a 0,5 cc. de differentes diluições dos filtrados (1/25, 1/50, 1/100, etc.), addiciona-se 0,5 cc. de uma diluição a 2% de hematias de carneiro, previamente lavadas e resuspensas em salina a 0,85%, em quantidade correspondente ao volume inicial do sangue. Incuba-se em banho-maria a 37° por 1 hora, agitando os tubos cada 15 minutos, sendo estes depois levados á geladeira até a manhã do dia seguinte, quando então é feita a leitura definitiva. A quantidade de toxina contida no tubo em que se verifica 50% de hemolyse Burnet a considera como a unidade erythrocytolytica do filtrado (D. M. H.). Para uniformidade e estudo comparativo dos resultados, a actividade hemolytica das nossas toxinas foi avaliada sob as mesmas bases.

As diluições dos filtrados feitas em salina addicionada de 10% de caldo commum, como aconselha Burnet, augmentam, até certo ponto, o poder hemolytico de certas toxinas, embora não exerçam maior influencia sobre outras.

O doseamento por incubação no frigorifico não nos deu resultados animadores. Nestas condições, certas toxinas não mostram effeito algum enquanto que outras revelam um poder hemolytico entre 100 e 200 unidades. Se após a 1.ª incubação no frigorifico incubam-se os tubos em banho-maria a 37° por 1 hora, o effeito hemolytico se revela accentuado, alcançando titulos elevados. As hematias sensibilizadas pela toxina (no frigorifico) centrifugadas e resuspensas em salina e incubadas a 37°, são lysadas rapidamente, o que demonstra a fixação da toxina sobre esses elementos.

O volume do meio de cultura tem grande importancia na producção de

erythrocytolysina de alto titulo. Usando a principio frascos contendo 500 a 250 cc. de caldo para o cultivo do germe, nunca conseguimos toxinas de poder acima de 50 unidades por cc.. Com a technica recente, empregando frascos contendo 50 cc. do meio de cultura, os resultados foram muito melhores, alcançando por vezes 3.200 unidades por cc.. A producção da erythrocytolysina é ainda favorecida pelo cultivo em meio liquido em frascos de larga superficie, parecendo isto correr por conta de um maior contacto de CO² com o meio. De um modo geral, as nossas toxinas de maior titulo hemolytico revelaram um pH variando entre 6,9 e 7,6.

Erythrocytolysinas de alto titulo tambem podem ser obtidas em agar semi-solido.

A elaboraçao da erythrocytolysina por uma mesma amostra de estaphylococco, nem sempre revela identica actividade, embora o meio de cultura seja da mesma partida, de volume igual e mesmas as condiçoes de temperatura e percentagem de CO². Assim, as amostras 264, M. C. A. e 115, cultivadas naquellas condiçoes, deram os seguinte valores hemolyticos: a amostra 264, cultivada em 3 frascos, deu 1.400, 1.600 e 2.800 unidades por cc.; a amostra M. C. A., nas mesmas condiçoes, deu 50, 100 e 200 unidades; a amostra 115 forneceu, nos 3 frascos, o mesmo titulo de 800 unidades por cc.. Varias colonias de uma mesma amostra de estaphylococcus, tambem, em igualdade de condiçoes, mostram actividades hemolyticas diversas, umas mais accentuadas que outras. Estas experiencias parecem mostrar que as cellulas estaphylococcicas não são igualmente toxigenas e suggerem a technica a seguir para a selecção das amostras boas productoras de toxina.

No que diz respeito aos globulos vermelhos de diferentes especies de animaes, a actividade erythrocytolytica se revela maior para os de coelho do que para os de carneiro, cobaia, rato, pombo, em ordem decrescente. Dolman, verificou variações do grau hemolytico dentro da mesma especie, mostrando certas toxinas maior poder erythrocytolytico para hematias de um animal do que para as de outro da mesma especie. Em geral, as nossas experiencias para a avaliacao do poder erythrocytolytico de filtrados estaphylococcicos, foram feitas com hematias de 1 unico carneiro, sangrado por varias vezes.

Como se pode verificar no Quadro 1, nem todas as amostras de estaphylococcus são boas productoras de erythrocytolysina. De 67 amostras por nós estudadas e que se mostraram hemolyticas em placas de agar-sangue de coelho, somente 25 amostras revelaram valores erythrocytolyticos acima de 50 unidades por cc..

Experimentando o poder hemolytico de varias toxinas para hematias de carneiro e de coelho, verificamos (Quadro 2) que as toxinas apresentam um titulo mais elevado para hematias de coelho do que para as de carneiro, guardando geralmente uma relação de 1 para 4.

A presença de um soro activo não parece facilitar a hemolyse, o que vem confirmar as experiencias de Julianelle (23), além de que soros de certos animais podem conter propriedades anti-hemolyticas por vezes accentuadas.

QUADRO 1

Acção erythrocytolytica (hematias de carneiro) das varias amostras estudadas, em unidades por 1 cc..

TOTAL	< 50	> 50 < 100	> 100 < 300	> 400 < 800	> 1600 < 3200
67	42	12	6	4	3

QUADRO 2

Acção erythrocytolytica de varios filtrados para hematias de carneiro e de coelhos, em unidades por 1 cc..

A m o s t r a s	Hematias de carneiro	Hematias de coelho	Relação
Carolina	1.600	6.400	1:4
177.	1.600	6.400	1:4
»	400	1.600	1:4
M.C.A..	400	1.600	1:4
115	400	1.600	1:4
»	800	3.200	1:4
Af. 4	400	1.600	1:4
»	800	3.200	1:4
193	400	1.600	1:4
Francisco	400	1.600	1:4

O titulo erythrocytolytico de uma toxina não se mantem estavel por muitos dias. Toxinas conservadas no frigorifico, sob toluol e em frascos escuros, mostraram, já no fim de 20 dias, uma actividade hemolytica diminuida de 30% a 70%. Em temperatura ambiente, os filtrados perdem muito mais rapidamente o seu titulo hemolytico, embora os demais effeitos toxicos se mostrem mais estaveis, como por exemplo o poder mortal. Burky, mesmo após um anno de conservação á temperatura ambiente, encontrou filtrados de effeito mortal para

o coelho por via venosa, filtrados estes cuja acção erythrocytolytica tinha quasi desaparecido.

No estado secco, após a perda inicial sempre observada, o titulo erythrocytolytico é mais estavel, notando-se, contudo, uma pequena diminuição após alguns meses.

Glenny (em trabalho não publicado, cit. por Parish) (47), encontrou 2 hemolysinas em filtrados estaphylococcicos, com anticorpos especificos. Panton e Valentine (51), encontraram tambem toxinas com alto titulo erythrocytolytico para hematias de coelho e que apresentavam um titulo menor para as cellulas de carneiro, não chegando a hemolysar os globulos vermelhos humanos. Uma saturação previa com globulos vermelhos humanos de uma toxina fortemente hemolytica para globulos de coelho e inactiva para cellulas vermelhas do homem, não reduziu o titulo hemolytico para os globulos de coelho. Pareceria então que as hemolysinas para cellulas humanas e de coelho seriam distinctas e que a toxina estaphylococcica raramente agiria sobre as cellulas humanas *in vitro*.

Comprovando estas experiencias com 3 filtrados provenientes de 3 amostras toxigenicas de estaphylococcus, verificámos a menor sensibilidade das hematias humanas, submettidas á acção lytica da toxina. Assim a toxina 264, fortemente hemolytica (1/3.200) para hematias de carneiro e de coelho, mostrou fraco effeito erythrocytolytico para hematias humanas (1/4); do mesmo modo, as toxinas 115 e M. C. A., muito activas para hematias de coelho (1/1.600) e regularmente para hematias de carneiro (1/400), somente mostraram hemolyse completa para as hematias humanas, quando puras. Os globulos vermelhos humanos seriam, então, mais resistentes á acção lytica da toxina do que as hematias de carneiro e de coelho. Restaria comprovar si, em ensaios com hematias de individuos cujos soros são isentos ou pelo menos contém pequena quantidade de antitoxina, o poder lytico desses filtrados não se mostraria mais accentuado. Com effeito, Bryce e Burnet (2), em estudos detalhados sobre o desenvolvimento da immunidad natural á toxina estaphylococcica, estabeleceram uma curva do teor antitoxico dos soros de individuos de varias idades, que se assemelha á curva da immunidad natural á toxina diphterica, na qual se vê que nos individuos adultos o teor anti-erythrocytolytico do soro é sempre elevado. Occasionalmente em coelhos (5%) se poderia observar tambem uma certa immunidad natural.

b) ACÇÃO LEUCOCYTOLYTICA — O estudo da leucocidina estaphylococcica teve o seu ponto de partida nas experiencias de Van de Velde (1894) (64), que descobriu, nos exsudatos de coelhos inoculados por via pleural, uma substancia que provocava a degeneração bolhosa e a lyse dos leucocytos. Lingelsheim (30),

estudando mais minuciosamente o principio leucolytico das culturas dos *estaphylococcus*, verificou que os leucocytes de coelho são mais sensiveis do que os de cão, camondongo e cobaia, em ordem decrescente. Os leucocytes de sapo seriam completamente insensiveis.

Para os nossos ligeiros estudos sobre a acção leucocytolytica da toxina *estaphylococcica* usamos o processo de Neisser e Wechsberg (36), baseado na redução do azul de methyleno. A technica que empregámos foi a seguinte: a) o exsudato pleural obtido após a inoculação de aleurona em coelhos, era recolhido e adicionado, á razão de 1/3 de seu volume, de uma solução a 0,5% de NaCl com 2% de citrato de sodio; os exsudatos muito hemorrhagicos não eram utilizados; b) a quantidade padrão da suspensão de leucocytes era dosada em presença de 0,05 de uma solução a 1/10.000 de azul de methyleno. Em uma serie de tubos com aquella quantidade de soluto de azul de methyleno, adicionavam-se quantidades crescentes da suspensão de leucocytes, sendo o volume de 1 cc. completado com salina e os tubos cobertos com uma camada de vaselina. Incubavamos em banho-maria a 37° e a leitura final era feita 20 minutos após. A quantidade padrão era dada pelo tubo que apresentava a redução completa do azul de methyleno naquelle periodo de tempo; c) a essa quantidade padrão de leucocytes, adicionavam-se, em uma serie de tubos, quantidades crescentes de toxina *estaphylococcica* e o volume de todos os tubos era inteirado a 1 cc. com salina. Levava-se ao banho-maria a 37° por 1 hora e em seguida adicionava-se para cada tubo 0,05 de soluto de azul de methyleno. Cobria-se com vaselina e os tubos eram novamente incubados por 1 hora.

Uma unidade de leucocidina era dado pela minima quantidade do filtrado que prevenia completamente a redução do azul de methyleno pelos leucocytes em 1 hora. Por esse processo verificámos a acção leucocytolytica dos nossos filtrados, encontrando em alguns delles uma actividade regularmente accentuada. Embora não tivessem apresentado uma relação numerica muito estreita, de uma maneira geral os nossos filtrados mais hemolyticos mostraram tambem maior actividade leucocytolytica. Os soros animaes inoculados repetidas vezes com a toxina *estaphylococcica* apresentam propriedades neutralizantes para a actividade leucocytolytica de filtrado.

Para certos auctores, estas duas actividades lyticas dos filtrados *estaphylococcicos* não seriam devidas a um unico principio activo, podendo-se mesmo separal-as por experiencias de adsorpção. Julianelle encontrou amostras productoras de hemolysina que não produziam leucocidina e vice versa. Panton e Valentine (51), do mesmo modo, verificaram amostras altamente productoras de hemolysina e que produziam fracamente leucocidina e vice versa. Weld e Gunther (46) teriam conseguido adsorver a erythrocytolysina com estroma de hematias de carneiro.

Convem ainda referir aqui a propriedade que possuiriam as culturas estaphylococcicas de diminuir a acção phagocytaria dos leucocytes. Esta propriedade, notada por Hektoen (19), Wadsworth e Hope (68), foi ultimamente estudada por Pike (53), que reconheceu, á luz dos trabalhos anteriores e dos experimentos que realizou, a propriedade de os estaphylococcus secretarem 2 substancias nocivas aos leucocytes: uma verdadeira exotoxina (leucocidina) que deve ser identica á hemolysina, á leto-toxina e á necro-toxina; a outra, uma substancia não antigenica, caracteriza a sua actividade pela diminuição da acção phagocytaria dos leucocytes. Esta ultima não antigenica, é thermo-estavel, não se deteriora com o tempo, não é affectada por uma atmospheria de CO² e seria susceptivel de ser produzida por todos os estaphylococcus.

c) OUTRAS ACÇÕES LYTICAS — A acção lytica dos filtrados de culturas estaphylococcicas estende-se ás cellulas de outros tecidos.

Denys e Van de Velde (65), Neisser e Wechsberg (36), estudando o assumpto, confirmam essa acção lytica; os dois ultimos auctores, porém, asseveram que este poder de lyse não se mostra evidente sobre as cellulas renaes.

Gengou (15) observou que, assim, os hematoblastos como as cellulas dos differentes órgãos do coelho soffrem a acção lytica da toxina.

Nélis e Picard (39), em cortes histo-pathologicos de órgãos de coelhos inoculados por via endovenosa, observaram o effeito lytico brutal da toxina, principalmente sobre as cellulas hepaticas, que, num estado de hepatite toxica super-aguda, apresentam uma lyse total de seu protoplasma, enquanto os nucleos, assim como as dimensões das cellulas, permanecem integros. No myocardio, por vezes, seriam encontradas fibras no estado granuloso e hyperplastico, e, nos rins, uma inflammação epithelial aguda, caracterizada por tumefacção turva das cellulas dos tubos contornados.

d) ACÇÃO NECROSANTE PARA A PELLE (*dermo-toxina*) — A acção dermatotóxica da toxina estaphylococcica é facilmente verificavel pela necrose que sobrevem á inoculação intradermica dos filtrados.

Esta acção necrosante, já bem estudada por Parker e Burnet, revela-se com toda a intensidade nas 24-48 horas após a inoculação da toxina. Tres a quatro horas após a inoculação do filtrado já se nota uma area de côr azul escura, que varia em diametro com a toxicidez do mesmo. No dia immediato, a região toma uma côr amarellada e em torno della notam-se phenomenos isflamatorios, con-

sistindo estes em intenso rubor e edema mais ou menos extenso. Com o decorrer do tempo, pela eliminação do tecido necrosado forma-se uma ulcera. Os filtrados de culturas que não contêm toxina, quando inoculados, não produzem reacção de especie alguma, excepto occasionalmente uma area avermelhada que desaparece em 24-48 horas. A maior ou menor extensão da necrose depende da maior ou menor actividade toxica do filtrado.

No Quadro 3, podem ser verificados os resultados da acção dermo-toxica de varias toxinas, obtida com a inoculação de 0,2 cc. de varias diluições por via intradermica, em coelhos. As lesões provocadas pelas doses fracas são mais do typo inflammatorio, não chegando a verificar-se a placa de necrose.

QUADRO 3

Acção dermatoxica da toxina (inoculação por via intradermica em coelhos)

Toxinas	Diluições					
	1/5	1/10	1/20	1/30	1/40	1/50
115 (2)	Nec.	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.
264 (3)	Nec.	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.
M.C.A. (4)	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.
Carolina (1)	Nec.	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.
Af 4	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.	—
21 (2)	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	Ed.	—
Mistura	Nec.	Nec.	Ed.	Ed.	—	—

Legenda: Nec. = necrose
ed. = edema

No Quadro 4, vêem-se as lesões necrosantes avaliadas pela extensão do edema e da placa necrosada, medidas em seus maiores diâmetros, de 3 toxinas, cujo poder erythrocytolytico era de 400 doses minimas hemolyticas (D. M. H.) por cc.. As quantidades de toxina inoculadas foram calculadas de modo que correspondessem a uma serie crescente de unidades hemolyticas. Verifica-se que, embora as 3 toxinas apresentassem o mesmo titulo erythrocytolytico, as lesões provocadas não se corresponderam totalmente. Com effeito, enquanto a toxina 115 origina uma placa de necrose de $1,6 \times 0,9$ com 1 D. M. H., a toxina Carolina, nessa mesma dose, provoca uma placa 24 vezes menor: $0,2 \times 0,3$. A toxina 264 mostrou uma acção dermatoxica pouco accentuada, só provocando uma placa de necrose com 5 D. M. H.

A sensibilidade do coelho ás inoculações intradermicas de toxina, porém, é variavel em certo grau. A menor dose de toxina capaz de produzir a lesão necrosante na pelle de um animal, nem sempre é sufficiente para produzir este

QUADRO 4

Acção dermatóxica da toxina (Relação entre as acções erythrocytolytica e dermatóxica)

Toxinas	Unidades hemo-lyticas por cc. (p. h. carneiro)	No. de unidades hemolyticas inoculadas por via intradermica											
		1		1.5		2.5		3		5		10	
		Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.	Ed.	Nec.
264 . .	400	—	—			0.8 x 0.5	—	4.5 x 4.0	3.5 x 1.7	1.5 x 1.5	0.7 x 1.0	2.0 x 1.5	1.1 x 0.8
115 . .	400	0.6 x 1.4	1.6 x 0.9	3.4 x 2.5	2.5 x 1.0			4.3 x 2.0	3.0 x 0.5	6.5 x 5.5	3.0 x 3.0	5.0 x 4.5	3.5 x 2.0
Carolina	400	1.7 x 2.5	0.2 x 0.3	2.0 x 1.2	0.5 x 0.5					6.2 x 3.0	4.0 x 1.3	5.8 x 3.0	4.5 x 1.5

mesmo effeito quando inoculada em outro; a essa mesma dose um terceiro coelho poderá reagir mais intensamente. Com doses mais elevadas de toxina e tomando por norma a extensão da lesão, esta variação ainda é observada. Os coelhos de pello branco mostram placas de extensão mais uniforme, sendo que os da mesma prole apresentam resultados mais constantes e talvez fixos. Os coelhos adultos são mais sensíveis.

A cobaia reage menos intensamente do que o coelho, mas, como bem observaram Parish e Clark, existe maior regularidade de resposta a uma quantidade de toxina considerada como dose minima necrosante (D. M. N.).

Coelhos successivamente inoculados de 4 em 4 dias com 0,25 cc. de uma toxina, mostram lesões necrosantes que diminuem cada vez mais de tamanho e intensidade, até se tornarem nullas da 4.^a á 6.^a inoculação. Estes animaes, assim tornados immunes, posteriormente inoculados por via venosa com uma dose de toxina seguramente mortal, nada apresentam. Os soros destes coelhos neutralizam mais ou menos intensamente todas as acções toxicas da toxina. A actividade necrosante da toxina é, tambem, neutralizada por soros de cavallos inoculados com toxina, e, bem assim, por soros de pessoas que tenham recebido varias injecções de toxina tratadas pelo formal (anatoxina).

e) ACÇÃO COAGULANTE DO PLASMA E ACÇÃO FIBRINOLYTICA — De 28 culturas de *estaphylococcus pathogenicus* foi verificada a acção coagulante sobre o plasma oxalatado: duas, quatro e seis gottas das culturas de 18-24 horas eram adicionadas a 0,5 cc. de plasma oxalatado de coelho; incubava-se a 37° e faziam-se leituras após 2, 6 e 18 horas de estufa. A' excepção de 1 amostra, as demais coagularam o plasma, algumas dellas já no fim de 2 horas de incubação. Todas essas amostras produziram hemolysina, mais ou menos accentuadamente.

Numa serie de 18 amostras de *estaphylococcus saprophytas* da pelle, todas sem acção coagulante para o plasma, 6 mostraram fraca acção hemolytica; em outra serie de 15 amostras de *estaphylococcus* isolados da polpa vaccinica, cuja maioria somente com 6 gottas de cultura e no fim de 18 horas coagulou o plasma, 4 mostraram acção hemolytica um pouco mais accentuada, não alcançando todavia 100 D. M. H. por cc..

A lyse do plasma coagulado foi tambem observada na serie de amostras de *estaphylococcus pathogenicus*, algumas das quaes, já no fim de 24-48 horas, o haviam completamente dissolvido. As amostras que mais rapidamente coagulam o plasma são, do mesmo modo, as que mais rapidamente lysam o coagulo. Esta observação confirma as de Gratia (16) e as de Gengou (15), que consideram a coagulação do plasma uma phase da fibrinolyse.

A estaphylo-coagulase é em grande parte retida pela filtração e mostra-se mais thermo-estavel do que a hemolysina e a dermatoxina.

Sudhues (60), observou que os soros de portadores de infecção *estaphylococcica*, bem como os de coelhos infectados, não mostram

nenhum effeito de neutralização, evitando ou retardando a coagulação do plasma. O phenomeno de coagulação seria effeito de trocas physico-chimicas não especificas e não dependeria dos phenomenos de immunidadade.

f) ACÇÃO MORTAL PARA DIFFERENTES ANIMAES (*leto-toxina*) — A' inoculação da toxina por via venosa em coelhos ou outros animaes, sobrevem a morte em espaço de tempo variavel, que se relaciona com a quantidade e o poder toxico dos filtrados. Este factio, claramente assignalado desde 1906 por Kraus e Pribram (27) e, em 1914, por Nicolle e Cesari (35), foi estudado em seu mecanismo por Russ (57), em 1916, e recentemente, por Kellaway, Burnet e Williams (25) e Nélis e Bouckaert (38).

Coelhos — Os coelhos inoculados por via intravenosa com uma forte dose de uma toxina bem activa cahem como que fulminados, morrendo instantaneamente. As doses menores prolongam o tempo da morte dos animaes, o que acontece tambem com as doses elevadas de toxina menos activa, conservando-se aquelles como que normaes, até alguns minutos antes do periodo final. O primeiro signal da acção letal da toxina sobre o organismo do animal injectado é uma certa difficuldade respiratoria, traduzida por inquietação, com pequenos movimentos lentos da cabeça e dos membros. O rythmo respiratorio, a principio lento, torna-se irregular e penoso, não tardando a queda do animal, precedida, as mais das vezes, por um grito angustioso. O coelho mostra movimentos desconnexos da cabeça e dos membros (menos frequentemente, fortes contracturas); logo depois, a respiração e todas as actividades musculares lhe cessam, seguindo-se a morte.

O reflexo pupillar durante o processo revela-se primeiramente por uma dilatação, seguida de forte myose; no periodo terminal, com a abolição dos reflexos corneos, a pupilla dilata-se novamente. Durante a crise pode-se notar, em certos animaes, forte anemia peripherica e micção e dejecção frequentes.

Necropsiando os animaes que morrem logo após a inoculação da toxina, observa-se o coração direito dilatado; os pulmões, com pequenas hemorragias e algumas vezes edema. Nos animaes que morrem após algumas horas, além destes aspectos, observam-se derrame e mesmo pequenas hemorragias no pericardio, sendo que, em alguns, ha um extravasamento sanguineo em todo o mediastino posterior, infiltração sanguinea no tecido pulmonar e congestão do figado.

A' punção do ventriculo esquerdo não se consegue retirar sangue; o sangue colhido da auricula, cujo tempo de coagulação não parece alterado, quando centrifugado, mostra-se lysado.

Cortes histo-pathologicos, sobretudo do figado, mostraram a Nélis e Picard (39) intensa lyse dās cellulas e, nos vasos, sangue lysado.

Russ, estudando o poder letal de uma toxina bem activa, em coelhos e gatos curarizados ou não, uns submettidos á respiração artificial, outros com a medulla seccionada, alguns tendo as carotidas ligadas, e ainda outros operados segundo o methodo de Hering-Bock (coração-pulmão isolados), observou que o phenomeno da morte estava ligado: a) a uma immediata queda da pressão sanguinea, seguida de volta á normal, havendo após alguns minutos uma profunda queda terminal; b) á diminuição da amplitude dos movimentos respiratorios nos animaes submettidos á respiração artificial; c) á parada do coração, com dilatação da auricula e ventriculo direitos e da arteria pulmonar, conservando-se o ventriculo esquerdo virtualmente vazio; d) o phenomeno da morte seria independente de qualquer acção do systema nervoso central. Os estudos histologicos demonstraram o effeito da toxina no bloqueio da circulação pulmonar, não tendo sido observado nenhum effeito directo sobre o coração. Russ concluiu que a acção mortal da toxina está directamente ligada á obstrucção da circulação pulmonar.

Kellaway, Burnet e Williams, estudando a acção pharmaco-dynamica da toxina, verificaram os mesmos phenomenos descriptos por Russ e observaram que a primeira queda da pressão sanguinea, seguida da volta á normal, é de origem vaso-motora e corre por conta dos principios pharmacologicamente activos do caldo de cultura. Somente a queda final da pressão sanguinea é devida ao principio activo do filtrado, obstruindo a circulação pulmonar.

Nélis e Bouckaert (38), registando os movimentos respiratorios, a pressão arterial e a actividade cardiaca de animaes inoculados por via venosa com uma dose de 2,5 cc. de toxina estaphylococcica, chegaram á conclusão de que a *causa mortis* estaria ligada a uma deficiencia da actividade cardiaca, de origem sinusal. Nos animaes inoculados com doses menores, cuja morte sobreviria após alguns dias, o effeito letal teria ainda como causa perturbações funcçionaes de outros órgãos (figado, tubo digestivo, rins, pulmões, etc.).

As toxinas de varias amostras por nós preparadas mostraram poder mortal muito variavel. Enquanto algumas matam por via venosa 1 K. de coelho com doses inferiores a 0,25 cc., outras se mostram muito menos activas, sendo necessarios 3 e 5 cc. para se obter esse effeito. O Quadro 5 mostra o poder mortal de diferentes amostras.

A inoculação por via subcutanea ou por via peritoneal, alem de mostrar effeitos um tanto irregulares, prolonga o tempo de morte dos animaes. Quando a inoculação se dá por via subcutanea, ha necessidade de uma maior quantidade de toxina para obtenção do effeito mortal, embora dependa mais da re-

QUADRO 5

Ação mortal de varias toxinas estaphylococcicas (inoculação por via venosa em coelhos)

Toxinas	Unidades hemolyticas por cc.	Quantidade de toxina por 1 K. de coelho								
		10 cc.	5 cc.	3 cc.	2 cc.	1 cc.	0.5 cc.	0.25 cc.	0.1 cc.	0.05 cc.
Angelina	> 4 < 20	† 1 hora	S	S	—	—	—	—	—	—
Allemao	> 20 < 50	—	† 25'	—	S	S	—	—	—	—
Izolina	> 100 < 200	—	† 15'	—	S	—	—	—	—	—
Piza	> 100 < 200	—	—	† 39'	—	S	—	—	—	—
21	> 800 < 1.200	—	—	—	† 3'	† Noite	S	S	—	—
Carolina	> 200 < 400	—	—	—	—	† 12'	S	S	S	—
M. C. A.	> 200 < 400	—	—	† 4'	—	† 8'	† 1/31'	S	S	—
Af 4.	> 800	—	—	—	† 3'	† 4'	† 22'	† Noite	S	S
264.	> 3.200	—	—	—	—	—	† 5'	† 37'	† 32 horas	S
115.	> 800	—	—	—	—	—	—	† 12'	† 1/20'	† Noite

sistencia individual do coelho. Uma dose menor pode matar num espaço de tempo por vezes menor do que uma dose 2 ou 3 vezes maior. A' necropsia observa-se edema hemorrhagico no ponto de inoculação, e, dos órgãos, o mais atingido, é o pulmão, que mostra pequenas hemorrhagias disseminadas por toda a sua area, verificando-se tambem derrame nas cavidades pleural e pericardica.

Cobaias — A inoculação por via intracardiaca de uma toxina que mata 1 kº de coelho por via venosa com 1 cc. em 33 minutos, deu resultados variaveis. Assim é que, numa serie de cobaias inoculadas com quantidades de toxina equivalente a 4, 2, 1 e 0,5 cc. por K. de animal, morreu em 4 horas a cobaia inoculada com a quantidade equivalente a 0,5 cc., amanheceram mortas as cobaias inoculadas com as quantidades equivalentes a 2 cc. e 4 cc., enquanto que sobreviveu a inoculada com a quantidade equivalente a 1 cc..

Por via subcutanea, uma cobaia injectada com a quantidade equivalente a 3 cc. por K. amanheceu morta, enquanto que uma outra injectada com a quantidade equivalente a 5 cc. sobreviveu.

Por via peritoneal ocorreram as mesmas irregularidades. Numa serie de cobaias inoculadas com quantidades equivalentes a 5, 3, 1 e 0,5 cc. por K., somente amanheceu morta a que foi inoculada com a quantidade equivalente a 3 cc..

Pombos — O pombo mostra-se sensivel, quer por via venosa, quer por via muscular: 0,4 cc. da mesma toxina, inoculada por via venosa, matou um pombo adulto em 4 horas e 1 cc., injectado na massa muscular do peitoral, matou outro durante a noite.

Camondongos — O camondongo mostra-se sensivel (via peritoneal).

g) ACCÇÃO TETANIZANTE — Em nota anterior (63), mostramos que a inoculação de 0,2 ou 0,1 cc. de uma toxina estaphylococcica, bem activa, no cerebro de cobaias ou de coelhos, quer por via transocular, cisternal ou após trepanação, produz rapidamente nos animaes uma syndroma tetanizante caracterizada por contracturas generalizadas, rigidez da musculatura da rache, opisthotono, contracturas sobretudo dos membros anteriores, entrecortadas de movimentos rapidos (Figs. 1 e 2); tachypnéa e tachycardia iniciaes e rhythmmo de Cheyne-Stokes terminal; dejecção e micção frequentes; sensibilidade exaggerada; a morte da-se algumas horas após a inoculação, ou, mais raramente, alguns minutos mais tarde e, neste ultimo caso, é sempre precedida por uma hemorrhagia nasal com os caracteres da do edema pulmonar, parecendo correr por conta da intoxicação do centro bulbar.

Doses menores de toxina (0,005 a 0,01 cc.) retardam o apparecimento da syndroma e pode-se então notar, antes de evidenciados os symptomas tetanizantes, o eriçamento dos pellos, prurido, movimentos mendibulares, perda momentanea do equilibrio, movimentos e marcha rotatoria. Em alguns animaes esta marcha rotatoria torna-se excessivamente rapida, atirando-se as cobaias com

facilidade de encontro aos obstaculos, excitação esta que dá a impressão de um verdadeiro delirio; vem afinal a queda em tetania, a que se segue a morte em tempo variavel. Estes ultimos symptomas, demonstrativos da participação do cerebello no processo, servem para caracterizar assim uma syndroma que se superpõe á da "tetania acerebellada".

Com a dose que limita a actividade da toxina, notam-se certas irregularidades no apparecimento dos symptomas, o que certamente corre por conta da maior ou menor resistencia offerecida pelo animal: certos delles apresentam symptomas menos accentuados, occorrendo em tempo muito mais prolongado, faltando por vezes o opisthotono; outros, não chegam a apresentar a syndroma definitiva, mostrando somente ligeira perda do equilibrio e marcha rotatoria, refazendo-se em seguida, podendo, ou não vir a morrer; outras cobaias, enfim, nada apresentam.

Nas doses proximas ao limite de actividade da toxina, varias cobaias se refazem, retomando o equilibrio, mantendo-se em quietude ou em movimentos e marcha rotatoria, mas, dessas, raras são as que sobrevivem nas 24 horas após a inoculação.

Guardada uma escala ascendente de diluições da toxina, observa-se uma relação chronometrica muito estreita entre a occorrença dos symptomas e a quantidade de toxina inoculada. Assim, procedendo-se a varias diluições da toxina ($1/5$, $1/10$, $1/20$, etc.) e inoculando-se, por via transocular, 0,2 cc. de cada diluição em uma serie de 3 cobaias, observa-se uma chronometria muito estreita no apparecimento da queda tetanizante. Nos quadros 6 e 7, vemos os resultados obtidos com a inoculação de duas das nossas toxinas, guardado o criterio das concentrações decrescentes. Quatro toxinas, originadas de amostras differentes, comportaram-se mais ou menos identicamente. No quadro 8 vemos as curvas fornecidas pelas medias do tempo de queda tetanizante de varias toxinas estudadas sob este ponto de vista, podendo-se verificar as differenças de poder toxico das varias toxinas e, tambem, o parallelismo existente entre a toxicidade e a percentagem de mortes.

Si se objectiva mais o valor quantitativo da toxina, não se levando em conta a concentração desta no vehiculo, os resultados são bem differentes, notando-se claramente que a acção tetanizante da toxina ocorre em função da concentração. No Quadro 9, vê-se que uma determinada dose de toxina que numa concentração mais elevada é capaz de produzir a syndroma tetanizante na cobaia, nada produz em diluição maior. Vemos ainda que, além de uma certa diluição, é impossivel obter qualquer symptoma da syndroma ou mesmo morte tardia, embora as doses inoculadas correspondam ás mesmas quantidades de toxina que em diluição inferior foram capazes de produzir uma symptomatologia completa, seguida de morte.

Para explicação deste facto devemos ter em conta que, pela inoculação por via transocular na cobaia, o liquido quasi sempre se diffunde sobre os órgãos

QUADRO 7

Acção tetanizante da toxina No. 115 (9), via transocular, em cobaias

Diluição	Volume inoculado	Quantidade absoluta de toxina	Peso da cobaia	Tempo da queda tetanizante, em minutos													Symptomas alem de 30 minutos	Volta ao equilibrio	Tempo da morte	Observações
				0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24				
1/1	0.2	0.01	320.0																0/13'	H. N.
>	>	>	280.0																0/36'	H. N.
1/10	0.2	0.02	245.0	-----															Noite	
>	>	>	310.0	-----															4/32'	
>	>	>	240.0	-----															5/22'	
1/20	0.2	0.01	285.0	-----														1/54'	4/4'	
>	>	>	280.0	-----														2/15'	5/42'	
>	>	>	305.0	-----															3/45'	
1/25	0.2	0.008	255.0	-----														2/0'	4/40'	
>	>	>	250.0	-----															5/12'	
>	>	>	290.0	-----															5/32'	
1/30	0.2	0.0066	285.0	----- -----E----->														2/23'	S	5 dias
>	>	>	310.0	-----														1/12'	Noite	
>	>	>	270.0	-----															48 horas	
1/40	0.2	0.005	265.0	----- ----->													E 2/8'		S	5 dias
>	>	>	300.0	----- -----E----->															Noite	
>	>	>	290.0	----- ----->													E 3/12'		S	5 dias

Legenda: —| queda tetanizante; E. — prurido, movimentos mandibulares, movimentos e marcha rotatoria.
S — sobrevida; H. N. — hemorragia nasal.

O tempo de morte é dado por uma fração cujo numerador representa o numero de horas e o denominador o numero de minutos.

QUADRO 9

Acção tetanizante da toxina estaphylococcica avaliada em função da concentração

Diluições da toxina	Volume inoculado em cc.						
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	
'/2.5		++5' — †					
'/5	0.02	++22';R. — †	++9' — †				
'/10	0.01	++20';R. — †	0.02	++12';R. — †			
'/20	0.005	+33';R. — +	0.01	+26';R. — †	0.02	++8' — †	
'/30			0.0066	θ — S	0.01	θ — †.	
'/40			0.005	θ — S	0.01	θ — S	
'/50				θ — S		0.01	θ — S
'/60				θ — S	0.005	θ — S	
'/80				θ — S	0.005	θ — S	
'/100				θ — S		0.005	θ — S

Legenda:

++22' : queda tetanizante em 22 minutos

+ : movimento e marcha rotatoria, perda momentanea do equilibrio

R : retoma o equilibrio

† : morte nas 24 horas

†. : morte nas 48 horas

θ : nenhum symptoma

S : sobrevida em 5 dias.

nervosos, banhando-os mais em superficie do que em profundidade; outrossim, devemos levar em conta que a fixação da toxina sobre a cellula nervosa obedece, talvez, ás mesmas leis que regem as colorações vitas electivas, regulando-se por um coefficiente de repartição, solubilidade e penetração, ou ainda ás leis de adsorpção por superficies limitadas entre systemas micro-heterogenos ou colloidales. As inoculações de toxina corada pela fuchsina, em identicas diluições ás da experiencia, mostram-nos que tanto maior é a superficie do cerebro corada, quanto maior é o volume do liquido inoculado. Assim, a inoculação de 0,1 cc. da toxina corada attinge somente a superficie dos órgãos que repousam na caixa craniana; a de 0,2 cc. cora não só essa região, como parte do cerebro e do cerebello do lado opposto ao da inoculação; as de 0,3 cc. e de 0,4 cc. chegam a corar até os pontos mais elevados do cerebro, corando praticamente toda a superficie da massa encephalica. Como a acção da toxina é immediata, não sendo assim sujeita a outros factores como o da absorpção, de acção mais prolongada, é facil de presumir que uma maior extensão do tecido nervoso é submetida á acção da toxina, si esta é inoculada em maior volume. Este facto é corroborado pela experimentação que nos mostra que, si de uma mesma diluição da toxina, inocularmos 0,1 cc., 0,2 cc., 0,3 cc. e 0,4 cc. em cobaias, os tempos de queda tetanizante desses animaes serão tanto menores quanto a quantidade inoculada é maior. O coefficiente de repartição da toxina, nestas condições experimentaes, para qualquer de suas diluições, permanece o mesmo para um determinado volume inoculado. O facto, porém, das concentrações menores enfraquece o poder de fixação que se torna nullo, quando attinge determinada diluição. A inoculação, por exemplo, de 0,1 cc. da diluição a 1/20 banha determinado territorio, mas, como nessa diluição a toxina está dentro do seu limiar de fixação, o animal apresenta os symptomas tetanizantes; a inoculação de 0,2 cc. da diluição a 1/40 reparte-se em um territorio muito maior, mas, como o limiar de fixação da toxina está aquem dessa diluição, o processo fixador não se realiza e, embora as quantidades absolutas de toxina inoculadas sejam as mesms, os animaes reagem irregularmente, ou nada apresentam.

Essa experiencia sugere a falta de especificidade (neurotropismo) da toxina estaphylococcica para o tecido nervoso. Reproduzindo as experiencias classicas de Wassermann e Takaki (71), sobre a adsorpção da toxina tetanica pelo tecido nervoso, verificamos que o filtrado estaphylococcico, após contacto mais ou menos prolongado com esse tecido, não perde o seu effeito mortal e tetanizante. Os animaes inoculados repetidas vezes com doses não mortaes de toxina, por via subcutanea, intradermica, venosa e, mesmo, carotidiana, não mostram symptomas nervosos que possam affirmar o neurotropismo da toxina.

— Os resultados registados nos quadros 6, 7 e 8 e os obtidos com varias outras toxinas inoculadas na dose de 0,2 cc. de diluições mais estreitas (ver mais adiante), permitem estabelecer: a) uma dose tetanizante symptomatica (D. T. S.), que assignala o limite de actividade symptomatica da toxina, limite em

que se notam irregularidades no apparecimento dos symptomas, podendo produzir uma queda tetanizante tardia definitiva ou somente symptomas de excitação, tal como prurido, movimentos mandibulares, movimentos e marcha rotatoria, perda momentanea do equilibrio, ou nada produzir em certos animaes mais resistentes; b) uma dose tetanizante letal (D. T. L.), que representa, em funcção da concentração, a menor dose de toxina capaz de produzir systematicamente a syndroma nos 30 primeiros minutos após a inoculação e a morte nas 24 horas, em todas as cobaias inoculadas. Estes dados e o da neutralização da acção tetanizante da toxina pela antitoxina, foram aproveitados para o estabelecimento de um novo processo de doseamento da antitoxina, do qual falaremos mais adiante.

A toxina inoculada por via lombar na rache do coelho produz rapidamente a paralyisia dos membros posteriores e, quando inoculada em doses acima de 0,5 cc., tardiamente (4 a 5 horas mais tarde), causa os symptomas cerebraes e sobretudo o opisthotono, que progridem muito lentamente. Os animaes geralmente morrem na noite do dia da inoculação.

Sob a marcose, pelo chloroformio, ou pelo ether, os symptomas tetanizantes diminuem de intensidade e mesmo desapparecem, mas retornam á actividade primitiva logo que o animal volta ao normal.

Cortes histo-pathologicos, feitos em cerebros e cerebellos de cobaias inoculadas, mostram uma degeneração do typo hydropico das cellulas desses orgãos, phenomenos de polychromatolyse e extravasamento sanguineo em determinados pontos, com lyse dos globulos vermelhos. Nos animaes que morrem 4 ou 5 horas após a inoculação da toxina não se observa reacção da neuroglia. Para o lado das meninges, observa-se ligeira infiltração leucocytaria.

Como testemunhas foram inoculadas cobaias, não só com o caldo usado para as culturas collocado sob as mesmas condições de experiencia, como tambem com toxinas diphterica e tetanica, filtrados de culturas de *E. typhi*, gonococco, estreptococco, meningococco, veneno de jararaca e solução de trypsina. Somente com as inoculações de filtrados de culturas de meningococco em meio harmonico de Huntoon e de estreptococco hemolytico conseguimos, quando eram inoculadas doses elevadas (0,3 cc. a 0,5 cc.), um effeito semelhante, porem os animaes retomavam o equilibrio muito facilmente, em alguns minutos, embora morressem nas 24 horas.

h) ACÇÃO GASTRO-INTESTINAL — Desde as observações de Barker (5), nas Philippinas, foi aventada a hypothese de certos alimentos contaminados por estaphylococcos produzirem, quando ingeridos, symptomas gastro-intestinaes (salivação, nauseas, vomitos, dores abdominaes, diarrhéa profusa, prostração e tremores de frio), mais ou menos accentuados.

De então para cá appareceram varios trabalhos nesse sentido que

são mencionados num artigo recentemente publicado por McBurney (33).

As experiencias de Dack e collaboradores (13), reproduzindo em voluntarios a syndroma gastro-intestinal pela ingestão de filtrados de culturas de estaphylococcus isolados de um bolo que occasionara a syndroma em 10 pessoas; as de Jordan e McBroom (21), e as de Woolpert e Dack (66), fazendo apparecer em macacos a syndroma toxica, tambem por ingestão de filtrados de culturas de estaphylococcus; as de Ramsy e Tracy (58), em gatinhos, por ingestão de culturas de estaphylococcus em leite, sabidamente responsaveis pela gastro-enterite no homem; e, ultimamente, as de Borthwick (6), em cobaias e coelhos, quer pela inoculação directa no estomago, quer pela via intra-rectal, irrigando previamente estes orgãos com salina e ajustando o pH a 7,3 — todas demonstraram fartamente que o filtrado estaphylococcico é capaz de provocar esta syndroma gastro-intestinal.

Woolpert e Dack, em trabalho recente, acreditam que o veneno gastro-intestinal esteja ligado a um principio activo distincto dos demais principios toxicos dos filtrados estaphylococcicos, embora estes (hemolysina, leucocidina, dermo-toxina, leto-toxina) estejam sempre nelles presentes e guardem proporcionalmente certa relação quantitativa entre si. Pelo aquecimento e pela filtração já se conseguiria grosseiramente dissociar o veneno gastro-intestinal dos demais principios, o que se tornaria evidente pela neutralização do filtrado pela antitoxina que, neutralizando os demais efeitos, deixaria livre o veneno gastro-intestinal (experiencias em macacos). Poder-se-ia pensar numa destruição da antitoxina no tracto gastro-intestinal, mas o mesmo não acontece com a mistura toxina-antitoxina botulinica, e, alem disso, macacos immunizados passivamente não se mostraram immunes ao filtrado por via oral.

III — Unidade versus pluralidade de principios activos. Relação quantitativa entre as varias acções toxicas

O problema da unidade ou da pluralidade de principios activos responsaveis pelas varias acções toxicas dos filtrados estaphylococcicos, tem sido encarado sob pontos de vista diversos, pelos experimentadores que estudaram o assumpto.

Neisser e Wechsberg (36) acreditam que a leucocidina poderia ser adsorvida dos filtrados por leucocytos, sem que fosse destruida ou diminuida a acção erythrocytolytica dos mesmos.

Parker (43), em alguns de seus filtrados que exerciam accentuada acção dermo-toxica, não encontrou nenhuma acção letal quando inoculados por via venosa em coelhos. Por outro lado, filtrados activamente hemolyticos seriam desprovidos de acção necrosante.

Weld e Gunther (46) mostram que o principio erythrocytolytico pode ser separado da dermo-toxina por uma technica de saturação do filtrado com estroma de hematias de carneiro. Gengou (15) e Nélis (37), ao contrario, não conseguiram, pela adsorpção do principio activo com sangue, a dissociação das varias acções toxicas da toxina. Para Gross (14) o principio erythrocytolytico teria no caldo de cultura formação anterior á dermo-toxina e, em certos filtrados, esta alcançaria uma actividade muito superior áquelle.

Julianelle (23), por ter encontrado amostras de estaphylococcus que, embora produzindo forte erythrocytolysina, não mostravam nenhum traço de leucocidina e vice-versa, julga que a hemolysina e a leucocidina são independentes uma da outra.

Panton e Valentine (51) tambem se incluem entre os dualistas; como foi referido anteriormente, quando do estudo da erythrocytolysina, estes auctores acreditam tambem na possibilidade da existencia de hemolysinas distinctas para hematias de differentes especies animaes e da humana.

Glenny (47) teria encontrado duas hemolysinas com anticorpos distinctos.

Burnet (1), entretanto, encontra certa relação numerica entre os poderes necrosante e mortal da toxina (1/400) e assenta com mais segurança o seu modo de pensar unicista no facto de 5 antitoxinas, preparadas com 5 filtrados de amostras diversas, apresentarem uma relação muito estreita na neutralização desses differentes effeitos. Uma unidade anti-mortal das 5 antitoxinas corresponderia grosseiramente a 10 unidades anti-necrosantes e a 160 anti-hemolyticas. Essas experiencias deixariam demonstradas, não só a identidade antigenica das toxinas preparadas com varias amostras de estaphylococcus, como a realidade de uma antitoxina neutralizando as differentes propriedades de um unico principio activo. Com effeito, no caso da existencia de varios principios responsaveis pelas differentes acções toxicas da toxina, as neutralizações dessas acções toxicas não se mostrariam em tão estreita e constante relação numerica, dados os graus de antigenicidade differentes que forçosamente teriam esses varios principios toxicos. A transformação rapida da toxina em toxoide seria responsavel pela falta de concordancia absoluta entre os valores das differentes acções da toxina.

Dolman (12), Gengou (15) e Nélis (37), também são unicistas. As acções coagulante do plasma e fibrinolytica, que, nos seus ultimos trabalhos, Gengou attribue a um unico principio, seriam facilmente dissociadas dos efeitos lyticos, dermo-toxico e letal pela filtração e por sua maior thermo-resistencia.

Gross (14), acredita-a filtravel, mas thermo-resistente a 90.º e desprovida de acção antigenica.

Sudhues (60) observou também que os soros de portadores de infecção estaphylococcica, soros de coelhos infectados, bem como soros de alto titulo anti-erythrocytolytico, não mostram nenhum effeito de neutralização sobre a actividade coagulante do plasma das culturas, quer evitando, quer retardando o tempo da coagulação.

Relativamente no veneno gastro-istestinal, Woolpert e Dack acreditam que este esteja ligado a um principio activo distincto, embora sempre guarde com as demais acções toxicas dos filtrados, uma relação de presença e proporcionalidade. Pelo aquecimento e pela filtração já se conseguiria dissociar o veneno gastro-intestinal, dissociação que se tornaria evidente pela neutralização daquellas acções toxicas pela antitoxina que o deixa livre.

Nas nossas experiencias, os filtrados que mostraram um poder hemolytico accentuado, foram estudados quanto ás suas acções necrosante, mortal e tetanizante e ficou verificado que todos apresentam estas actividades toxicas mais ou menos accentuadamente. No Quadro 10 veem-se as relações numericas das acções erythrocytolytica (para hematias de carneiro) e necrosante, calculadas em relação a 1 minima mortal para 1 K. de coelho. A unidade erythrocytolytica foi avaliada como acima ficou dito (pag. 11), mostrando as toxinas 264 e 21 um maior poder hemolytico na leitura final, após estacionar na geladeira durante a noite, o que não foi verificado para as demais toxinas cujo titulo pouco foi alterado após a 2.ª incubação. Quanto á acção necrosante, os numeros do quadro correspondem á avaliação feita relativamente á menor quantidade de toxina capaz de produzir uma pequena placa de necrose na pelle do coelho e não como fez Burnet, que avaliou a lesão pela extensão do edema. A acção mortal foi avaliada em relação a 1 K. de coelho, inoculando-se por via intravenosa diferentes quantidades de toxina e considerando-se como unidade a menor quantidade de toxina que mata 1 K. de coelho em 24 horas.

Os valores encontrados mostram que entre as acções erythrocytolytica e mortal ha uma relação numerica mais ou menos constante: na avaliação pelo maior effeito erythrocytolytico uma quantidade de toxina maior do que a correspondente a 400 D. M. H. e menor do que a correspondente a 800 D. M. H. é necessaria para matar 1 K. de coelho; na avaliação inversa a minima mortal está acima de 100 e abaixo de 200 D. M. H..

QUADRO 10

Relação entre os poderes erythrocytolytico, necrosante e letal

Toxinas	D. M. H. por cc.	D. M. N. por cc.	D. M. L. por cc.	1 D. M. L. equivale a		
	H. carneiro			1 D. M. L.	D. M. N.	D. M. H.
115	800	> 150	> 4	> 1	37.5	200
		< 200	< 10	< 1	20.0	80
M. C. A.	400	> 100	> 2	> 1	50.0	200
		< 150	< 4	< 1	37.5	100
264	3.200	> 150	> 4	> 1	37.5	800
		< 200	> 10	< 1	20.0	320
Af. 4	400	> 50	> 2	> 1	25.0	200
		< 100	< 4	< 1	12.5	100
21	1.600	> 100	< 2	> 1	25.0	800
		< 50	< 4	< 1	12.5	400

Os valores correspondentes á acção necrosante, avaliada tal como foi referida acima, em relação a 1 D. M. L. para 1 K. de coelho, não guardam uma relação muito definida. Burnet, fazendo a verificação pela extensão do edema, encontrou uma relação de 1/400 entre o poder necrosante e o letal.

No Quadro 11, onde estão analysados os valores toxicos de 3 toxinas conservadas sob toluol e no frigorifico, verifica-se que ha uma certa disparidade entre o poder erythrocytolytico e o poder letal, e, quanto ao poder necrosante, agora avaliado pela extensão do edema, os resultados, do mesmo modo, não guardam uma relação muito definida. Neste mesmo quadro, já agora avaliando o poder tetanizante em relação ás demais acções toxicas da toxina, verifica-se que para as 2 toxinas de poder erythrocytolytico correspondente a 400 D. M. H. por cc., uma quantidade equivalente a 12,5 D. M. H. é necessaria para produzir a syndroma tetanizante nas cobaias e a morte nas 24 horas. Com 6,25 D. M. H., os symptomas evidenciados são ligeiros, morrendo os animaes em 48 horas. A acção tetanizante, igualmente, guarda certa relação com o poder letal, mas, com o poder necrosante, avaliado pela extensão do edema, o parallelismo não é evidente.

Como essas verificações tivessem sido feitas com toxinas conservadas ha dias sob toluol e no frigorifico e os doseamentos realizados em diferentes dias,

QUADRO 11

Relações entre os poderes erythrocytolytico, necrosante, letal e tetanizante de toxinas estaphylococcicas.
(Toxinas conservadas sob toluol e na geladeira)

Toxina	Acções das toxinas	QUANTIDADES DE TOXINA EM CC.												
		1 cc.	0.5 cc.	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.0078125	0.0039062	0.0019	0.00097	0.00048	
115	D. M. H. para hemáticas de carneiro.	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.0975	
	Poder necrosante {	Nec.					3.0x3.0	3.5x2.0	3.3x3.0	4.0x2.0	3.0x1.0	1.5x1.0	0.3x0.4	θ
		Ed.					5.8x6.0	5.0x4.8	6.4x5.5	6.2x3.4	3.4x2.3	1.7x1.8	0.8x1.0	0.4x0.6
	Poder letal por K.	† 30'	† 48 hs.	θ	θ									
Poder tetanizante			++ †	++ †	+ †	± †.	0/S	0/S						
Carolina	D. M. H. para hemáticas de carneiro.	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	
	Poder necrosante {	Nec.						4.5x1.5	4.0x1.8	3.5x0.6	0.5x0.5	0.3x0.3	θ	θ
		Ed.						6.0x3.2	6.2x2.5	4.4x1.8	2.0x1.2	0.6x1.2	0.4x0.6	0.1x0.2
	Poder letal por K.	† 33'	† 20 hs.	θ	θ	++ †								
Poder tetanizante						++ †	± S	0/S	0/S					
M. C. A.	D. M. H. para hemáticas de carneiro.	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78			
	Poder necrosante {	Nec.					2.0x1.1	1.8x0.7	1.0x0.5	0.4x0.5	θ	θ		
		Ed.					2.4x1.8	1.6x1.0	0.8x1.0	0.3x0.2	θ			
	Poder letal por K.	† 35'	† 36 hs.	θ	θ	3.2x2.3								
Poder tetanizante			++ †	++ †	++ †	± †.	0/†.	0/S	0/S					

Legenda — ++ † : queda tetanizante e morte nas 24 horas.
+ : movimentos rotatorios.
θ : nenhum symptoma.

†. : morte em 48 horas.
S : sobrevida em 5 dias de observação.

fizemos outras pesquisas das relações entre o poder erythrocytolytico e o poder tetanizante, sendo a verificação deste realizada no dia seguinte ao doseamento daquelle, em toxinas de preparação recente e em toxinas dessecadas (Quadro 12). O poder erythrocytolytico foi avaliado para hematias de carneiro. Com as toxinas que se mostram mais erythrocytotoxicas para hematias de carneiro necessitamos de uma maior cifra de D. M. H. para produzir a syndroma tetanizante na cobaia, ao passo que com as que mostram effeito erythrocytotoxico menor, já com 2 unidades hemolyticas ou com um pouco mais se consegue uma syndroma tetanizante typica.

A differença que se observa nas relações destas duas acções toxicas, quer nas avaliações de toxinas conservadas, quer nas de toxinas recentemente preparadas e doseadas, deve corresponder ao facto da queda do poder erythrocytolytico, já observada por Burky em relação a este effeito e ao poder mortal, si outras causas estrictamente technicas não estiverem, por sua vez, em jogo. Estas discordancias tambem se podem enquadrar na argumentação de Burnet, sobre a transformação rapida da toxina em toxoide, facto que seria responsavel pela falta de concordancia absoluta entre os valores das differentes acções toxicas dos filtrados. Acreditamos haver certa difficuldade para assentar as relações numericas entre os valores dessas differentes acções, não só pelos argumentos acima expostos, como pelas differenças de technica usadas pelos diversos experimentadores na determinação do poder erythrocytolytico, o que faz variar em quantidade e qualidade as hematias. Accrescem a isso as oscillações de sensibilidade dos animaes empregados na determinação das acções necrosante e mortal. A prova do poder dermo-toxico, por exemplo, avaliada pela extensão do edema ou pelo diametro da placa necrosada, deixa muito a desejar, uma vez que a uma mesma dose limite os animaes reagem differentemente, como assignalámos mais acima, o que foi tambem observado por Burnet, Parish e Clark e por Burky. A prova do poder mortal para coelho, mesmo em funcção do peso, offerece as mesmas variações. Burnet teria encontrado raças de animaes mais sensiveis e, por outro lado, Burky registou maior numero de animaes sensiveis á toxina entre os coelhos adultos. Nós mesmo, por differentes vezes, tivemos variações com uma dose determinada como D. M. L. por K. de coelho, resistindo alguns animaes á inoculação de uma tal dose.

O criterio indirecto adoptado por Burnet, avaliando o poder neutralizador da antitoxina para as varias acções toxicas da toxina, certamente seria o melhor para o julgamento final, si a determinação das unidades limites dessas varias acções toxicas não estivesse revestida de identicas causas de erro. Contudo, podendo uma approximação estreita ser estabelecida, o facto constituiria argumento forte e seguro que falaria em favor de um unico principio activo da toxina.

As nossas verificações neste particular resumiram-se no registo da neutralização das varias acções toxicas da toxina por 3 antitoxinas, oriundas de cavallos em serviço de immunização industrial, recebendo inoculações de anato-

Numero de unidades hemolyticas necessarias para a producao da syndroma tetanizante.
(Verificacao em toxinas recentemente preparadas e em toxinas dessecadas)

Toxinas	Unidades hemolyticas para hematias de carneiro											
	1	1.5	2	3.5	5	10	15	20	30	40	80	100
115 (9)	<u>±</u> †.	+ †.	+++ †		+++ †	+++ †		+++ †		+++ †		
M. C. A.		0/S	<u>±</u> †		+ †	+++ †	+++ †					
Carolina.	0/S			+ †	+++ †		+++ †					
264 (6)	0/S		0/S		0/S	+++ †	+++ †	+++ †		+++ †		
Mistura III						0/S		<u>±</u> S		+++ †		+++ †
Mistura I					0/S	0/S		0/S		<u>±</u> †.	+++ †	+++ †
115 (secca)	0/S		+++ †		+++ †							
Mistura II (secca).	0/S	+ †	+++ †		+++ †	+++ †		+++ †			+++ †	
Mistura III (secca).	0/S			+ †.	+++ †							
264 (secca).					0/S	0/S			+++ †	+++ †	+++ †	

Legenda — 0 : nenhum symptoma da syndroma
± : symptomas ligeiros
 + : symptomas accentuados, sem queda tetanizante
 ++ : queda tetanizante definitiva
 S : sobrevida em 5 dias de observação
 † : morte nas 24 horas
 †. : morte nas 48 horas.

xina e toxina de diferentes amostras de estaphylococcus. Como se vê no Quadro 13, em que resumimos os resultados obtidos, a relação de 1/160, obtida por Burnet entre o poder anti-letal e o poder anti-erythrocytolytico, foi por nós observada 3 vezes sobre 5 verificações. A relação de 1/10, ainda de Burnet, entre o poder anti-necrosante e o anti-letal, foi obtida 1 vez sobre duas verificações. O poder anti-tetanizante, avaliado 2 vezes em face de 1 dose tetanizante symptomatica (D. T. S.) da toxina, correspondeu em relação a 1 unidade anti-mortal do mesmo modo que o poder anti-necrosante. Convem notar que a determinação das unidades limites das acções necrosante e mortal da toxina obedeceu ao criterio estabelecido por Burnet, e a determinação da unidade tetanizante symptomatica foi feita de accordo com os nossos estudos sobre esta acção toxica da toxina. Estes numeros, que se approximam dos obtidos por Burnet, trazem uma contribuição que vem reforçar a hypothese unicista desse experimentador, em relação ás acções hemolytica, necrosante, mortal e tetanizante.

QUADRO 13

Determinação quantitativa da neutralização das diferentes acções toxicas da toxina pela antitoxina

Antitoxinas	Doses minimas anti-hemolyticas	Doses minimas anti-necrosantes	Doses minimas anti-letaes	Doses minimas anti-sympto-tetanizantes
Cavallo 80 (anatoxina 630 cc.)	$\frac{12.000}{160}$		$\frac{75}{1}$	
Cavallo 81 (anatoxina 630 cc.)	$\frac{26.000}{160}$		$\frac{162}{1}$	
Cavallo 82 (anatoxina 630 cc.)	$\frac{16.000}{160}$		$\frac{> 75 < 100}{< 1}$	
Cavallo 81 (anatoxina 630 cc. — toxina 160 cc.)	$\frac{36.000}{180}$	$\frac{> 2.500}{12.5}$	$\frac{200}{1}$	$\frac{2.500}{12.5}$
Cavallo 82 (anatoxina 630 cc. — toxina 160 cc.)	$\frac{16.000}{200}$	$\frac{> 800}{10}$	$\frac{> 60 < 80}{< 1}$	$\frac{800}{10}$

Legenda: o numerador da fracção representa o numero de unidades antitoxicas por cc.; o denominador da fracção dá o numero de unidades correspondentes a 1 unidade anti-letal.

Quanto aos efeitos leucocytolytico, coagulante do plasma, fibrinolytico e acção gastro-intestinal, cujos estudos até agora realizados demonstram correr por conta de principios activos distinctos, somente pesquisas ultteriores poderão esclarecer melhor o assumpto.

IV — Propriedades geraes: resistencia ao calor, á luz, ao envelhecimento; acção dos acidos do alcool e do formol; adsorpção pelo caolim e pelo alume; filtração, concentração e dessecamento.

A toxina estaphylococcica mostra fraca estabilidade, perdendo sua actividade á medida do envelhecimento. A acção erythrocytoxica é a que se mostra inicialmente mais attingida, podendo mesmo perder grande parte de sua actividade sem que as demais acções mostrem uma destruição estrictamente parallela.

Burky (3), com filtrados abandonados á temperatura ambiente, cerca de 1 anno depois, ainda observou acção mortal para o coelho, enquanto que o poder erythrocytolytico se mostrava bastante diminuido ou quasi nullo. Certas de nossas toxinas, conservadas em frascos escuros na geladeira e sob toluol, perderam grande parte do seu poder hemolytico e tetanizante, já no fim de 2 meses; outras conservaram sua actividade por periodo superior (70 dias), embora esse facto aconteça menos frequentemente. Exposta á luz e á temperatura do laboratorio a perda é bem mais rapida. A toxina congelada conserva-se quasi que indefinidamente. No estado secco, a toxina conserva por muito tempo todas as suas actividades. Mesmo a acção erythrocytotoxica, que se mostra geralmente mais diminuida, soffre nesse estado uma baixa relativamente pequena, após 6 meses. O dessecamento pode ser feito, tanto no vacuo, sob a acção do acido sulfurico, como na estufa a 37.º por 24-48 horas, ou ainda submettida a uma corrente constante de ar quente e de temperatura entre 25-30.º. Uma corrente de ar aquecido a 40-45.º, por 24 horas, destroe quasi totalmente as actividades erythrocytolytica e tetanizante do filtrado. (Temos em estado secco, sob chloreto de calcio, toxinas de mais de 1 anno que ainda conservam os seus efeitos toxicos: 0,000125 produz a syndroma tetanizante na cobaia e 0,0000625 hemolysa 0,5cc. de hematias de carneiro a 2%.

A toxina estaphylococcica submettida á acção do calor, conforme a temperatura, perde parcial ou totalmente seus effeitos toxicos.

A 55.º por 15 minutos, uma toxina que doseava 3.200 M. H. por cc., passa a dosear 1.600 M. H. por cc.. Prolongando-se o aquecimento por 30 minutos, o titulo cahe a 800, e, por 1 hora, vem a 200 M. H.. A essa mesma temperatura, durante 30 minutos, o poder necrosante é apenas alterado, mas, por 1 hora, o titulo cahe de metade, provocando placa de necrose, rubor e edema bastante

diminuidos. A essa temperatura, por 1 hora, o effeito tetanizante ainda se mantem quando se inocula 0,2cc. da toxina pura.

A 75.º por 15 minutos, o titulo erythrocytolytico baixa a 800 M. H.; por 30 minutos vem a 400; por 1 hora cahe entre 100 e 200 M. H.. O effeito tetanizante a essa temperatura, por 1 hora, diminue de intensidade, observando-se contudo a syndroma tetanizante na dose de 0,2 cc., mas os animaes retomam o equilibrio em poucos minutos, alguns resistindo á morte nas 24 horas. O poder necrosante, nessa mesma temperatura e espaço de tempo, baixa a 1/3 do titulo, notando-se a placa necrosada muito diminuida de extensão, bem como o rubor e o edema.

A 100.º durante 5 minutos, o poder erythrocytolytico de 3.200 M. H. cahe abaixo de 100 e, prolongando-se o aquecimento por 10 minutos, baixa a 0. A 100.º por 5 minutos, é destruida toda actividade necrosante, mortal e tetanizante da toxina.

Os acidos fortes destroem o poder toxico dos filtrados. Nélis (37) que estudou o assumpto, encontrou que o H₂SO₄ e o HCl a 5% e a 37.º, destroem completamente a toxina em algumas horas. A 1% e após 24 horas a 37.º, os resultados seriam identicos. O acido acetico a 5% destruiria a toxina somente após 24 horas. O acido tartarico e lactico a 1% e a 5%, não modificariam o poder toxico em 10 dias.

O formol a 0,1% por 24 horas a 37.º, faz baixar a acção erythrocytolytica, mas o poder necrosante ainda é em parte conservado. A 0,3% e 0,4%, a baixa é bem maior nas 24 horas, e, nas 48 horas, o titulo hemolytico baixa a 10 M. H.; 5 cc. por via intravenosa não matam o coelho, mas 0,25 da toxina, por via intradermica, ainda produzem necrose de 1 x 1 cm. de extensão; nesta mesma dose, ainda provoca a syndroma tetanizante na cobaia, esta porem de pequena intensidade, resistindo a maioria dos animaes nas 24 horas. Ajustando-se o pH da toxina para 8,5 e addicionando-se formol a 0,4%, mantendo-se na temperatura de 37.º, a desintoxicação é bem mais rapida.

A filtração retem parte dos principios activos das culturas de estaphylococcus. A estaphylo-coagulase, por exemplo, é retida em grande parte, quando as culturas são filtradas em velas Chamberland. A acção tetanizante mostra um limite de actividade maior nas culturas apenas centrifugadas do que nas culturas filtradas. O mesmo acontece, em menor escala, com as acções necrosante e mortal. Velas Mandler e Berkefeld filtram melhor a toxina. Em discos Seitz, os resultados são superiores a todos os demais.

Pesquisas de adsorpção pelo caolim, talco e alume mostraram-nos que a toxina é facilmente adsorvida por essas substancias. A adsorpção pelo caolim

processa-se já no fim de 2 horas, periodo em que grande parte (cerca de 90%) da toxina é adsorvida. Os resultados da adsorção da actividade tetanizante de 5 cc. de uma toxina por 1,0 gr. de caolim, são expostos no Quadro 14. Vê-se que uma toxina cuja actividade tetanizante se elevava á diluição de 1/40, exposta á adsorção pelo caolim, em 10 minutos, baixou a actividade para a diluição a 1/10 e após 2 horas de contacto somente 0,2 da toxina pura produziram a syndroma tetanizante. Com 24 horas de contacto somente a dose de 0,4 cc. da toxina pura foi capaz de produzir a syndroma, com morte do animal após algumas horas. Suspenso o precipitado em caldo Walbum esteril de pH 6,8 — 7,0, não conseguimos reaver a toxina, o que foi conseguido em parte com salina alcalinizada a pH 8,2.

O hydrato de aluminio preparado segundo a technica C de Willstätter, Krant e Erbacher (69), adsorve a toxina na sua quasi totalidade, mas o eluato com a solução de phosphato não foi conseguido em 2 manipulações.

O alcool absoluto precipita a toxina na proporção de 8 volumes de alcool para 1 de toxina, mas o contacto prolongado do alcool destroe em grande parte o principio toxico.

Dos processos que temos empregado para a concentração da toxina, o melhor é sem duvida o do dessecamento. Este pode ser realizado sem perdas accentuadas, tanto a 37.º por 24 horas, em placas e em camada bem fina, ou sob a acção de uma corrente de ar aquecida a 30.º, por 24-48 horas, quanto no vacuo, sob a acção do acido sulfurico, sendo mantida a tiragem constante afim de evitar a acção deleteria dos vapores do acido. Pelos resultados registados no Quadro 15, verifica-se que a perda da actividade tetanizante da toxina submetida a estes dois processos de dessecamento é relativamente pequena. Neste mesmo quadro é dado o limite de actividade tetanizante da toxina completamente dessecada por uma corrente de ar aquecida a 30.º, por 48 horas, calculada em peso. Vê-se que um pouco mais de 1 decimo de milligrammo do pó é necessario para provocar a syndroma tetanizante na cobaia. A unidade erythrocytolytica desta toxina dessecada foi de 0,0000625, do pó.

V — Produccão da toxina *in vivo*.

Para a comprovação definitiva de que o estaphylococco elabora uma toxina soluvel no organismo infectado, seria de interesse verificar si, nos exsudatos de coelhos ou outros animaes inoculados com culturas, se encontraria esse producto toxico. A elaboração *in vivo* da toxina viria assim comprovar o papel toxico dessa bacteria, já evidenciado pelas observações clinicas demonstrativas da profunda intoxicação que acompanha certas septicemias estaphylococcicas, algumas mostrando no mecanismo da morte uma perfeita analogia com o que se observa após a inoculação da toxina por via intravenosa em animaes.

QUADRO 14

Adsorção pelo caolim.

(5 cc. de toxina + 1,0 gr. de caolim. Agitação constante, verificação no liquido sobrenadante após centrifugação).

Diluições	Volume inoculado	Acção tetanizante inicial	Após 10 minutos de contacto	Após 2 horas de contacto	Após 24 horas de contacto	
					com 0,5 de caolim	com 1,0 de caolim
Pura	0.4					$\frac{++ 17'}{+ 6/12'}$
Pura	0.2	$\frac{++ 1'}{+ 18' \text{ H. N.}}$	$\frac{++ 4'}{+ 1/16'}$	$\frac{++ 15'}{+ N}$	$\frac{++ 3'}{+ 15' \text{ H. N.}}$	$\frac{+ 41'}{S}$
1/5	0.2			0/S		0/S
1/10	0.2	$\frac{++ 6'}{+ 2/12'}$	$\frac{+ 24'}{+ N.}$		$\frac{+ 39'}{S}$	
1/20	0.2	$\frac{++ 9'}{+ 2/9'}$	0/S		0/S	
1/40	0.2	$\frac{+ 22'}{+ N.}$				
1/50	0.2	0/S				

0 = nenhum symptoma; + = symptomas cerebellares sem queda tetanizante;
 ++ = queda tetanizante definitiva; S = sobrevida em 5 dias;
 † 2/9' = morte em 2 horas e 9 minutos.

QUADRO 15

Concentração da toxina

Actividade tetanizante inicial				Concentração á estufa a 37° por 24 horas, de \pm 5 vezes					Concentração no vacuo, temperatura ambiente sob a acção do acido sulfurico e tiragem constante, por 24 horas, de \pm 10 vezes.					Toxina dessecada sob a acção de uma corrente de ar aquecida a 30°. Acção tetanizante avaliada em peso.	
Diluição	Volume inoculado em cc.	Quantidade absoluta de toxina em cc.	Resultados	Diluição	Volume inoculado em cc.	Quantidade absoluta de toxina concentrada em cc.	Quantidade absoluta de toxina original em cc.	Resultados	Diluição	Volume inoculado em cc.	Quantidade absoluta de toxina original em cc.	Quantidade absoluta de toxina concentrada em cc.	Resultados	Quantidade (em peso) inoculada em 0.2 cc. de salina	Resultados
1/5	0.2	0.04		1/5	0.2	0.04	0.2	$\frac{++ 3'}{\dagger 3/10'}$	1/50	0.2	0.004	0.04	$\frac{++ 7'}{\dagger 23' \text{ H. N.}}$	0.001 mgr.	$\frac{++ 8'}{\dagger \text{ N.}}$
1/10	0.2	0.02	$\frac{++ 6'}{\dagger 4/32'}$	1/50	0.2	0.004	0.02	$\frac{++ 16'}{\dagger \text{ N.}}$	1/100	0.2	0.002	0.04	$\frac{++ 18'}{\dagger 5/42'}$	0.000124	$\frac{++ 18'}{\dagger \text{ N.}}$
1/20	0.2	0.01	$\frac{++ 16'}{\dagger 5/42'}$	1/100	0.2	0.002	0.01	$\frac{++ 1/32'}{\dagger \text{ N.}}$	1/200	0.2	0.001	0.01	$\frac{++ 22'}{\dagger 5/0}$	0.0001	$\frac{+ 57'}{\text{ S}}$
1/30	0.2	0.0066	$\frac{++ 23'}{\dagger \text{ N.}}$						1/300	0.2	0.00066	0.0066	0/S	0.000075	O/S
1/40	0.2	0.005	$\frac{+ 2/8'}{\dagger \text{ N.}}$	1/200	0.2	0.001	0.005	0/S	1/400	0.2	0.0005	0.0005	0/S	0.00005	O/S
1/50	0.2	0.004	0/S												

Legenda: 0 = nenhum symptoma; + = symptomas cerebellares sem queda tetanizante;
 ++ = queda tetanizante definitiva; S = sobrevida em 5 dias;
 † 2/9' = morte em 2 horas e 9 minutos.

QUADRO 16

Elaboração da toxina *in vivo*

Coelhos	Dose e Via	Exsudatos colhidos	Poder hemolytico para hemacias de carneiro					Poder necrosante					Poder tetanizante					Verificação da esterilidade		
			1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	Exsudato		Exsudato + antitoxina			Exsudato		Exsudato + antitoxina					
								Dose	Resultados	Dose exs.	Dose antitox.	Resultados	Dose	Resultados	Dose exs.	Dose antitox.	Resultados			
2	intra-venosa 0.2 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	3+	4+	4+	0.1	e + v + n -					0.3	S +					Esteril
		Peritoneal	H. C.	H. C.	H. C.	2+	4+	0.1	e + v + n -	0.1	1 gotta	e + v + n -	0.3	++ 8' †					>	
		Pleural	3+	4+	4+	4+	4+	0.2	e - v - n -				0.5	O †					>	
36	intra-venosa 0.5 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	H. C.	H. C.	H. C.	0.1	e + v + n +	0.1	1 gotta	e + v + n -	0.2	++ 6' †	0.2	1 gotta	O S		>	
		Peritoneal	H. C.	H. C.	H. C.	1+	4+	0.1	e + v + n -										>	
		Pleural	2+	4+	4+	4+	4+	0.2	e + v - n -				0.3	O †					>	
29	intra-venosa 0.5 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	H. C.	H. C.	2+	0.2	e + v + n -	0.2	1 gotta	e - v - n -		+					>	
		Pleural	2+	4+	4+	4+	4+	0.3	e + v - n -				0.3	O S					>	
58	intra-venosa 0.5 cc.	Pericardico						0.3	e + v + n -					0.3	++ 5' †				>	
		Pleural	H. C.	H. C.	4+	4+	4+	0.3	e + v + n -				0.3	O †					>	
		Peritoneal						0.3	e + v + n +				0.3	O S					>	
60	intra-venosa 0.5 cc.	Pericardico	H. C.	H. C.	2+	4+	4+	0.2	e ++ v + n ++											
		Pleural	H. C.	H. C.	4+	4+	4+	0.3	e ++ v + n +				0.3	++ 16' S					>	
		Peritoneal	H. C.	H. C.	3+	4+	4+	0.3	e ++ v + n ++				0.3	++ 3' † 10' H. N.	0.25	1 gotta	O S		>	
47	intra-venosa 0.5 cc.	Peritoneal						0.2	e ++ v + e ++					0.25	++ 1' † N.	0.25	1 gotta	O S		>

Legenda:

-- = negativo			
ação necrosante	e = edema	{	+ menos de 1 cc. + entre 1 e 2 cc. ++ mais de 2 cc.
	v = rubor	{	+ muito ligeiro + perceptível ++ accentuado
	n = necrose	{	+ muito ligeira + placa de 1 cm. ++ placa de mais de 1 cm.
		ação tetanizante	
			++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos e morte nas 24 horas.
			O = nenhum symptoma nos 30 primeiros minutos de observação.
			+ = symptomas cerebellares.
			† = morte em 48 horas.
			H. N. = hemorragia nasal.

As nossas experiencias neste particular constaram de inoculações em coelhos, por via venosa, e, em camondongos, por peritoneal, de 0,5 cc. de emulsão de uma cultura em agar de 20 horas de um estaphylococco virulento, previamente lavada com salina e estandardizada ao No. 3 da escala de Mac Farlum. Após a morte dos animaes, o que occorria geralmente entre 12 e 48 horas, colhiam-se os exsudatos peritoneal, pleural e pericardico, recebendo-os em pequenos tubos sob uma camada de toluol. Vinte e quatro horas depois, ao mesmo tempo que era feita uma prova de esterilidade por sementeira em caldo de uma gotta de cada exsudato, procedia-se ás verificações das propriedades hemolytica, necrosante e tetanizante, e á neutralização das mesmas pela antitoxina. O Quadro 16 mostra os resultados destas differentes provas. Este quadro regista somente os resultados positivos, tendo-se verificado, em 5 outros animaes do mesmo modo inoculados, nenhum resultado toxico dos exsudatos.

Com alguns exsudatos daquelles animaes observámos placas de necrose por vezes muito nitidas, embora na maioria das vezes somente fosse observado edema e rubor. O effeito tetanizante verifica-se com mais nitidez, morrendo a maioria dos animaes nas 24 horas após a inoculação. A antitoxina neutraliza esses effeitos toxicos dos exsudatos.

Estes resultados são demonstrativos da elaboração da toxina *in vivo*.

VI — Poder antigenico da toxina: antitoxina estaphylococcica. *a)* vias de immunização experimental; *b)* neutralização das varias acções toxicas da toxina; *c)* relações quantitativas do poder de neutralização das varias acções toxicas; *d)* immunização activa e passiva e acções toxicas dos filtrados; *e)* poder curativo da antitoxina em relação aos effeitos toxicos da toxina.

Os filtrados das culturas de estaphylococcus, quando inoculados repetidas vezes em animaes, provocam a formação de uma antitoxina que neutraliza todas as acções toxicas da toxina. Esta antitoxina, já assignalada por varios auctores, foi estudada minuciosamente por Burnet (1) e posteriormente por Parish e Clark (48 e 49), Panton, Valentine e Dix (51 e 52), Dolman (12) e outros, resaltando desse estudo a identidade antigenica de filtrados oriundos de varias amostras de estaphylococcus.

a) Vias de immunização — Repetindo as inoculações de pequenas quantidades de toxina, pelas vias subcutaneas e intradermica, em coelhos, conseguem-se obter titulos antitoxicos por vezes accentuados. Os animaes injectados por via venosa, mostram-se difficilmente immunizaveis, não supportando na maioria das vezes as inoculações de doses crescentes de toxina. Parker já tinha mostrado esse facto, mas Burnet diz ter conseguido uma immunização pe-

quena de animaes inoculados por esta via, com doses sub-letaes de toxina. Quatro coelhos por nós ensaiados, com 2 inoculações de 0,1cc. de uma toxina que matava em 1 hora 1 K. de coelho com 0,5cc., não resistiram a uma terceira inoculação de 0,25cc. da mesma toxina. Por esta via, mesmo em imunização com anatoxina que, por ser atóxica, permite inoculações de doses crescentes e elevadas do filtrado (ver os resultados mais adiante), não conseguimos resultados satisfactorios, pois os soros dos animaes (coelho) mostraram poder de neutralização quasi nullo. Na imunização de coelhos por via intradérmica e subcutânea, as injeções de toxina foram feitas com intervallos de 4 dias e em doses crescentes, tendo sido feitas 4 e 5 inoculações. Sangramos os animaes 8 dias após a ultima injeção e os soros foram ensaiados sob o ponto de vista da neutralização das acções erythrocytolytica, necrosante, tetanizante e letal da toxina.

b) *Neutralização das varias acções toxicas da toxina* — Os nossos primeiros ensaios visaram a avaliação da capacidade de neutralização dos diferentes soros dos coelhos inoculados em relação a uma quantidade fixa de toxina. Para isso, foi tomada a quantidade de 1 cc. de uma toxina bem activa, á qual eram adicionados 1, 0,5 0,1 e 0,05 cc. e 0,01 dos soros a dosear, completando-se com salina o volume final de cada tubo para 2cc.. Com essas diferentes misturas, após incubação em banho-maria a 37.º por 1 hora, foram feitas as provas da maneira seguinte: para avaliação do poder anti-erythrocytolytico tomavamos 0,5 cc. da diluição a 1/5 dessas diferentes misturas e adicionavamos 0,5 cc. de uma emulsão de hematias a 2%, renovando-se a incubação por mais 1 hora, sendo a leitura final realizada 24 horas depois, tendo os tubos permanecido durante este tempo na geladeira; a prova do poder anti-necrosante foi realizada por inoculações intradérmicas no coelho, de 0,1 cc. tambem da diluição a 1/5 dessas diferentes misturas; a avaliação do poder anti-tetanizante foi feita pela inoculação transocular de 0,25 cc. dessas mesmas misturas, e, finalmente, a prova do poder anti-letal, inoculando-se 1,5 5cc. das misturas por via venosa em coelhos de mais ou menos 1 K.. O Quadro 17 resume os resultados obtidos. O soro do coelho No. 7, de todos o que se mostrou mais activo, neutralizando na dose de 0,1cc. a quantidade de 1 cc. da toxina bem activa (0,25 cc. matavam 1 K. de coelho em 1 hora e 0,2cc. da diluição a 1/30 provocavam a syndroma tetanizante definitiva na cobaia), foi colhido de um animal que já na primeira inoculação intradérmica da toxina mostrou necrose pequena (1,0 x 2,0cm) e, nas demais, somente edema e ligeiro rubor. Esse animal, mostrando antecipadamente menor sensibilidade a inoculações intradérmicas da toxina, comparativamente aos demais que revelaram lesões necrosantes extensas, embora gradativamente menores, faz-nos pensar numa immuidade anterior, natural ou adquirida. A neutralização de todas as acções toxicas do filtrado por todos os soros ensaiados foi evidente, revelando os varios soros maior ou menor poder de neu-

QUADRO 17

Poder neutralizante de soros de animais imunizados com toxina para as acções erythrocytolytica, necrosante, tetanizante e letal da toxina

Coelhos	Via de imunização	No. de inoculações	Total de toxina inoculada em cc.	1 cc. toxina + 0.1 cc. soro				1 cc. toxina + 0.5 cc. soro				1 cc. toxina + 0.1 cc. soro				1 cc. toxina + 0.05 cc. soro				1 cc. toxina + 0.01 cc. soro			
				acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção letal
7	Intra-dermica	3	0.85	N. C.	0			N. C.	0	$\frac{O}{S}$	S	H +	0.1x0.2	$\frac{O}{S}$	S	H+++	3.5x3.0	$\frac{++ 4'}{\dagger 1/31}$		H. C.	5.0x2.0		† 17'
57	Sub-cutanea	4	1.85	N. C.	0			N. C.	0	$\frac{O}{S}$	S	H ++	1.5x1.5	$\frac{O}{S}$	S	H. C.				H. C.			
52	Sub-cutanea	4	1.85	N. C.	0			N. C.	0	$\frac{O}{S}$		H+++	0.3x0.2	$\frac{++ 14'}{\dagger 3/8'}$		H. C.	3.0x2.3		† 11'	H. C.			
17	Intra-dermica	5	1.6	N. C.	0	$\frac{O}{S}$	S	N. C.	0	$\frac{O}{S}$	S	H+++	1.0x1.5	$\frac{++ 5'}{\dagger N.}$	† N.	H. C.				H. C.			† 8'
11	Intra-dermica	4	1.85	N. C.	0			H. +	0.5x1.0	$\frac{+ 1/23'}{\dagger N.}$	S	H. C.	5.5x1.0	$\frac{++ 7'}{\dagger 39' H. N.}$	† 2/3'	H. C.				H. C.			
Teste-munha				H. C.	3.5x2.5	$\frac{++ 3'}{\dagger 17' H. N.}$	† 7'	H. C.				H. C.				H. C.				H. C.			

Legenda: N. C. = neutralização completa
 H. + = 25 % de hemolyse
 H. ++ = 50 % de hemolyse
 H. +++ = 75 % de hemolyse
 H. C. = Hemolyse completa

$\frac{O}{S}$ = nenhum symptoma tetanizante, sobrevida em 5 dias
 $\frac{++ 14'}{\dagger 3/8'}$ = queda tetanizante em 14', morte em 3 hs. e 8 minutos
 $\frac{++ 3'}{\dagger 17' H. N.}$ = queda tetanizante em 3', morte em 17', hemolyse nasal
 † N. = morte durante a noite
 S = sobrevida em 5 dias de observação.

tralização. Por outro lado, o poder neutralizante de cada soro para as diferentes acções toxicas guarda uma relação constante, evidenciando assim a unidade antigenica da toxina.

c) *Relações quantitativas do poder ou neutralização das varias acções toxicas* — A avaliação quantitativa do poder neutralizante de soros de animaes immunizados, para as diferentes acções da toxina tomadas em suas diversas unidades (D. M. H.; D. M. N.; D. M. T.; D. M. L.), realizada com soros de cavallos em serviço de immunização industrial, está resumida no Quadro 13 e por esses resultados a identidade antigenica da toxina ficou mais uma vez comprovada.

d) *Immunização activa e passiva e acções toxicas dos filtrados* — Para a verificação na neutralização *in vivo* da toxina pela antitoxina, foram tomados animaes immunizados activa ou passivamente e submettidos á acção da toxina pelas vias intradermica, intravenosa e transocular.

Os coelhos immunizados activamente, cujos soros foram estudados anteriormente, foram submettidos á inoculações intradermica de toxina 14 dias depois da ultima injecção, e, 2 dias após, foram injectados por via intravenosa com uma quantidade de toxina que correspondia a 4 D. M. L. para 1 K. de coelho. O Quadro 18 mostra os resultados dessas provas. Somente o coelho No. 11, justamente o portador de soro menos activo, mostrou pequena necrose no ponto da pelle em que foi inoculado, sobrevivendo, entretanto, á dose por via venosa. Os demais mostraram-se immunes.

— Para demonstrar a neutralização *in vivo* em animaes immunizados passivamente, tomámos diferentes coelhos e cobaias que foram submettidos á inoculações de diversas quantidades de antitoxina, sendo posteriormente provados ás acções dermatoxica e mortal e tetanizante da toxina.

1) *acção necrosante* — Dez coelhos foram inoculados por via subcutanea com diversas quantidades de uma antitoxina concentrada, preparada em cavallo, doseando 750 unidades tetanizantes (doseamento pelo nosso methodo, vide mais adiante); 1, 4 e 8 dias depois, receberam por via intradermica, 0,1 cc. de uma toxina que, nessa quantidade, produziu uma lesão necrosante extensa em coelho. Os resultados que se veem no Quadro 19, mostram nos coelhos submettidos á prova, no dia immediato d ainoculação da toxina, ligeiras reacções, sobretudo edema, não se chegando a observar a necrose nitida, o que se verificou no coelho testemunha. Essas reacções mostraram-se muito mais attenuadas, quasi nullas, nos coelhos inoculados com 4 dias de intervallo, quando a absorpção da antitoxina foi completa. Porém, nos ensaios realizados com 8 dias de intervallo, as lesões mostraram-se extensas, com necrose accentuada, demonstrando a eliminação total ou quasi total da antitoxina.

2) *acção mortal* — Coelhos immunizados passivamente com 0,5 cc., 1, 2 e 5 cc. da mesma antitoxina concentrada, preparada em cavallo, foram submet-

QUADRO 18

Coelhos immunizados activamente e submettidos a inoculações intradermica e intravenosa de toxina.

Coelhos	Via de immunização	No. de inoculações	Quantidade de toxina inoculada em cc.	Prova de acção necrosante, 14 dias após a ultima inoculação com		Prova do poder mortal 16 dias após a ultima inoculação com 4 D. M. L.
				0.1 da diluição da toxina a 1/5	0.1 da diluição da toxina a 1/2	
57	subcutanea	4	1.85	0	0	S
52	subcutanea	4	1.85	0	0	S
17	intradermica	5	1.6	0	0.2 x 0.2	S
11	intradermica	4	1.85	1.0 x 0.5	1.0 x 1.0	S
Testemunha	—	—	—	3.5 x 2.5	3.7 x 3.0	† 7'

tidos á prova do poder mortal da toxina, inoculada por via venosa, em dose que matava 1 K. de coelho em menos de 20 minutos. O Quadro 20 mostra os resultados nos animaes assim immunizados e posteriormente submettidos á prova da acção mortal da toxina, decorridos 2, 5 e 9 dias após a inoculação da antitoxina. Os animaes ensaiados com 48 horas de intervallo resistiram nos 5 dias de observação, demonstrando assim uma immunização completa. Dos que receberam toxina após 5 dias, somente 1 coelho, que foi immunizado com uma dose elevada (5 cc.) resistiu aquelle periodo, enquanto que os demais immunizados com doses menores mostraram um tempo de morte muito mais prolongado do que os testemunhas. Os coelhos inoculados após 9 dias morreram nas 24 horas.

3) *acção tetanizante* — O poder preventivo da antitoxina estaphylococcica em relação ao effeito tetanizante da toxina, foi verificado experimentalmente, obedecendo-se ao seguinte criterio: inoculações da antitoxina e da toxina misturadas no momento da injecção e inoculações da antitoxina por differentes vias,

QUADRO 19

Immunização passiva e ação necrosante da toxina

No. dos coelhos	Dose de antitoxina concentrada	Dose de toxina inoculada após 24 horas	Resultado nas 48 horas			Dose de toxina inoculada após 4 dias	Resultado no 5.º dia			Dose de toxina inoculada após 8 dias	Resultado no 9.º dia		
			Edema	Vermelhidão	Necrose		Edema	Vermelhidão	Necrose		Edema	Vermelhidão	Necrose
19	0.5	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	$\frac{+}{+}$	0 +	0 0								
9	0.5					0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	0 $\frac{+}{+}$	0 0	0 0				
30	0.5									0.1 Tox. pura	++	++ 9.0 x 2.0	
32	1 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	+ ++	+ +	0 $\frac{+}{+}$								
29	1 cc.					0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	$\frac{+}{+}$ +	0 +	0 $\frac{+}{+}$			++	
15	2 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	$\frac{+}{+}$ +	0 $\frac{+}{+}$	0 $\frac{+}{+}$								
7	2 cc.									0.1 Tox. pura	++	+ +	
22	2 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura								0.1 Tox. pura	++	+ ++ 1.8 x 1.0	
3	5 cc.		0 +	0 $\frac{+}{+}$	0 $\frac{+}{+}$								
55	5 cc.	0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura				0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	0 +	0 0	0 0				
Test.			++ ++	+ ++	++ ++								
Test.						0.1 Tox. a 1/5 0.1 Tox. pura	++ ++	++ ++	++ ++ 2.8 x 3.0				
Test.										0.1 Tox. pura	++	++ ++ 3.0 x 3.2	

Legenda: 0 = nenhum symptoma

$\frac{+}{+}$ = menor de 1 cc.
 + = entre 1 e 2 cc.
 ++ = maior de 2 cc.

Vermelhidão

$\frac{+}{+}$ = muito ligeira
 + = perceptível
 ++ = accentuada

Necrose

$\frac{+}{+}$ = muito ligeira
 + = placa de 1 cc.
 ++ = placa de mais de 1 cc.

No. dos coelhos	Dose de antitoxina concentrada	Inoculação com toxina (via venosa)		Resultados nos 5 dias de observação				
		Dias decorridos após a inocul. da antitoxina	Dose toxina por K.	1 M. T. N.	2 M. T. N.	3 M. T. N.	4 M. T. N.	5 M. T. N.
19	0.5 cc.	2 dias	1 cc.					S
9	0.5 cc.	5 dias	1 cc.		†			
30	0.5 cc.	9 dias	1 cc.	† 1 h. após				
32	1 cc.	2 dias	1 cc.					S
29	1 cc.	5 dias	1 cc.		†			
15	2 cc.	2 dias	1 cc.					S
7	2 cc.	9 dias	1 cc.		†			
22	2 cc.	9 dias	1 cc.	†				
55	5 cc.	5 dias	1 cc.					S
Testemunha	—	—	1 cc.	† 12 minutos após				
»	—	—	1 cc.	† 16 minutos após				
»	—	—	1 cc.	† 7 minutos após				

sendo os animaes, em tempos diversos, posteriormente submettidos por via transocular á acção tetanizante da toxina; as vias empregadas para a inoculação da antitoxina foram a transocular, a cisternal, a lombar e a subcutanea.

I — *inoculações misturadas* — Tomavamos 0,2 cc. da diluição da toxina que correspondia a 2 L † (ver a determinação da L † no doseamento da antitoxina) e 0,2 cc. da diluição da antitoxina que correspondia a 10 e a 150 unidades neutralizantes (doseada pelo nosso methodo) e injectavamos, immediatamente após a mistura feita na propria seringa e no momento da inoculação em 2 series de cobaias. O Quadro 21 mostra que, enquanto as cobaias testemunhas soffrem a queda tetanizante logo após a inoculação das 2 L † da toxina e morrem pouco depois, as cobaias da 1.^a serie, inoculadas com essa quantidade de toxina de mistura com as 10 unidades de antitoxina, mostraram somente alguns signaes da syndroma, sem queda tetanizante definitiva, morrendo 2 cobaias durante a noite e sobrevivendo as outras nos 5 dias de observação. Na 2.^a serie, porém, com 150 unidades de antitoxina, as 4 cobaias inoculadas com a mistura nada apresentaram, sobrevivendo todas nos 5 dias de observação. A avidéz da antitoxina pela toxina, nestas experiencias, mostrou-se evidente.

II — *inoculações separadas com 10 minutos de intervallo* — A antitoxina foi inoculada por via transocular, num volume de 0,2 cc., correspondendo a 10 e a 150 unidades neutralizantes e a toxina, 10 minutos após, foi injectada pela

QUADRO 21

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina.

1) Antitoxina e toxina misturadas no momento da inoculação.

Toxina	Unidades Antitoxina	Cobaias experimentadas				Testemunhas
2 L †	10	$\frac{+ 9'}{\dagger N.}$	$\frac{+ 56'}{\dagger N.}$	$\frac{+}{S}$		$\frac{++ 1'}{\dagger 1/17'}$
2 L †	150	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{++ 1'}{\dagger 2/20'}$

Legenda :

- 0 = nenhum symptoma.
- + = symptomas cerebellares, sem queda tetanizante definitiva.
- ++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos.
- S = sobrevida em 5 dias de observação.
- † 2/1 = morte após 2 horas e 1 minuto.

mesma via na dose de 2 L †. O Quadro 22 mostra os resultados destas 2 series. Na 1.^a serie, sem que fosse evitada a syndroma tetanizante das cobaias, contudo notou-se o tempo de queda e de morte mais prolongado, relativamente á testemunha. Na 2.^a serie, porém, todas as cobaias inoculadas mostraram protecção completa.

III — *inoculações separadas com 1 hora de intervallo* — Nestas experiencias, a antitoxina foi inoculada pelas vias transocular, cisternal e lombar, e a toxina, 1 hora depois, por via transocular, na dose correspondente a 2 L †. Usámos cobaias para as experiencias do poder preventivo da antitoxina por

QUADRO 22

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina.
a) Inoculações separadas, com 10 minutos de intervallo.

Toxina	Unidades Antitoxina	Cobaias experimentadas				Testemunhas
2 L †	10	$\frac{++ 8'}{\dagger 48 \text{ hs.}}$	$\frac{++ 12'}{\dagger N.}$			$\frac{++ 1'}{\dagger 2/2'}$
2 L †	150	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{++ 1'}{\dagger 2/21'}$

Legenda: 0 = nenhum symptoma.
+ = symptomas cerebellares sem queda tetanizante definitiva.
++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos.
S = sobrevida em 5 dias de observação.
† 2/1' = morte após 2 horas e 1 minuto.

via transocular e coelhos para as series de inoculações pelas vias cisternal e lombar.

O Quadro 23 regista os resultados das experiencias. Com 10 unidades da antitoxina por qualquer das vias inoculadas, não se verificou a protecção dos animaes, enquanto que com 75 e 150 unidades pelas vias cisternal ou transocular os animaes mostraram-se protegidos, sobrevivendo a maioria delles nos 5 dias de observação. Os coelhos inoculados com antitoxina por via lombar apresentaram symptomas tetanizantes definitivos e morreram nas 24 horas. Procurando verificar a causa dessa falta de protecção, procedémos a inoculações de antitoxina corada pela fuchsina por via lombar em coelhos, e, 1 hora após a inoculação, pela abertura do canal racheano, verificámos que somente a parte

QUADRO 23

Poder preventivo da antitoxina em relação ao efeito tetanizante da toxina.

3) Inoculações separadas com 1 hora de intervalo.

Toxina	Antitoxina		Cobaias e coelhos experimentados							Testemunhas
	Unidades	Via								
2 L †	10	transocular	$\frac{++ 8'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 10'}{\dagger 1/13'}$	$\frac{++ 3'}{\dagger 1/17'}$					$\frac{++ 1'}{\dagger 1/12'}$
2 L †	150	transocular	$\frac{+ 20'}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{+ 36'}{\dagger N.}$					$\frac{++ 1'}{\dagger 1/14'}$
2 L †	10	cisternal	$\frac{++ 3'}{\dagger 4/22'}$	$\frac{++ 7'}{\dagger N.}$	$\frac{+ 6'}{\dagger N.}$	$\frac{+ 8'}{\dagger N.}$				$\frac{++ 1'}{\dagger 1/11'}$
2 L †	75	cisternal	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{+ 4'}{S}$					$\frac{++ 1'}{\dagger 2/2'}$
2 L †	75	lombar	$\frac{\dagger 4'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 3'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 4'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 7'}{\dagger 2/5'}$	$\frac{++ 5'}{\dagger 31'HN}$	$\frac{++ 7'}{\dagger 1/10'}$		$\frac{++ 3'}{\dagger N.}$

NOTA: As experiências pelas vias cisternal e lombar foram realizadas em coelhos e as pela via transocular, em cobaias.

Legenda: Idêntica à do quadro 21.

da medulla mais proxima do ponto da inoculação se mostrava corada; mesmo augmentando a quantidade do liquido corado para 1 cc., verificámos somente a coloração de 2/3 da medulla naquelle espaço de tempo. Isso nos indica que pela via lombar, a antitoxina não chegou a banhar os centros nervosos superiores, donde não ter sido verificada a neutralização da toxina.

IV — *inoculações separadas com 3 e 6 horas de intervallo* — Seis cobaias inoculadas por via transocular com 150 unidades de antitoxina divididas em 2 grupos de 3, soffreram, decorridos 3 e 6 horas, a inoculação de 2 L † de toxina. No Quadro 24 reunimos os resultados. Como se vê, uma das 3 cobaias de cada serie não resistiu, enquanto que as demais não apresentaram symptomas e sobreviveram nos 5 dias de observação.

QUADRO 24

Poder preventivo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina

4) Inoculações separadas com 3 e 6 horas de intervallo.

Toxina	Unidades Antitoxina	Intervallos	Cobaias experimentadas			Testemunhas
			0	+ 17'	++ 4'	
2 L †	150	3 horas	$\frac{0}{S}$	$\frac{+ 17'}{S}$	$\frac{++ 4'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 1'}{\dagger 2/4'}$
2 L †	150	6 horas	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$	$\frac{+}{\dagger N.}$	$\frac{++ 1'}{\dagger 1/14'}$

Legenda:

0 = nenhum symptoma.

+ = symptomas cerebellares sem queda tetanizante definitiva.

++ 8' = queda tetanizante em 8 minutos.

S = sobrevida em 5 dias de observação.

† 2/1' = morte após 2 horas e 1 minuto.

V — *inoculações separadas com 24 horas de intervallo* — Nestas experiencias usámos para a inoculação da antitoxina as vias cisternal, transocular e subcutanea, provando a protecção dos animaes pela inoculação de 2 L † e com 2 D. T. M., da toxina, por via transocular, após 24 horas. O Quadro 25 mostra os resultados obtidos. Observa-se que, com a inoculação da antitoxina pelas vias cisternal e transocular, até um limite maximo de 280 unidades, e 24 horas após a toxina, não se conseguiu a protecção dos animaes, sendo provavelmente a absorpção da antitoxina sido feita naquelle espaço de tempo. Nas inoculações por via subcutanea, somente com dose ao redor de 3.750 unidades, foi conseguida uma protecção completa das cobaias.

QUADRO 25

Poder preventivo da antitoxina em relação ao efeito tetanizante da toxina.

5) Inoculações separadas com 24 horas de intervalo.

Toxina	Antitoxina		Cobaias experimentadas			Testemunhas
	Unidades	Via				
2 L †	100	transocular	$\frac{++ 23'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 8'}{\dagger N.}$		$\frac{++ 1'}{\dagger 3/22'}$
2 L †	100	cisternal	$\frac{+ 18'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 11'}{\dagger N.}$		
2 L †	200	transocular	$\frac{++ 8'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 7'}{\dagger N.}$		$\frac{++ 2'}{\dagger 2/31'}$
2 L †	200	cisternal	$\frac{+ 9'}{S}$	$\frac{++ 56'}{\dagger N.}$		
2 D.T.M.	280	transocular	$\frac{+ 18'}{\dagger N.}$	$\frac{++ 17'}{\dagger N.}$	$\frac{+ 43'}{S}$	$\frac{++ 5'}{\dagger 3/6'}$
2 D.T.M.	375	subcutanea	$\frac{+ 34'}{S}$	$\frac{++ 57'}{\dagger N.}$		
2 D.T.M.	750	subcutanea	$\frac{+ 15'}{\dagger N.}$	$\frac{+ 15'}{\dagger N.}$		$\frac{++ 7'}{\dagger N.}$
2 D.T.M.	1500	subcutanea	$\frac{+ 18'}{S}$	$\frac{++ 9'}{\dagger N.}$		$\frac{++ 5'}{\dagger 3/6'}$
2 D.T.M.	3750	subcutanea	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$		
2 L †	3750	subcutanea	$\frac{0}{S}$			$\frac{++ 1'}{\dagger 22' H.N.}$
2 D.T.M.	7500	subcutanea	$\frac{0}{S}$	$\frac{0}{S}$		$\frac{++ 5'}{\dagger 4/12'}$
2 L †	7500	subcutanea	$\frac{0}{S}$			

Legenda: Identica á do quadro 21.

VI — *inoculações separadas com 96 horas de intervallo* — Quatro cobaias inoculadas por via subcutanea, 2 com 3.750 unidades de antitoxina e outras 2 com 7.500 unidades, 96 horas após provadas com a inoculação de 2 L † de toxina, mostraram ainda protecção. Das 2 inoculadas com 3.750 unidades, 1 apresentou a queda tetanizante em 17 minutos e morte durante a noite, enquanto que a outra nada apresentou e sobreviveu nos 5 dias de observação. As duas outras inoculadas com 7.500 unidades nada apresentaram e sobreviveram naquelle periodo.

VII — *inoculações separadas com 10 dias de intervallo* — Uma cobaia inoculada com 3.750 unidades e 3 outras com 7.500 unidades, por via subcutanea, não resistiram, após 10 dias de inoculação, á prova realizada com 2 D. T. L. da toxina, por via transocular.

e) *Poder curativo da antitoxina em relação ao effeito tetanizante da toxina* — Na cobaia, uma vez declarada a syndroma tetanizante, mesmo que a intervenção com a antitoxina seja precoce, difficilmente se consegue o restabelecimento de todos os animaes. Com 100, 200 e 300 unidades de antitoxina, inoculadas pelas vias cisternal e transocular, não conseguimos restabelecer o equilibrio de 9 das 10 cobaias inoculadas com 1 L † da toxina, 5 minutos após a queda tetanizante. A unica cobaia que conseguiu restabelecer-se, retomou o equilibrio 48 minutos após a applicação de 200 unidades de antitoxina e sobreviveu nos 5 dias de observação, enquanto que as outras permaneceram em tetania definitiva, morrendo a maioria durante a noite da inoculação. O effeito curativo da antitoxina mostrou-se assim muito limitado, não pela falta da neutralização da toxina porventura livre no cerebro, mas pelo facto de não haver *restitutio ad integrum* das cellulas nervosas lesadas mais ou menos profundamente. Em cortes de cerebros de cobaias inoculadas com a toxina e mortas 4 a 5 horas depois, Maffey, dos laboratorios da Faculdade de Medicina de S. Paulo, encontrou a degeneração hydropica das cellulas nervosas, quer do cerebro, quer do cerebello, mais accentuada em certas zonas do que em outras. Em cortes de cerebros de cobaias que morreram muitas horas após a inoculação da toxina, zonas de intensa polychromatolyse, edema, por vezes com lyse accentuada do tecido, podem ser vistos principalmente nas proximidades da base do cerebro. Este effeito accentuadamente necrosante e lytico da toxina estaphylococcica, causador sem duvida da tetania da cobaia, e, quiçá, por analogia, responsavel pelas meningites estaphylococcicas do homem, lesando as cellulas nervosas anatomica e funcionalmente não deixa tempo á intervenção da antitoxina.

VII — Immunização activa e passiva e infecção sob condições experimentaes.

Um dos pontos mais interessantes destes estudos sobre a antitoxina estaphylococcica seria a verificação de sua actividade preventiva em relação ás septicemias. Panton, Valentine e Dix, que já tiveram occasião de experimentar a sua applicação em casos de septicemia do homem, colheram a impressão de um effeito neutralizante do principio toxico, não havendo influencia decisiva sobre a reproducção do estaphylococco *in vivo*. Jamieson (24), tambem em casos de septicemia, interpretou do mesmo modo o effeito da antitoxina. Burnet, em verificações sobre o poder preventivo na septicemia experimental do coelho, observou uma maior resistencia dos animaes immunizados, relativamente aos testemunhas, registando contudo um augmento do numero de germes na corrente circulatoria, tanto nestes, como naquelles.

Parece assentado então que a antitoxina não apresenta um effeito lytico ou de qualquer maneira nocivo ao germe em si, demonstrando exclusivamente um effeito antitoxico. Neste particular, haveria certa analogia com os estreptococcos que, segundo Parish e Okell (49) possuem 2 modos de ataque: um agudo pela toxina e um segundo, septico ou pyogenico. Não seria por isso contraindicada a applicação precoce da antitoxina, uma vez que, neutralizada a toxina, possuidora de acções toxicas que afastam as defesas organicas, restaria ao organismo a integridade dessas defesas, capazes de por si só destruir o germe.

Procurámos realizar essas demonstrações em coelhos, activa e passivamente immunizados, e submettidos á inoculações intravenosas com culturas de estaphylococcos. Tambem fizemos experiencias em cobaias immunizadas passivamente, e posteriormente submettidas a inoculações cerebraes de culturas. Realizámos ainda verificações sobre o desenvolvimento de uma lesão localizada na pelle, em animaes immunizados, provocada pela inoculação de uma cultura de estaphylococcos em caldo de 20 horas.

No Quadro 26 vemos os resultados das experiencias realizadas com coelhos immunizados activa e passivamente. A immunização activa dos coelhos foi realizada por inoculações intradermicas e subcutaneas de doses crescentes de toxina e de anatoxina, geralmente num total de 5 injeccões; para a immunização passiva usámos uma antitoxina preparada em cavallos e concentrada, doseando 750 unidades anti-tetanizantes por cc., em inoculações subcutaneas feitas 24 horas antes da applicação intravenosa de 0,5cc. de uma cultura em caldo, de 20 horas, de uma amostra de estaphylococco virulento. As experiencias de immunização passiva foram feitas em animaes jovens de 300 a 400 grs. e em

QUADRO 26

Imunização activa e passiva e infecção por via intravenosa

Coelhos	Peso	Im. activa		Im. passiva antitoxina 24 hs. antes	Dose de cul- tura esta- phylococcica por k.	Resultados	Toxina nos exsu- datos			
		Toxina	Anatoxina							
Coelhos novos	Testemunhas	269	350.0	—	—	—	0.5 cc.	† < 24 horas	—	
		262	310.0	—	—	—	0.5 cc.	† < 24 horas	++	
		239	330.0	—	—	—	0.5 cc.	† < 24 horas	±	
	Im. passiva	240	350.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	++	
		232	370.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	±	
		246	270.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	—	
		259	360.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† < 24 horas	—	
		241	350.0	—	—	5 cc.	0.5 cc.	† > 36 hs. < 48 hs.	+	
	Coelhos adultos	Im. activa	52	—	4 x 1.85 cc.	—	—	0.5 cc.	† > 11 dias < 12 dias	±
			11	—	4 x 1.85 cc.	—	—	0.5 cc.	† > 12 dias < 13 dias	±
7 p.			—	—	5 x 7.75 cc.	—	0.5 cc.	† > 10 dias < 11 dias	±	
13			—	—	5 x 7.75 cc.	—	0.5 cc.	† > 9 dias < 10 dias	+	
Testemunhas		50	1.600.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 11 dias < 12 dias	±	
		61	1.550.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 9 dias < 10 dias	++	
		60	1.870.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 2 dias < 3 dias	++	
		53	1.905.0	—	—	—	0.5 cc.	† > 7 dias < 8 dias	—	
Im. passiva		56	1.750.0	—	—	1.2 cc.	0.5 cc.	Sobrevida > 106 dias		
		51	1.930.0	—	—	2.2 cc.	0.5 cc.	† > 3 dias < 4 dias		
		58	1.830.0	—	—	2.8 cc.	0.5 cc.	† 10 dias	+	
		59	1.750.0	—	—	4 cc.	0.5 cc.	Sobrevida > 106 dias		
		54	1.820.0	—	—	2.5 cc.	0.5 cc.	† > 29 dias < 30 dias	—	

Legenda: ++ = necrose na pelle do coelho, acção tetanizante para a cobaia (0.3 cc).
 + = edema > > > > , ligeira acção tetanizante para a cobaia (0.3 cc).
 ± = edema ligeiro na pelle do coelho. sem acção tetanizante para a cobaia (0.3 cc).
 — = negativo
 . = não foi feito calculo por peso.

animas adultos de peso entre 1.500 a 2.000 gs.. Um numero elevado de testemunhas foi inoculado somente com a cultura. Logo após a morte dos animas procurámos verificar si nos exsudatos colhidos existia toxina livre, o que demonstraria uma possivel influencia desta no mecanismo da morte, já por um bloqueio da circulação pulmonar, já por uma lyse mais ou menos accentuada dos órgãos, tal como foi demonstrada pelas experiencias de Nélis e Picard (39).

Vemos neste quadro, na serie de coelhos jovens, mais sensiveis ás inoculações venosas de estaphylococcus, que os testemunhas morrem num espaço de tempo menor do que 24 horas, enquanto que os coelhos injectados previamente com a antitoxina sobrevivem mais tempo, não ultrapassando de 48 horas. Na serie de coelhos adultos, os testemunhas perecem num tempo variavel de 3 a 12 dias, sendo que a maioria morreu entre 7 e 12 dias; os coelhos immunizados activamente tambem pereceram entre 9 e 13 dias (o soro do coelho 13, immunizado com anatoxina por via venosa, não mostrou nenhum poder neutralizador) ao passo que dos coelhos adultos immunizados passivamente, 2 pereceram entre 3 e 10 dias, 1 resistiu 29 dias e os 2 outros ainda sobrevivem por mais de 106 dias. Nestes ultimos animas não houve uma relação definida entre a morte ou sobrevivencia e a quantidade de antitoxina inoculada. Após 106 dias, estes animas (coelhos 56 e 59) receberam por via venosa 2 cc. de uma toxina regularmente activa (0,25 matava 1 K. de coelho em menos de 24 horas). O coelho 59 morre em menos de 18 horas, enquanto o 56 sobreviveu.

O poder toxico apresentado pelos exsudatos, embora em gráu não muito elevado, corroborado pela lyse natural do sangue do coração, demonstra que a toxina encontra-se em estado livre. Por outro lado os pequenos abcessos encontrados nos rins, figado e myocardio, o aspecto especial do figado e pequenas hemorragias disseminadas, demonstram um estado pathologico especifico desses órgãos.

A ausencia de antitoxina circulante nesse final de infecção, demonstrada pela presença livre de toxina, torna patente o seu exgottamento no decorrer da mesma.

A septicemia que decorre das inoculações de doses macissas de cultura e contingente ás condições de experiencia em animas de relativa sensibilidade ao germe, não permite uma reacção organica maior, mesmo com o auxilio da antitoxina. Que ha em inicio uma defesa provavelmente devida á presença da antitoxina não resta duvida, conforme demonstra a sobrevivencia por maior tempo dos animas immunizados em relação aos testemunhas.

O Quadro 27 mostra os resultados de uma serie de cobaias immunizadas passivamente por via transocular, com doses de antitoxina variando de 100 a 280 unidades e 24 horas depois inoculadas com 0,1 cc. da diluição a 1/10 de cultura recente. Observa-se uma maior sobrevivencia dos animas immunizados relativamente aos testemunhas.

As nossas pesquisas sobre o desenvolvimento de uma lesão localizada na pelle, em animaes immunizados, provocada pela inoculação de 0,1 cc. de uma cultura de estaphylococcus em caldo, de 20 horas, mostraram: a) em 2 coelhos immunizados por via intradermica com antitoxina circundante ao local da injeccão de 0,1 de cultura, não houve nas 48 horas o desenvolvimento da lesão característica; no 3.º dia um pequeno foco purulento foi observado, sem maior desenvolvimento ulterior; nesses mesmos animaes, uma lesão accentuada, embora de dimensões menores do que as observadas no coelho testemunha, ocorreu em outro ponto de inoculação não circundado pela antitoxina e afastado do primeiro; b) em 2 coelhos immunizados por via venosa com antitoxina (5 cc. e 2 cc.) um ligeiro ponto purulento surgiu no ponto da inoculação infectante, no fim de 24 horas; esta diminuta lesão regrediu nos dias immediatos; c) no coelho testemunha, que não recebeu antitoxina, no ponto de inoculação desenvolveu-se uma placa de necrose de 3,0 x 3,0, com edema e rubor accentuados, abcedando no dia immediato, trazendo, após a queda do tecido necrosado, a formação de uma escara que perdurou por varios dias.

QUADRO 27

Immunização passiva e infecção por via cerebral

Cobaías	Im. passiva. Antitoxina 24 hs. antes, por unidades	Cultura estaphylococco a 1/10	RESULTADOS
3	—	0.1 cc.	† < 24 horas
65	—	0.1 cc.	† < 24 horas
96	—	0.1 cc.	† 28 horas
39	130	0.1 cc.	† > 3 dias < 4 dias
97	100	0.1 cc.	† 5 dias
133	280	0.1 cc.	† > 5 dias < 6 dias
9	210	0.1 cc.	† 6 dias
4	160	0.1 cc.	† > 8 dias < 9 dias
62	130	0.1 cc.	† > 8 dias < 9 dias

VIII — Anatoxina estaphylococcica: preparação e propriedades.

As exotoxinas, quando tratadas pelo formol e mantidas por certo tempo a uma determinada temperatura, perdem a sua acção toxica, conservando, entretanto, a propriedade antigenica. Opera-se uma transformação, no sentido de Ramon, obtendo-se uma anatoxina, para a qual certos auctores ainda conservam o nome de toxoide de Ehrlich. A toxina estaphylococcica, segundo já foi verificado por Burnet, Parish e Clark, Dolman, Gengou e outros, do mesmo modo, transforma-se em uma anatoxina sob a acção do formol. Sua desintoxicação, muito mais rapida do que a observada com a toxina diphterica, é influenciada, não só pela percentagem de formol usado, como pela temperatura e pH do material. Ella é muito mais rapida em meio alcalino do que em meio acido.

Estudando a anatoxina estaphylococcica, procurámos, inicialmente, verificar em que condições sua transformação se opera; posteriormente, fizemos pesquisas sobre o seu poder antigenico, sobre a capacidade de ser fixavel pela antitoxina e sobre o seu poder flocculante.

Os dados fornecidos por Burnet esclarecem muito bem as condições em que se processa a desintoxicação da toxina tratada pelo formol. As nossas verificações foram feitas com a percentagem de 0,2 e 0,4% de formol com toxinas de pH não ajustado (o pH final de nossas culturas tem variado entre 6,8 a 7,6) ou com toxinas previamente ajustadas a um pH 8,2 — 8,4 mantidas a 37°, avaliando-se em tempos diversos a actividade toxica. Os Quadros Nos. 28, 29, 30 e 31 resumem os resultados obtidos em um desses ensaios.

Esses resultados mostram-nos que a toxina, sob a acção do formol, perde rapidamente o seu poder toxico e mais rapidamente ainda si o pH do material é ajustado previamente para 8,4. Resalta ainda deste estudo o facto de todas as actividades toxicas do filtrado diminuirem parallelamente, não havendo conservação maior de uma ou diminuição mais rapida de outra, o que parece corroborar o argumento da unidade do principio activo, o qual, por si só seria responsavel pelos varios effeitos.

Poder antigenico — O poder antigenico da anatoxina foi ensaiado em coelhos, em cavallos e no homem. As inoculações em coelhos foram feitas pelas vias intradermica, subcutanea e intravenosa. Quatro a cinco injeções de doses crescentes de uma anatoxina completamente atoxica, obtida a partir de uma toxina regularmente activa, ajustada ao pH 8,4 e submettida á temperatura de 37° por 5 dias, foram feitas com 4 dias de intervallo. Após 8 dias da ultima inoculação, os animaes foram sangrados e doseado o poder neutralizador dos soros para uma determinada quantidade de toxina. Tomámos

QUADRO 28

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37°C.

I — Verificação da acção erythrocytolytica

(numero de D.M.H. por cc.)

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.4 % HCHO
0	1.600		1.600		1.600
4 horas		> 160 < 320	> 80 < 160	> 40 < 80	> 20 < 40
24 horas	1.600	> 40 < 80	> 10 < 20	< 10	0
48 horas		> 10 < 20	> 5 < 10	0	0

QUADRO 29

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37°C.

II — Verificação da acção necrosante.

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.4 % HCHO
0	0.005 cc. necrose 1.0 x 1.2 cm.				
4 horas		0.1 cc. edema, necrose 5.0 x 3.0 cm.	0.1 cc. edema, necrose 3.0 x 4.0 cm.	0.1 cc. edema 1.0 x 0.8 cm.	0.1 cc. edema 0.8 x 0.6 cm.
24 horas		0.2 cc. edema, necrose 1.0 x 1.4 cm.	0.2 cc. necrose ligeira edema 1.0 x 0.8 cm.	0.2 cc. 0	0.2 cc. 0
48 horas		0.4 cc. edema, necrose ligeira 0.6 x 0.5 cm.	0.4 cc. edema ligeiro	0.4 cc. 0	0.4 cc. 0

QUADRO 30

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37° C.

III — Verificação da acção letal.

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.4 % HCHO
0	0.25 cc. por K. † 1/12'		0.25 cc. por K. † 1/42'		
4 horas		2 cc. por K. † 0/16'	2 cc. por K. † < 15/0	2 cc. por K. S	2 cc. por K. S
8 horas		5 cc. por K. S			
16 horas		10 cc. por K. S			

Legenda: † 1/42' = morte em 1 hora (numerador) e 42 minutos (denominador).

S = sobrevida em 5 dias de observação.

2 cc. por K. = 2 cc. de toxina inoculada por via venosa por 1 K. de coelho.

QUADRO 31

Desintoxicação pelo formol a 0.2 e 0.4 % e 37° C.

IV — Verificação da acção tetanizante.

Tempo	Toxina original	Tox. pH 7.0—7.2 0.2 % HCHO	Tox. pH 7.0—7.2 0.4 % HCHO	Tox. pH 8.0—8.2 0.2 % HCHO	0.4 % HCHO Tox. pH 8.0—8.2
0	0.01 cc. ++ 16' † 3/54'				
4 horas		0.1 cc. ++ 8' † 27' H. N.	0.1 cc. ++ 22' † N.	0.1 cc. ++ 38' S	0.1 cc. 0 S
8 horas		++ 54' S	0.2 cc. + S	0.2 cc. 0 S	0.2 cc. 0 S
16 horas		+ S	0.4 cc. 0 S	0.4 cc. 0 S	0.4 cc. 0 S

0.4 cc. a 0.01 cc. = quantidade absoluta de toxina inoculada, por via transocular em cobaias.

++ 8'

† 27' H. N. = queda tetanizante em 8 minutos, morte em 27', com hemorragia nasal.

0

S

= nenhum symptoma, sobrevida em 5 dias de observação.

1cc., 0.1 e 0.05cc. dos soros e misturámos a 1 cc. de uma toxina bem activa (0.25cc. matava 1 K. de coelho em 1 hora; 0.2 cc. da diluição a 1/30 provocava a syndroma tetanizante na cobaia), completando-se com salina o volume final para 2 cc.. Foram verificadas as propriedades hemolytica, necrosante, tetanizante e letal dessas misturas, segundo a orientação seguida anteriormente (p.48).

O Quadro 32 regista os resultados: os soros dos coelhos immunizados por via intravenosa não apresentam um effeito neutralizador apreciavel, mostrando-se esta via impropria para a obtenção da antitoxina; os demais soros, de coelhos immunizados com anatoxina por via intradermica e subcutanea, mostraram um poder neutralizador um pouco inferior aos obtidos com soros de coelhos immunizados com toxina não tratada pelo formol (Quadro 17), embora maiores quantidades de anatoxina tivessem sido usadas.

Estes coelhos, assim immunizados, foram submettidos á inoculação intradermica de toxina 14 dias depois da ultima injeccção, e, 2 dias após, foram injectados por via intravenosa com uma quantidade de toxina que correspondia a 4 D. M. L. para 1 K. de coelho.

O Quadro 33 mostra os resultados dessas provas.

Por estes resultados verifica-se que os coelhos immunizados por via intravenosa não se mostraram immunes ás acções necrosante e letal da toxina, ao passo que os demais revelaram immunidade completa.

O estimulo antigenico primario da anatoxina foi melhor apreciado em cavallos. Após uma serie de inoculações subcutaneas com doses crescentes de anatoxina, passou-se a uma segunda serie de inoculações com toxina activa, sangrando-se os animaes após a primeira e depois da segunda serie, sendo os soros doseados pelo methodo que descreveremos mais adiante, baseado na neutralização do effeito tetanizante da toxina. O Quadro 42, onde estão registados os resultados, mostra-nos que em um unico animal foi augmentado o titulo antitetanizante e, assim mesmo, ligeiramente, ao passo que em 3 outros o titulo foi mantido e, em mais um, notou-se uma queda do valor antitoxico do soro. O estimulo antigenico primario da anatoxina é, assim, evidente, attingindo a curva antitoxica do soro dos animaes com ella inoculados, após certo numero de inoculações, o seu maior titulo, o qual na maioria das vezes não é ultrapassado, mesmo que a propria toxina activa seja usada como estimulo antigenico secundario.

Tanto as nossas verificações realizadas em coelhos, como as que fizemos com soros de 3 cavallos em serviço de immunização, em que tambem foi verificado o poder neutralizador desses soros para as differentes acções toxicas da toxina tomadas em suas respectivas unidades (Quadro 13), mostram-nos o parallelismo da neutralização desses varios effeitos, indicativo da unidade antigenica da anatoxina e da unidade da antitoxina.

QUADRO 32

Poder neutralizante de soros de animaes immunizados com anatoxina, para as açções erythrocytolytica, necrosante, tetanizante e lettal da toxina.

Coelhos	Vias de immunização	No. de inoculações	Total de anatoxina inocul. em cc.	1 cc. toxina — 1 cc. soro				0.5 cc. soro 1 cc. toxina —				1 cc. toxina — 0.1 cc. soro				1 cc. toxina — 0.01 cc. soro							
				acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lettal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lettal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lettal	acção erythrocytolytica	acção necrosante	acção tetanizante	acção lettal				
4	intra-venosa	5	7.75	H +++	2.5 x 1.5	$\frac{++ 5'}{+ 47'}$	† 16'	H. C.	2.4 x 1.5			H. C.						H. C.					
13	»	»	»	H +++	3.0 x 2.0	$\frac{++ 5'}{+ 4/17'}$	† 12'	H. C.	3.0 x 2.0			H. C.						H. C.					
7	subcutanea	»	»	N. C.	0.8 x 1.0	$\frac{0}{S}$	S	H ++	2.5 x 2.0	$\frac{++ 8'}{+ 4/8'}$	1/31'	H. C.	3.0 x 2.0	$\frac{++ 5'}{+ 3/12'}$				H. C.					
3	intra-dermica	5	»	N. C.	0	$\frac{0}{S}$	S	H +	1.0 x 1.0	$\frac{0}{S}$	S	H. C.	2.5 x 2.0	$\frac{++ 4'}{+ 28' H. N.}$				H. C.					
12	»	»	»	N. C.	0	$\frac{0}{S}$		N. C.	0	$\frac{0}{S}$	S	H ++	1.5 x 1.2		S	H. C.	3.5 x 3.0	$\frac{++ 8'}{+ 2/36'}$					H. C.
Testemunha				H. C.	3.5 x 2.5	$\frac{++ 3'}{+ 17' H. N.}$	† 7'	H. C.				H. C.						H. C.					

Legenda: N. C. = neutralização completa
 H. + = 25 % de hemolyse
 H. ++ = 50 % de hemolyse
 H. +++ = 75 % de hemolyse
 H. C. = hemolyse completa

0 = nenhum symptoma tetanizante, sobrevida em 5 dias
 S =
 $\frac{++ 14'}{+ 3/8'}$ = queda tetanizante em 14', morte em 3 horas e 8 minutos
 $\frac{++ 3'}{+ 17' H. N.}$ = queda tetanizante em 3', morte em 17', hemolyse nasal
 † N. = morte durante a noite
 S = sobrevida em 5 dias de observação.

No homem, injeções repetidas de anatoxina em doses crescentes augmentam o titulo antitoxico do soro. No decorrer do tratamento de casos de furunculose, anthrazes, acmes nodulares, osteomyelites, pyodermites, etc., cujos resultados therapeuticos serão posteriormente discutidos em trabalho a ser publicado, tivemos oportunidade de, por vezes, dosear o titulo antitoxico dos soros antes e depois do tratamento. Esse doseamento foi feito pela verificação do poder anti-erythrocytolytico e, tambem, em um numero menor de vezes, pela verificação do poder anti-tetanizante. Para a verificação do primeiro procuravamos qual a menor dose de soro que neutralizava 10 D. M. H. e, para a do segundo, qual a dose de soro que neutralizava 1 L † da toxina (ver mais adiante), calculando-se o numero de unidades por cc.

QUADRO 33

Coelhos immunizados com anatoxina e submettidos ás acções necrosante e letal da toxina.

Coelhos	Via da immunização	No. de inoculações	Quantidade de anatoxina inoculada em cc.	Prova da acção necrosante, 14 dias após a ultima inoculação		Prova do poder letal, 16 dias após a ultima inoculação, com 4 D. M. L.
				0.1 da diluição da tox. a 1/5	0.1 da diluição da tox. a 1/2	
4	intravenosa	5	7.75	1.5 x 1.0 cm.	2.8 x 3.0 cm.	† 4/20'
13	>	5	7.75	0.5 x 1.0 cm.	1.5 x 1.0 cm.	† 6 horas
7	subcutanea	5	7.75	0	0	S
3	intradermica	5	7.75	0	0.5 x 0.5 cm.	S
12	>	5	7.75	0	0	S
Teste-munha				3.5 x 2.5 cm.	3.7 x 3.0 cm.	† 7'

O Quadro 34 mostra esses resultados, resaltando o regular augmento do numero de unidades anti-erythrocytolyticas após a serie de inoculações com anatoxina, e, tambem, a neutralização do effeito tetanizante da toxina.

Conclue-se desses estudos que uma toxina, submettida á acção do formol, completamente atoxica, conserva evidente poder antigenico, manifestado pelo augmento crescente do teor antitoxico dos soros dos animaes com ella repetidamente inoculados.

O tratamento das estaphylococcias pela anatoxina só poderia ser um facto evidente: a) si o titulo antitoxico do soro pudesse ser augmentado pelo emprego

therapeutico da anatoxina; b) si se verificasse, antes do tratamento dos pacientes, um titulo antitoxico inferior ao geralmente necessario para serem observadas as curas clinicas; c) si ficasse demonstrado que a cura coincide com o augmento desse titulo.

No Quadro 34, em que damos os resultados dos doseamentos realizados antes e depois do tratamento, de alguns casos submettidos ás inoculações pela anatoxina e clinicamente curados, podemos verificar que todos esses itens são preenchidos. Um unico ponto restaria a comprovar: qual o teor antitoxico dos soros dos individuos normaes? Bryce e Burnet (2) estudaram com minucia o assumpto, doseando o titulo antitoxico de numerosos individuos de varias idades, desde o nascimento até 80 annos e estabeleceram uma curva das medias do teor antitoxico normal por idades. Essa curva, que reproduzimos aqui (Graphico 1), assemelha-se á da diphteria: nos recém-nascidos o teor antitoxico corresponde geralmente ao teor materno, decrescendo em seguida até um titulo praticamente nullo, elevando-se depois gradativamente com a idade até o maximo titulo da curva (entre 80 a 100 unidades), attingido entre 6 e 7 annos de idade. Entre 10 e 20 annos esse titulo baixa para depois subir ao mesmo nivel.

Comparando os titulos de individuos normaes com os titulos que mostraram os pacientes portadores de estaphylococcias, verificamos que só nas osteomyelites se observam e, assim mesmo, em alguns casos, titulos elevados, proximos dos mais baixos obtidos após o tratamento com a anatoxina. Nos demais pacientes, o titulo antitoxico antes do tratamento, ou approximou-se da curva normal, ou mostrou-se apenas ligeiramente superior, não tendo alcançado em nenhum caso o titulo elevado obtido após o tratamento.

Este facto talvez esteja ligado á propria natureza da lesão: na lesão chronica o foco reveste-se de formações diversas, que constituem uma parede defensiva por vezes espessa a delimitar toda a area necrosada; a toxina, dialysando lentamente, forneceria o elemento antigenico que estimularia a formação da antitoxina, mas esta não poderia transpor a barreira (tromboses dos pequenos vasos e lymphaticos, membrana defensiva), pelo menos em quantidade sufficiente para collocar a colonia estaphylococcica em condições de menor aggressividade.

Fixação da anatoxina pela antitoxina — O methodo commummente usado para esta verificação baseia-se no facto de que a união anatoxina e antitoxina torna esta ultima incapaz de neutralizar uma pequena dose de toxina posteriormente adicionada, pelo menos em tempo requerido para que a dissociação não se tenha effectuado.

Usa-se uma antitoxina de titulo conhecido e diluições convenientes de toxina e anatoxina que mostrem um ponto de neutralização em partes iguaes ou em quantidades muito proximas. Numa serie de tubos tomam-se quantidades decrescentes de antitoxina na diluição optima (0,9, 0,85, 0,8, 0,75, etc. até 0,05).

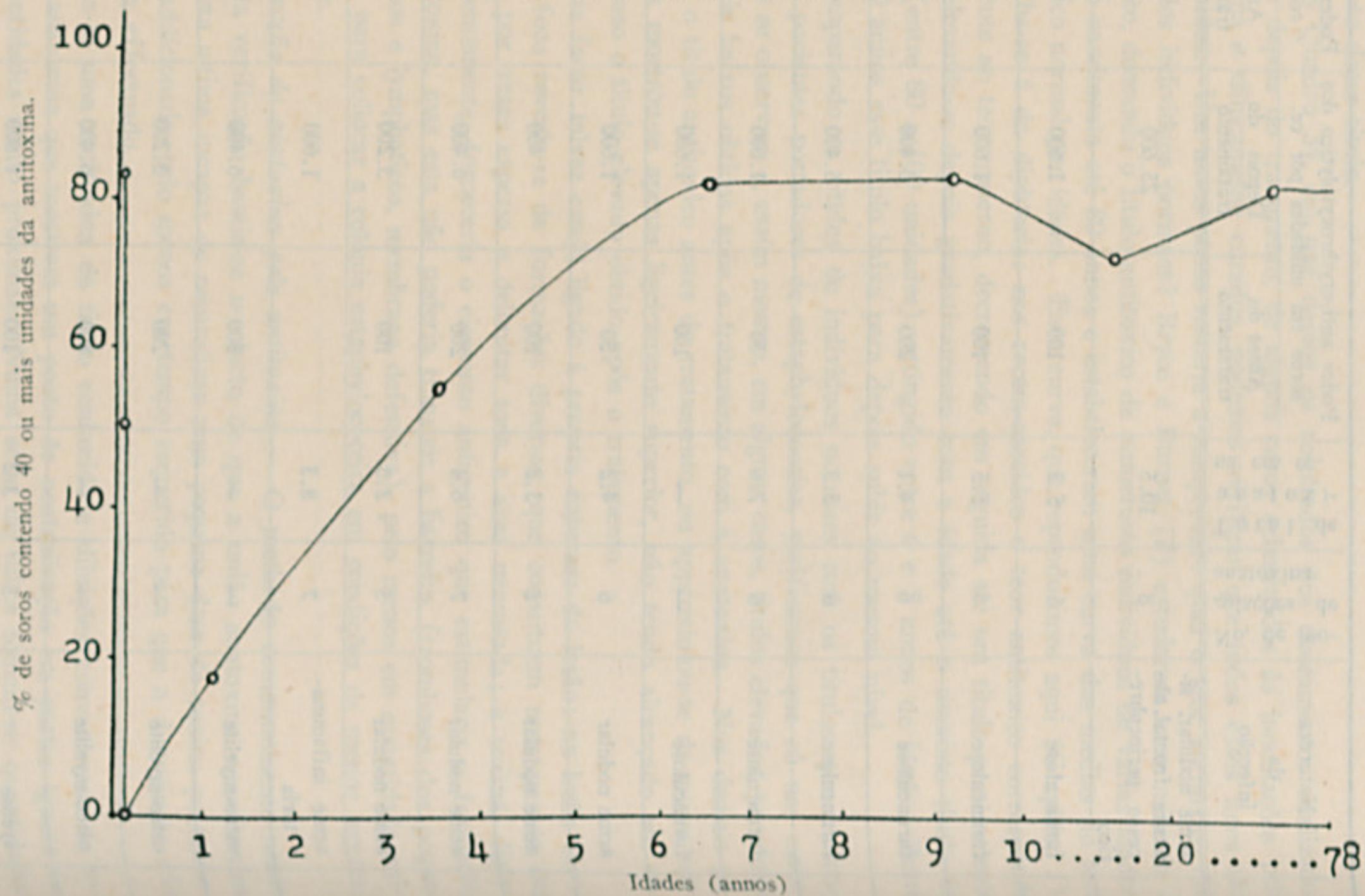
QUADRO 34

Imunização humana com anatoxina (Casos clinicamente curados.
Doseamento do teor antitoxico antes e depois do tratamento).

Fontes	Natureza da infecção	No. de ino- culações de anatoxina	Total de anatoxi- na em cc.	Poder anti-erythrocytolytico dos soros em unidades por cc.		Poder anti-tetanizante dos so- ros em unidades por cc.	
				Antes do tratamento	Depois do tratamento	Antes do tratamento	Depois do tratamento
A.	acme nodular, si- nusite frontal, ab- cesso perinephre- tico	8	10.5		25.600		> 100 < 200
	furunculose	6	5.3	100	1.600		
A. L.	furunculose	6	5.5	100	1.600	< 5	25
P.	furunculose	6	4.1	200	6.400		
P.	furunculose	6	5.3		6.400		
P.	furunculose	6	7.6	50	1.600		
A. L.	furunculose	—	—	100	1.600	< 5	25
C.	acme nodular	6	4.2	50	1.600	< 5	25
A. M.	acme nodular	5	3.2	100	400	< 5	—
P.	acme nodular	7	6.4	200	6.400	< 5	> 25 < 50
B.	acme nodular	5	2.0	100	3.200		
B.	acme inflamma- toria	7	8.3		1.600		
O.	osteo-myelite	—	—	800	6.400		
P.	osteo-myelite	—	—	200	3.200		
F.	osteo-myelite	—	—	800	6.400		
D.	sycose	5	3.2	100	1.600		

GRAPHICO I

Desenvolvimento da immunitade estaphylococcica (Curva de Bryce e Burnet).



e quantidades de toxina, também na diluição requerida, em quantidades crescentes, completando sempre o volume final para 1 cc. (0.1, 0.15, 0.2, 0.25, etc.). Uma nova serie com anatoxina, substituindo a toxina, é feita nas mesmas condições. Incubam-se essas 2 series em banho-maria por 30 minutos. De cada tubo destas 2 series toma-se 0.75 cc.; dividem-se os tubos em 3 filas com 0.25 cc. para cada tubo, dando no final 6 filas de tubos, 3 com a mistura toxina-antitoxina e 3 com a mistura anatoxina-antitoxina. Para facilidade de exposição denominaremos essas filas de A e AA, B e BB, C e CC, respectivamente. Em A e AA adiciona-se 0.25 cc. de salina, em B e BB 0.25 cc. da diluição da toxina que, no volume final, corresponda a 1 minima hemolytica e em C e CC 0.25 cc. de diluição da toxina que, no volume final, corresponda a 2 minimas hemolyticas. Incuba-se por mais 1/2 hora e adiciona-se, em todos os tubos, 0.5 cc. de uma emulsão a 2% de hematias de carneiro, lavadas. (Nova incubação por 1 hora, permanecendo depois os tubos na geladeira até a manhã do dia seguinte, quando é feita a leitura definitiva.

O Quadro 35 mostra os resultados de uma dessas experiencias. Verifica-se que a anatoxina guarda cerca de 50% do poder de ser fixavel pela antitoxina.

Temos presentemente em andamento um estudo experimental mais minucioso do assumpto, no qual investigamos particularmente as relações existentes entre essa capacidade da anatoxina de ser fixavel pela antitoxina e o ponto optimo de flocculação especifica. Em publicação posterior daremos os resultados desse estudo.

IX — Producção de antitoxina estaphylococcica em escala industrial.

O emprego therapeutico da antitoxina estaphylococcica, já tentado por Valentin, Panton e Dix e por Jamieson e Powell, tem mostrado resultados animadores, evidenciados sobretudo pela neutralização dos phenomenos toxicos.

Porisso, procuramos também produzir a antitoxina estaphylococcica em escala industrial, afim de verificarmos as suas propriedades preventivas e curativas no homem.

Immunizámos 8 cavallos, que receberam semanalmente, por via subcutanea, doses crescentes de anatoxina, seguida de uma serie de injeções também em doses crescentes, de toxina. A experiencia de Parker, neste particular, serviu-nos para estabelecer este methodo de immunização. Com effeito, a maioria dos animaes de Parker (45), immunizados com doses crescentes de toxina não modificada, pereceram no decorrer da immunização. Dos nossos 8 cavallos, inoculados com uma serie de doses crescentes de anatoxina, seguida de uma outra de toxina, somente 1 morreu, quando já recebia 80 cc. de toxina.

Iniciámos a immunização com 5 cc. de anatoxina por via subcutanea, augmentando gradativamente as doses até attingir 150 cc., inoculados de uma só vez; então era iniciada a serie de injeccões de toxina activa, tambem com a dose inicial de 5 cc., gradativamente augmentada até 100 cc.. No ponto de inoculação das injeccões com toxina quasi sempre sobrevinha edema, por vezes accentuado, que desaparecia no fim de 4 a 5 dias; alguns animaes apresentaram abcessos que se romperam espontaneamente. As reacções febris, quasi sempre de pequena intensidade, attingiam o maximo na manhã do dia seguinte da inoculação, em nenhum dos animaes ultrapassando 40°, mantendo-se em media a 38°5 e 39°. Durante a immunização os animaes perdiam um pouco de seu peso, sobretudo quando as doses de toxina eram augmentadas, em inicio e bruscamente, de muitos centimetros cubicos. Este inconveniente foi evitado pelo augmento gradativo da dose, não ultrapassando de 20 cc. entre uma inoculação e a seguinte. Sempre que o animal perdia de 10 a 20 Ks. esperavam-se alguns dias para ser effectuada a inoculação seguinte, cuja dose de toxina não era augmentada, repetindo-se a da inoculação anterior.

As inoculações duraram de 4 a 5 meses. Sangrias exploradoras foram feitas no fim da serie de inoculações com a anatoxina, e tambem quando as injeccões com toxina attingiram a 50 e 80 cc..

Inicialmente procurámos dosear o titulo antitoxico do soro, verificando o poder de neutralização para as varias acções toxicas da toxina, tomadas em unidades. Assim é que foram verificados os poderes anti-erythrocytolytico, anti-necrosante, anti-tetanizante e anti-letal, da maneira seguinte:

a) para a avaliação do poder anti-erythrocytolytico tomavamos, em partes iguaes, diluições do soro (1/100, 1/200, 1/300, etc.) e uma diluição da toxina que, no volume final, correspondesse a 10 unidades hemolyticas. Essa mistura era incubada a 37° por 1 hora e depois adicionada de igual volume de hemattias a 2%, renovando-se a incubação por mais 1 hora. O titulo anti-hemolytico era dado pela quantidade de soro contida no ultimo tubo que não apresentasse hemolyse.

b) o poder anti-necrosante foi avaliado na pelle de coelhos por inoculações de 0.2 cc. de diferentes misturas, em partes iguaes, de varias diluições de antitoxina e de uma diluição da toxina equivalente, no volume final, a 1 dose minima necrosante, após incubação a 37° por 1 hora. Considerava-se como D. M. N. a quantidade de toxina contida em 0.2 cc. que produzisse lesão necrosante na extensão de 1 x 1 cm., inoculada por via intradermica.

c) o poder anti-tetanizante foi verificado tambem com misturas em partes iguaes previamente incubadas, de diferentes diluições de antitoxina e de 10 unidades tetanizantes symptomaticas: D. T. S. é a dose que assignala o limite da actividade symptomatica da toxina e a ella já nos referimos acima.

QUADRO 35

Fixação da anatoxina pela antitoxina
(Verificação pela prova da hemolyse)

	Anatoxina ou toxina a 1/5	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95
	Antitoxina a 1/100	0.75	0.7	0.65	0.6	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05
Serie toxina	(Tox. + antitox.) A — 0.25 cc. da mistura + 0.25 cc. salina	4	4	4	tr	tr	tr	3	2	1	1	±	HC	HC	HC	HC
	B — 0.25 cc. da mistura + 1 D. M. H.	4	4	4	tr	3	3	2	1	1	±	HC	HC	HC	HC	HC
	C — 0.25 cc. da mistura + 2 D. M. H.	4	tr	3	2	2	1	1	±	±	HC	HC	HC	HC	HC	HC
Serie anatoxina	(Anatox. + antitox.) AA — 0.25 cc. da mistura + 0.25 cc. salina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BB — 0.25 cc. da mistura + 1 D. M. H.	4	4	4	4	4	4	4	4	tr	3	3	3	2	2	1
	CC — 0.25 cc. da mistura + 2 D. M. H.	4	4	4	4	4	tr	tr	3	3	3	2	2	2	1	HC

Legenda:

- 4 = nenhum traço de hemolyse
- 3 = 25 % de hemolyse
- 2 = 50 % de hemolyse
- 1 = 75 % de hemolyse
- ± = cerca de 90 % de hemolyse
- tr = menos que 5 % de hemolyse
- HC = hemolyse completa

d) o poder anti-letal foi avaliado em face de 1 D. M. L. de toxina, considerando-se como tal a menor dose de toxina capaz de matar 1 K. de coelho em 1 hora.

No Quadro 13 vêem-se os resultados desses doseamentos, calculados em relação a 1 cc. de antitoxina (numerador da fracção) e a uma unidade anti-letal (denominador da fracção).

As relações numericas mostradas pelos doseamentos da neutralização pelos soros das varias acções toxicas da toxina, são de tal modo estreitas, que falam a favor da antigenicidade de um unico principio activo e, logicamente, da unidade da antitoxina: uma unidade anti-letal corresponderia a 160 anti-erythrocytolyticas, a 10 unidades anti-necrosantes e anti-tetanizantes. Esse facto veio corroborar as pesquisas de Burnet, feitas nesse sentido.

O titulo antitoxico seria assim facilmente avaliavel pelo doseamento do poder neutralizante do soro para qualquer uma dessas actividades da toxina, si diversas causas de erro pudessem ser afastadas. Com effeito, a prova mais simples da neutralização do poder hemolytico tem o inconveniente proprio de todas as provas *in vitro*, isto é, de nella intervir o contingente todo pessoal do tecnico analysta. As provas de neutralização do effeito letal e necrosante, têm contra si, em primeiro logar, a differença de sensibilidade dos animaes; em segundo logar, nas doses multiplas que poderiam ser usadas para afastar esse inconveniente, o volume sempre maior a ser inoculado não torna pratico o seu uso. Por outro lado, a toxina conservada nas condições habituaes, perde, dentro de curto tempo, parte de sua actividade, transformando-se talvez em toxoide. E', portanto, um elemento variavel e de standardização irregular, além do que a presença do toxoide tornaria falsos os resultados pelo facto de sua fixação á antitoxina.

Por estas razões procurámos um methodo de doseamento que parecesse, por certos motivos, superior aos demais. O facto de a antitoxina ser um elemento praticamente estavel, quando conservada em boas condições (dessecada e guardada no vacuo, ao abrigo da luz e no frigorifico), permite o seu aproveitamento para dosear a toxina, elemento instavel, tal como se pratica para o doseamento das outras antitoxinas, technica que possui a vantagem de afastar certas causas de erro decorrentes da presença do toxoide.

O doseamento realizado pela pesquisa da neutralização do effeito tetanizante da toxina traria vantagem sobre os demais effeitos não só pelo facto, por nós verificado, de uma determinada dose de toxina produzir, em 100% das cobaias inoculadas, a syndroma tetanizante seguida systematicamente da morte algumas horas após, como pelo facto de, em pequeno volume, podermos concentrar maior numero de unidades tetanizante letaes (D. T. L.), podendo mesmo attingir, si trabalharmos com toxina concentrada ou dessecada, a centenas de unidades, o que permittiria seguir mais estreitamente o methodo usado para

as demais antitoxinas. A inoculação cerebral não será obstaculo maior para a realização desse processo de doseamento desde que se use a via transocular, de technica extremamente simples e rapida.

Este methodo consiste, em ultima analyse, na determinação previa da menor quantidade de toxina que, em presença da unidade de antitoxina tomada como padrão, produz systematicamente a queda tetanizante e a morte em cobaias, dentro de certas bases experimentaes; essa quantidade ($L \dagger$) é tomada como unidade para a avaliação do poder neutralizante das antitoxinas a dosear.

Fundamentamos então esse methodo sobre as seguintes bases: a) deve ser considerada como unidade tetanizante letal da toxina (D. T. L.) a menor quantidade de toxina que, injectada por via transocular no cerebro de cobaias de 250 a 350 gms., produz, systematicamente, a queda tetanizante nos primeiros 30 minutos de observação e, systematicamente, a morte num periodo de 24 horas; b) deve ser considerada como unidade da antitoxina padrão a menor quantidade de antitoxina que, misturada a 10 D. T. L. de uma toxina recentemente avaliada (na vespera), evita, não só a queda tetanizante dos animaes nos primeiros 30 minutos de observação, como a morte nas 24 horas; c) a $L \dagger$ da toxina é a menor quantidade do filtrado que, misturada a uma unidade de antitoxina, produz, systematicamente, a queda da cobaia nos 30 minutos e a morte nas 24 horas, em 100% das cobaias inoculadas. Estudemos, agora, experimentalmente, a avaliação dessas unidades:

I) Determinação da unidade tetanizante letal da toxina (D. T. L.) — Inoculando-se em uma serie de cobaias, por via transocular, 0.2 cc. de diferentes diluições de uma toxina estaphylococcica (1/5, 1/10, 1/20, etc.) consegue-se estabelecer um limite de actividade (D. T. S.), além do qual não mais se evidenciam os symptomas que caracterizam a syndroma tetanizante. Nesta seriação notam-se, entre outros factos, os seguintes: a) o tempo do apparecimento da syndroma, avaliado pela queda tetanizante definitiva da cobaia, aumenta á medida que diminue a quantidade absoluta de toxina; b) varias cobaias, inoculadas com a mesma quantidade (0.2 cc.) de uma das diluições menores da toxina, apresentam com muita regularidade a queda tetanizante no mesmo espaço de tempo, porém, á medida que a diluição se approxima do limite de actividade (D. T. S.), esse tempo de queda torna-se variavel, notando-se tambem certas irregularidades so apparecimento dos symptomas e na occorrenca da morte, que pode faltar nas 24-48 horas; c) as doses maiores de toxina provocam a syndroma tetanizante defintiva seguida de morte dos animaes após algumas horas ou mesmo após alguns minutos, mas, neste ultimo caso, determinam sempre uma hemorrhagia nasal que traduz o edema pulmonar, enquanto que ás doses menores advêm inicialmente os symptomas cerebellares, seguidos ou não da queda tetanizante, retomando alguns animaes o equilibrio.

Numa serie de diluições mais estreitas, abaixo da que marcou o limite de actividade tetanizante symptomatica (D. T. S.), e acima da que produziu *

queda tetanizante nos 30 minutos e a morte em 100% do animaes em algumas horas, é possível, por inoculações em cobaias, determinar a D. T. L., isto é, a dose minima tetanizante letal da toxina, tal como foi definida acima.

Para a uniformidade dos resultados do methodo devemos ter em conta, na determinação da D. T. L. da toxina, não só o volume a ser inoculado por via transocular em cobaias, como a concentração final da toxina. A concentração da toxina no vehiculo, como vimos anteriormente, tem effeito decisivo na producção da syndroma tetanizante. Determinada dose de toxina que, numa concentração mais elevada, é capaz de produzir a syndroma tetanizante na cobaia, em diluição que ultrapasse certo limite de concentração (limiar de fixação) é incapaz de produzir qualquer symptoma da syndroma, ou mesmo morte tardia. Na determinação da D. T. L., assim, o volume a ser inoculado deve ser fixo, variando as diluições da toxina como acima ficou dito e não por inoculações de varias quantidades de uma mesma diluição.

Quanto ao volume a ser inoculado, para maior margem das pesquisas e possibilidade de se trabalhar com toxina menos activa, pode ser usado o de 0.4 cc. Quando são usadas toxinas muito activas ou toxinas concentradas, esse volume deve ser fixado em 0.2 cc. O volume de 0.4 cc., quando inoculado por via transocular em cobaias, provoca em alguns animaes ligeiros phenomenos de compressão, porem estes desaparecem em poucos minutos, não perturbando os resultados do methodo. O volume usado na determinação da D. T. L. deve ser conservado em todas as operações ulteriores, tomando-se para as misturas toxina-antitoxina, conforme o caso, 0.2 cc. ou 0.1 cc. para a diluição da toxina e 0.2 cc. ou 0.1 cc. para a diluição do soro. E' claro que a toxina, nesses volumes a serem misturados, entrará em dose dupla, ficando na diluição final com a mesma concentração usada na primeira determinação.

Quando já se possui uma antitoxina de padrão conhecido, é possível mais facilmente controlar a D. T. L. de uma toxina, usando uma prova previa de hemolyse. Para isto, em uma serie de tubos contendo 0.4 cc. de uma mistura, previamente incubada a 37° por 1 hora, de 0.2 cc. da diluição da antitoxina padrão (que corresponde á quantidade que neutraliza 1 D. T. L.) e 0.2 cc. de diferentes diluições da toxina a dosear, adiciona-se 1 gotta de hematias de carneiro a 20 %, renovando-se a incubação por mais 1 hora. O tubo que mostra 50 % de hemolyse coincide geralmente com o ponto de neutralização para a cobaia. Como a concordancia dos resultados não se tem mostrado absoluta, este ponto tem-nos servido como ponto de partida para as inoculações na determinação da D. T. L. de toxinas, poupando-se, com este modo de proceder, muitos animaes.

II) *Padronização da antitoxina* — Nas bases fundamentaes deste methodo deve ser considerada como unidade padrão da antitoxina a menor quantidade de antitoxina que, misturada a 10 D. T. L. de uma toxina recentemente ava-

liada (preferivelmente na vespera), evita, não só a queda tetanizante das cobaias nos 30 primeiros minutos de observação, como a morte dellas nas 24 horas.

Toma-se uma antitoxina oriunda de cavallo immunizado após repetidas inoculações de anatoxisa e procede-se a varias diluições: 1/10, 1/20, 1/30, etc., pipetando-se 0.8 cc. de cada uma dessas diluições para uma serie de tubos. De uma toxina pura, cuja D. T. L. doseada na vespera foi de 0.4 cc. de uma diluição a 1/20, adicionam-se 0.8 cc. em cada tubo, agitando-se a mistura e incubam-se os tubos em seguida a 37° por 1 hora. Após esse periodo, 3 cobaias são inoculadas com 0.4 cc. de cada uma das misturas e observadas convenientemente. O Quadro 36 mostra os resultados: verifica-se que 0.2 cc. da diluição original de 1/40 do soro foi capaz de neutralizar as 10 D. T. L. da toxina. Repetindo-se a verificação somente com 1 D. T. L. da toxina e com diluições 10 vezes maiores da antitoxina (1/350, 1/400, 1/450, 1/500), obtêm-se resultados comparaveis (Quadro 37). Procurando-se em seguida verificar o ponto justo de neutralização, recorre-se á prova de hemolyse, da maneira seguinte: em uma serie de tubos pipetam-se 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 cc. etc. até 0.95 cc. da diluição da toxina a 1/5 e completam-se os volumes de todos os tubos para 1 cc., adicionando-se 0.9, 0.85, 0.8 cc. etc., da diluição da antitoxina a 1/200. Após agitação de todos os tubos e incubação de 1 hora a 37°, adicionam-se a cada 0.5 cc. das differentes misturas 0.5 cc. de hematias de carneiro a 2%. Após incubação de 1 hora os tubos são collocados na geladeira e os resultados lidos na manhã do dia seguinte. No Quadro 38, que mostra os resultados obtidos, verifica-se que, no tubo em que a toxina e a antitoxina se encontraram em partes iguaes, somente ligeiros traços de hemolyse são observados, não chegando mesmo a lysar 5% das hematias, enquanto que, nos demais tubos da direita, se observa um effeito erythrocytolytico cada vez maior, até a hemolyse completa nos ultimos tubos.

Estas 3 verificações, superpondo seus respectivos resultados, permittiram-nos fixar como unidade padrão da antitoxina a dose de 0.005 ou seja 0.2 cc. da diluição a 1/40.

Presentemente temos a nossa antitoxina padrão em estado secco, em tubos em que foi feito o vacuo e fechados á lampada e conservada ao abrigo da luz e no frigorifico. Em duas verificações já feitas, no espaço de um anno, temos encontrado titulo identico ao primitivo.

Nesta ordem de pesquisas damos preferencia actualmente a toxinas congeladas no frigorifico a — 10°, pelo facto do poder toxico manter-se estavel por longo tempo, permittindo verificações espaçadas sem maior causa de erro.

III) *Determinação da L † da toxina* — Nas bases fundamentaes deste methodo, deve ser considerada como L † da toxina a menor quantidade de filtra-

QUADRO 36

Estandarização da antitoxina padrão, com 1 D. T. L. da toxina.

Antitoxina Toxina		Tempo da queda tetanizante, em minutos														Symptomas após 30'	Tempo da morte
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28		
0.2 de soro a 1/30	1	—————>														0	S
	2	—————>														0	S
0.2 de toxina pura	3	—————>														0	S
	1	—————>														0	S
	2	—————>														0	S
0.2 de toxina pura	3	—————>														0	S
	1	—————															Noite
	2	—————															4/32'
0.2 de soro a 1/50	3	—————															4/56'
	1	—————															0/32' H. N.
	2	—————															2/27'
0.2 de toxina pura	3	—————															3/2'

0.0005 de soro neutraliza 1 D. T. L. da toxina.

QUADRO 37

Estandarização da antitoxina padrão, com 10 D. T. L. da toxina.

Antitoxina Toxina		Tempo da queda tetanizante, em minutos														Symptomas após 30'	Tempo da morte
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28		
0.2 de soro a 1/350	1	—————>														0	S
	2	—————>														0	S
	3	—————>														0	S
0.2 de toxina a 1/10	1	—————>														0	S
	2	—————>														0	S
	3	—————>														0	S
0.2 de soro a 1/400	1	—————>														0	S
	2	—————>														0	S
	3	—————>														0	S
0.2 de toxina a 1/10	1	—————E—————>														tardio	18/0
	2	—————E—————>														>	90/0
	3	—————E—————>														>	S
0.2 de soro a 1/450	1	—————															Noite
	2	—————															Noite
	3	—————E—————>														>	S

0.005 de soro neutraliza
10 D. T. L. da toxina

QUADRO 38

Estandarização da antitoxina padrão pela prova da hemolyse.

Toxina a 1/5	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9
Antitoxina a 1/200	0.75	0.7	0.65	0.6	0.55	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1
Resultados	4	4	4	4	tr.	tr.	3	2	1	1	±	H. C.	H. C.	H. C.

Legenda :

- 4 = nenhum traço de hemolyse
 tr. = traços de hemolyse < 5 %
 3 = 25 % de hemolyse
 2 = 50 % de hemolyse
 1 = 75 % de hemolyse
 H. C. = hemolyse completa.

do que, de mistura com 1 unidade de antitoxina padrão, produz systematicamente a queda tetanizante da cobaia nos 30 primeiros minutos de observação e a morte nas 24 horas, em 100% dos animaes inoculados.

Para a determinação da $L \dagger$ toxinas muito activas devem ser utilizadas e, no caso de toxinas fracas, somente quando previamente concentradas podem servir. Com toxinas dessecadas obtem-se uma margem de experimentação muito maior. Mistura-se a 0.8 cc. da diluição da antitoxina padrão que contem 1 unidade (0.2 cc. da diluição a 1/40 neutralizam 10 D. T. L.) quantidades crescentes, geralmente em centesimos, da toxina, completando-se com salina o volume para 1.6 cc.. Agitam-se todos os tubos e incubam-se por 1 hora. Após esse periodo, 3 cobaias são inoculadas com 0.4 cc. de cada uma das misturas e observadas convenientemente. A menor quantidade de toxina capaz de, após contacto de 1 hora com 1 unidade de antitoxina, produzir a queda tetanizante dentro de 30 minutos e a morte geralmente nas 24 horas, em todas as cobaias, é considerada como a $L \dagger$. Entre a L_0 (ponto de neutralização justa) e a $L \dagger$ ha uma zona de transição, caracterizada pela irregularidade no apparecimento dos symptomas e na morte dos animaes e que corresponde a uma determinada dose de toxina livre praticamente incapaz de, por si só, produzir a queda e a morte em todas as cobaias.

O Quadro 39 mostra uma dessas determinações, realizada com uma toxina 2 vezes mais activa do que a que serviu para as determinações anteriores. Verifica-se que o ponto neutro corresponde á dose de 0.1 cc. da toxina, enquanto que a $L \dagger$ está entre 0.12 e 0.13.

Repetidas verificações da $L \dagger$ de varias toxinas mostraram um comportamento semelhante, com variações de 2 e 3 centesimos a L_0 e a $L \dagger$. Quando se usam toxinas concentradas ou dessecadas, essas variações são mais estreitas, e, nesse caso, devemos trabalhar com diluições que nos permittam fixar as differenças em millesimos.

A determinação de $L \dagger$ deve ser sempre feita na vespera do doseamento das antitoxinas, embora as toxinas congeladas ou dessecadas permittam um espaço de tempo maior entre as duas verificações.

IV) Doseamento das antitoxinas — Para o doseamento das antitoxinas, pratica-se uma serie de diluições dos soros a dosar, das quaes 0.8 cc. são adicionados a 4 L da toxina, completando-se o volume de 1.6 cc. com salina. Agitam-se os tubos e incubam-se por 1 hora a 37°. Tres cobaias são inoculadas com 0.4 cc. de cada mistura e observadas convenientemente. Uma prova inicial de hemolyse facilita a determinação do ponto de neutralização. A 0.4 cc. de cada mistura após a incubação, adiciona-se 1 gotta de hematias de carneiro a 20% e incuba-se novamente. O tubo que mostra 50% de hemolyse no fim de 1 hora, coincide as mais das vezes com o ponto de neutralização para cobaias; não sendo, porem, de concordancia absoluta (Quadro 40), elle só servirá de

Antitoxina Toxina	Antitoxina Toxina em 0.4 cc.	Tempo da queda tetanizante, em minutos													Symptomas após 30'	Tempo da morte		
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24				26
0.8 soro dil. 1/40 0.36 toxina 0.44 salina	0.005 ----- 0.09	1	—————>													0	S	
		2	—————>													0	S	
		3	—————>													0	S	
0.8 soro dil. 1/40 0.4 toxina 0.4 salina	0.005 ----- 0.1	1	—————>													+ E 1/53'	S	L. 0
		2	—————>													0	S	
		3	—————x													0		
0.8 soro dil. 1/40 0.44 toxina 0.36 salina	0.005 ----- 0.11	1	—————>													+ E 2/44'	Noite	
		2	—————														Noite	
		3	—————>													0	S	
0.8 soro dil. 1/40 0.48 toxina 0.32 salina	0.005 ----- 0.12	1	—————>													+ E 2/54'	Noite	L. †
		2	—————														2/16'	
		3	—————>													0	S	
0.8 soro dil. 1/40 0.52 toxina 0.28 salina	0.005 ----- 0.13	1	—————														1/6'	
		2	—————														3/26'	
		3	—————														2/42'	
0.8 soro dil. 1/40 0.56 toxina 0.24 salina	0.005 ----- 0.14	1	—————														2/40' HN	
		2	—————														2/18' HN	
		3	—————															
0.8 soro dil. 1/40 0.6 toxina 0.2 salina	0.005 ----- 0.15	1	—————														2/40' HN	
		2	—————														2/57'	
		3	—————															

QUADRO 40

Relação entre o grau de hemolyse das misturas toxina-antitoxina e a acção tetanizante

Antitoxinas	Resultados da prova de hemolyse em																	
	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.	15'	30'	1 h.
	N. C.	N. C.	N. C.	N. C.	25 %	25 %	25 %	50 %	50 %	50 %	> 50%	75 %	50 %	75 %	> 75%	> 75%	H. C.	H. C.
Equino 81 Mistura dos plasmas			0 $\frac{1}{25} = \frac{0}{S}$									$\frac{++ 0/30'}{\dagger 3/5'}$						$\frac{++ 0/14'}{\dagger N.}$
Equino 81 Concentrada					$\frac{0}{S}$			$\frac{+ 2/12'}{S}$						$\frac{++ 0/19'}{\dagger 2/54'}$				
Equino 82 Mistura dos plasmas																		$\frac{++ 0/15'}{\dagger N.}$
Equino 82 Concentrada		$\frac{0}{S}$			$\frac{0}{S}$									$\frac{++ 0/16'}{\dagger N.}$				$\frac{++ 14'}{\dagger N.}$
Equino 80 Mistura dos plasmas		$\frac{0}{S}$						$\frac{0}{S}$						$\frac{++ 17'}{\dagger N.}$				
Equino 80 Concentrada					$\frac{0}{S}$									$\frac{++ 18'}{\dagger N.}$				$\frac{++ 7'}{\dagger 3/12'}$
Equino 80 II 1.ª sangria								$\frac{+ 1/12'}{S}$				$\frac{++ 0/46'}{\dagger N.}$		$\frac{++ 16'}{\dagger N.}$				$\frac{++ 4'}{\dagger N.}$
Equino 83 1.ª sangria		$\frac{0}{S}$												$\frac{++ 12'}{\dagger 3/10'}$				$\frac{++ 10'}{\dagger 0/21' H. N.}$
Humano L. A. Immunizado com anatoxina		$\frac{0}{S}$						$\frac{0}{S}$						$\frac{++ 12'}{\dagger N.}$				
Mistura de antitoxi- nas concentradas		$\frac{0}{S}$			$\frac{0}{S}$			$\frac{++ 15'}{\dagger N.}$						$\frac{++ 7'}{1/250}$				$\dagger 1/52' = \frac{++ 15'}{\dagger N.}$

QUADRO 42

Immunização de cavallos e doseamento pelo methodo da neutralização do effeito tetanizante.

Serie de inoculações com anatoxina					Serie de inoculações com toxina				Mistura dos plasmas de 3 sangrias		Soros concentrados	
Nos.	No. de inoculações	Vol. total de anatoxina inoculado em cc.	No. de dias decorridos da 1a. sangria à 1a. inoculação	Doseamento da 1a. sangria exploradora	No. de inoculações	Vol. total da anatoxina inoculado em cc.	No. de dias decorridos da 1a. à 2a. sangria exploradora	Doseamento da 2a. sangria exploradora	Volume inicial em cc.	Doseamento	Volume final em cc.	Doseamento
80	11	630	71		3	30	21	< 50 < 100	10.000	> 50 < 100	960	> 250 < 375
80 II	8	400	66	> 150 < 200	8	405	52	> 150 < 200	11.200	> 100 < 150	1.650	> 500 < 1.000
81	11	630	70		5	100	39	> 125 < 250	7.800	> 125 < 250	750	> 1.250 < 1.375
82	11	630	70		5	100	39	> < 125	7.000	< 125	680	> 625 < 750
83	8	400	67	> 50 < 100	7	400	52	> 50 < 100	10.900	> 50 < 100	1.580	> 250 < 500
84	9	427	61	> 500	5	155	35	> 350 < 400	10.300	> 300 < 400	1.410	> 2.500 < 3.000
85	9	430	61	> 50 < 100	5	155	35	> 150 < 200	10.500	> 100 < 150	1.330	> 500 < 1.000
86	9	430	61	> 300 < 400	5	155	30	†				

ponto de orientação para as pesquisas nos animaes. O Quadro 41 mostra um desses doseamentos.

E' considerada como unidade de antitoxina a menor quantidade do soro que, inoculada nas 3 cobaias de mistura com a L † da toxina, evita, não só a queda tetanizante nos 30 primeiros minutos, como a morte nas 24 horas.

Este methodo de doseamento foi usado para avaliação das antitoxinas dos differentes cavallos em serviço de immunização e cujos resultados estão resumidos no Quadro 42. Analysando esses valores, vemos que, já no fim da serie de inoculações com anatoxina, se consegue um titulo antitoxico que, na maioria das vezes, perdura no segundo doseamento, feito após as inoculações com toxina activa, o que demonstra o poder antigenico da anatoxina.

Estes resultados mostram-nos ainda a possibilidade de se concentrarem estas antitoxinas pelo methodo commum de precipitações fraccionadas, usado nas varias antitoxinas (diphtherica, tetanica, escarlatinica, antivenenos, etc.), chegando-se a obter concentrações de volume e actividade, de 5 a 10 vezes.

Presentemente, temos, distribuida em empolas de 10 cc., antitoxina concentrada, doseando 500 unidades por cc..

Quanto ao seu valor em emprego therapeutico ainda não temos dados que permittam fazer um juizo seguro. Deste ponto occupar-nos-emos em proximo trabalho.

DISCUSSÃO

Os estudos actuaes sobre as propriedades e característicos da toxina estaphylococcica fornecem-nos, não só noções theoricas interessantes, como dados de applicação pratica.

Esta toxi-proteina, existente em estado livre nos meios liquidos e solidos em que foram cultivadas amostras de estaphylococcus toxigenicos, guarda, pelas propriedades que apresenta, um parallelismo evidente com as exotoxinas até agora conhecidas. Com effeito, sua maior elaboração depende, não só da amostra productora, como da constituição do meio de cultura, do pH deste e do ambiente do cultivo; suas propriedades toxicas são especificas, actuam sempre do mesmo modo; a propriedade lytica, que é a principal, é verificavel em doses minimas; a toxina é soluvel na agua e insoluel no alcool, sendo absorvida pelos precipitados ou coagulos, pelo caolim e pelo alume; é destruida pelos acidos e é sensivel á luz, ao calor e á oxydação; é retida em parte pelos filtros e dialysa lentamente; possui poder antigenico especifico, provocando, no organismo dos animaes injectados, a formação de uma antitoxina, que a neutraliza e possui todos os característicos das verdadeiras antitoxinas; é susceptivel de ser transformada, pela acção do formol, em uma anatoxina, perdendo sua toxicidez, guardando, entretanto, o seu poder antigenico, a capacidade de ser fixada pela anti-

toxina e flocculando especificamente em presença desta (Burnet); age após um periodo de incubação bastante estreito, mas seguramente variavel de accordo com a dose empregada.

Não se trata de um producto de lyse dos germes. Com effeito, a toxina é encontrada com facilidade no estado livre, assim em meios liquidos como em solidos; sua maior elaboração guarda certa relação com o crescimento do germe, baixando o seu teor gradativamente, á medida do envelhecimento da cultura (Julianelle); nem todas as amostras de *estaphylococcus pathogenicus* são boas productoras dessa toxi-proteina, embora tenham sido isoladas de casos graves, parecendo necessaria a adaptabilidade da amostra ao meio em que se desenvolve; as amostras não pathogenicas não a produzem; necessitam de certas condições de meio de cultivo para elaborarem a toxina em maior quantidade; as amostras boas productoras não a produzem em quantidade apreciavel em meio synthetico (meio de Uschinski) e, bem assim, a toxina não se torna mais abundante após a autolyse das culturas em condições de anaerobiose (Burky); culturas de *estaphylococcus* lavadas e lysadas (mycolysado de Gratia, bacteriophago) não apresentam a toxina (Gengou); as emulsões de *estaphylococcus* lavadas, mortas pelo calor ou por outros meios, lysadas (mycolysado) ou submettidas á acção do bacteriophago, têm, quando inoculadas em animaes, acção antigenica diversa da produzida pelos filtrados que contêm a toxina, pois os soros desses animaes não as neutralizam nem flocculam (Gengou); particularmente os centrifugados de cultivos toxicos, lavados e submettidos á acção do bacteriophago, são desprovidos de acção toxica e, inoculados em animaes, não geram do mesmo modo anticorpo que neutralize a toxina ou com esta floccule (Gengou).

Estas razões, hoje bem fundamentadas em pesquisas experimentaes realizadas por não pequeno numero de scientists (Burnet, Panton e Valetnine, Dolman, Parish e Clark, Gengou, Burky, Nélis, etc.), não nos deixam a menor duvida quanto á natureza desse principio toxico; — trata-se de uma verdadeira exotoxina.

Avulta de valor a natureza deste principio activo elaborado pelos *estaphylococcus*, quando nos lembramos que este mesmo principio é secretado *in vivo*, conforme revelam as pesquisas que ralizámos e demonstrativas da presença de um principio toxico nos exsudatos de coelhos inoculados por via venosa, com cellulas *estaphylococcicas* vivas, isentas de toxina, com as mesmas propriedades da toxi-proteina elaborada *in vitro*, inclusive a de ser neutralizada pela antitoxina. A intoxicação do organismo infectado, no decurso de certas septicemias e de certas *estaphylococcias* aparentemente localizadas, já referidas pelos clinicos, é então um facto real, perfeitamente demonstrado experimentalmente. A elaboração da toxina *in vivo* acarretaria a lyse accentuada das cellulas dos orgãos (figado e rim) e, sobretudo, uma perturbação da circulação pulmonar, reflectindo-se no trabalho do coração esquerdo, processo identico ao verificado

experimentalmente após inoculações intravenosas em coelhos com a toxiproteína. A diminuição ou abolição completa das defesas orgânicas, directamente ligada ao ataque mais ou menos accentuado ás células defensivas, pela maior ou menor elaboração da toxina pelo germe infectante, permitiria a invasão cada vez maior do organismo pela bacteria, fornecendo condições optimas para sua maior vitalidade, reprodução e toxigenicidade. Por esse mecanismo, uma infecção estaphylococcica na maioria das vezes localizada, poderia generalizar-se, intoxicar e destruir os elementos mais nobres da economia.

O poder invasor da célula estaphylococcica, felizmente, é limitado. Menkin (31.^a) demonstrou experimentalmente a existencia de barreira lymphatica, correspondente a uma formação fibrinosa que thrombosa os lymphaticos e que se estabelece em volta de um foco inflammatorio estaphylococcico, já 1 hora depois da inoculação infectante. Nas mesmas condições, seriam precisas, respectivamente, 6 e 30 horas para que em focos inflammatorios provocados por inoculações de pneumococcus e estreptococcus, se estabelecesse o bloqueio da circulação lymphatica. As inoculações subcutaneas, intradermicas e musculares em animaes, de germes medianamente virulentos, provocam lesões localizadas, e, somente com microorganismos altamente virulentos (toxigenicos?) se consegue, por estas vias, uma invasão á circulação sanguinea. A barreira defensiva do organismo só seria efficaz desde que a toxigenicidade da bacteria fosse de pequena monta. Certamente a menor resistencia organica desempenharia papel influente na invasão do organismo pelo estaphylococco; mas, mesmo em organismos normaes, com todo o seu poder defensivo, é possivel a invasão pela bacteria, desde que esta tenha em alto grau o poder toxigenico ou que condições locais o favoreçam. Seriam, assim, explicadas as septicemias decorrentes de focos limitados e bem localizados, em individuos em pleno estado hygido, tal como foram descriptas e observadas por George e Giroire, Peet, Reed e Stiles, etc. Todavia, que condições locais seriam essas que poderiam collocar a bacteria em estado optimo de toxigenicidade? Para a produção da toxina *in vitro* ha necessidade de uma certa tensão de CO². "A necrose em uma lesão estaphylococcica poderia sobrevir em um foco em que a tensão de oxygenio estivesse diminuida. Fildes, mostrou em seu trabalho sobre tetano que, em um tecido damnificado, uma condição local de anaerobiose pode ser produzida, favoravel á produção da toxina pelo bacillo. Similarmente, um augmento local da tensão de CO² pode levar o estaphylococco a produzir a sua toxina" (72). Na nossa opinião, o mecanismo deve ser mais complexo. Com effeito, experimentalmente, a elaboração da toxina *in vitro* nem sempre acompanha a gravidade do caso de que foi isolada a amostra em estudo; isto é, estaphylococcus isolados de pacientes que apresentam uma infecção gravissima, com uma intoxicação clinicamente evidente e mesmo intensa, podem ser fracos productores de toxina *in vitro* (em condições de menor tensão de oxygenio e maior de CO²), enquanto que outros, isolados de lesões localizadas, aparentemente sem exercerem maior

damno para o organismo, a elaboram fortemente. De nossas amostras de estaphylococcus isoladas de septicemia (2) e de meningites (2) mortaes, nenhuma mostrou poder toxigenico comparavel á de certa samostras boas productoras e que foram isoladas de osteo-myelites, pyodermites, furunculose e ulceras. Vemos então, que, pelo menos *in vitro*, as cousas não se passam com a identidade do que se poderia theoreticamente suppor. O acertado é que as condições não são as mesmas, e, por enquanto, não temos ainda elementos experimentaes seguros que supportem uma argumentação em prol do facto da maior elaboração da toxina *in vivo* ou *in vitro*, condicionada a este ou áquelle factor. Tudo faz-nos pensar que estas condições existem, tendo sobretudo em vista os symptomas clinicos de intoxicação observados nas septicemias de marcha fulminante e as experiencias demonstrativas da elaboração da toxina *in vivo*; mas esses factores necessarios á elaboração da toxina ainda não estão elucidados e muito menos provados experimentalmente. O problema tambem deve ser encarado sob o ponto de vista da dissociação entre o poder toxigenico e a virulencia das bacterias. Aliás, o facto não é novo, nem sempre as amostras de *C. diphtheriae*, *C. tetani* e *S. dysenteriae*, isoladas de caso sgraves, são as mais toxigenicas *in vitro*. Não conseguimos obter toxinas mais activas de culturas de 3 amostras de estaphylococcus augmentadas de virulencia por passagens successivas no organismo do coelho. Devemos ter em conta, então, a adaptabilidade da amostra ás condições artificiaes de cultura. Altamente toxica no organismo infectado, pode não o ser nos meios artificiaes de cultivo, ou fracamente toxica *in vivo* e muito toxigenica *in vitro*.

Os filtrados de culturas de estaphylococcus pathogenicos e mais toxigenicos por suas condições de adaptabilidade aos meios artificiaes de cultivo, apresentam propriedades diversas. O effeito lytico sobre as cellulas sanguineas e dos tecidos é de todos o de maior evidencia. Hematias, leucocytos, hematoblastos e cellulas dos demais tecidos, soffrem a sua acção lytica. Este effeito lytico é demonstrado por uma previa degeneração hydropica das cellulas, seguida de necrose e dissolução cellular. Van de Velde foi o primeiro a verificar a degeneração bolhosa e a lyse dos leucocytos submettidos á acção da toxina; Parker acompanhou o phenomeno necrosante na pelle do coelho inoculado por via intradermica; identica degeneração hydropica observámos, com Maffey, nas cellulas nervosas do cerebro e do cerebello de cobaias inoculadas com a toxina por via transocular; Nelis registou a degeneração do mesmo typo nas cellulas hepaticas de coelhos inoculados por via intravenosa com doses submortaes de toxina.

Porem, segundo as pesquisas de Gengou, o desaparecimento da estrutura cellular não se acompanha da destruição das substancias ás quaes as cellulas devem as suas propriedades. Com effeito, a destruição da estrutura cellular pela toxina não teria modificado as seguintes propriedades cellulares: a) a propriedade que têm os leucocytos de transformar em granulos os vibriões cholericos; b) o poder que têm os hematoblastos do coelho de conferir ao soro

deste animal a faculdade de destruir a *Bacteridia carbunculosa*; c) a participação das substancias fornecidas pelos hematoblastos (cytozymas) na coagulação do sangue; d) a participação do cytozyma das hematias no mesmo phenomeno.

As pesquisas de Gengou, sem duvida interessantes por trazerem um contingente de real valor para o estudo do mecanismo da acção das toxinas sobre os elementos cellulares, não auctorizam uma generalização ás demais substancias a que devem as cellulas suas propriedades especificas, e não será fora de proposito suppor, e é Gengou que lança a hypothese, que "lors de la lyse des cellules, le sort de leurs éléments constitutifs dépend aussi bien de la nature de ces éléments eux-mêmes que de la nature du facteur lytique".

No presente trabalho foram estudadas experimentalmente as seguintes acções toxicas das culturas de estaphylococcus: erythrocytolytica, leucocytolytica, necrosante (dermotoxina), mortal por via venosa para o coelho (leto-toxina), tetanizante e acção coagulante do plasma e fibrinolytica.

A não ser esta ultima, que parece não correr por conta do principio activo filtravel, as demais estão directamente relacionadas á presença da toxi-proteina. Com effeito, a acção coagulante e fibrinolytica das culturas, independentemente de coexistir com poder sempre maior nas culturas em que a toxi-proteina se revela em altos titulos, é em grande parte retida pelos filtros, é mais thermo-estavel do que a erythrocytolysina e a dermo-toxina, não se mostrando neutralizavel pelos soros de portadores de infecção estaphylococcica, bem como pelos soros de coelhos infectados e soros de alto titulo erythrocytolytico. Segundo Sudhues, auctor dessas verificações, o phenomeno da coagulação seria effeito de trocas physico-chimicas não especificas e não dependeria dos phenomenos de immuidade. Seja ou não verdadeira essa interpretação de Sudhues, a coagulação do plasma e a fibrinolyse, dependentes de um mesmo processo (segundo Gengou a coagulação do plasma seria uma phase de fibrinolyse), e independentes da toxina propriamente dita, desempenham papel importante na pathogenia das estaphylococcias, tanto que a prova *in vitro* de Much ainda é hoje um elemento seguro para o reconhecimento de um estaphylococco pathogenico.

A acção gastro-intestinal, tambem referida neste trabalho, observada não só após a ingestão de alimentos contaminados como com filtrados de culturas de estaphylococcus isolados desses alimentos, no julgar de Woolpert e Dack, correria por conta de um outro principio activo, independente da toxina propriamente dita, embora com esta guardasse certa relação de presença e proporcionalidade. Woolpert e Dack, que operaram em macacos, não conseguiram neutralizar pela antitoxina o veneno gastro-intestinal das culturas; igualmente, macacos immunizados passivamente não se mostraram immunes ao filtrado por via oral. Estes auctores, entretanto, não estudaram o veneno gastro-intestinal em relação á acção coagulante do plasma e fibrinolytica das culturas, ficando este ponto ainda aberto aos estudos experimentaes.

No que diz respeito ás demais acções toxicas dos filtrados de culturas de *estaphylococcus*: lytica para as cellulas sanguineas (hematias, leucocytos, hematoblastos) e dos tecidos (figado, rim, myocardio e cerebro), acção particularmente necrosante para a pelle, acção letal por via venosa e effeito tetanizante, parecem correr por conta de um unico principio activo, filtravel e seguramente neutralizavel por uma mesma antitoxina. Dizemos uma mesma antitoxina, pelo facto de, nas nossas verificações, como nas de Burnet, a neutralização desses varios effeitos toxicos, tomados em suas unidades, guardarem uma relação demasiadamente estreita, que fala a favor, não só da identidade antigenica das toxinas preparadas com varias amostras de *estaphylococcus*, como da realidade de uma unica antitoxina, neutralizando as differentes acções toxicas de um unico principio activo. Com effeito, no caso da existencia de varios principios responsaveis pelas differentes acções toxicas, os titulos de neutralização desses varios effeitos não se mostrariam em tão estreita e constante relação numerica, dados os graus de antigenicidade differentes que, forçosamente, teriam esses varios principios toxicos.

Ainda corroboram essa opinião as experiencias que realizámos de neutralização da toxina, não mais tomada em unidades toxicas, mas em volume fixo, variadas as quantidades de antitoxina, experiencias demonstrativas da seriação quantitativa da toxina necessaria para a obtenção dos effeitos erythrocytolytico, necrosante, tetanizante e letal, respectivamente. Uma seriação identica é sempre observada na verificação dos effeitos toxicos dos filtrados de culturas de varias amostras, tomando a toxina em quantidades decrescentes. É verdade que, si procurarmos as relações numericas dessas differentes acções toxicas tomadas em suas unidades, poderemos verificar que os numeros não guardam entre si uma relação tão estreita que permitta dizer-se, com segurança, que uma unidade X (poder letal) equivale a tantas unidades, Y, W ou Z (poderes tetanizante, necrosante e erythrocytolytico). Não só o facto da transformação rapida da toxina em toxoide, como as differenças de criterio technico tomado pelos varios experimentadores, e, ainda as variações de sensibilidade dos elementos em ensaio e tambem dos animaes empregados na determinação das varias unidades, tudo concorre para difficultar o assentamento das relações numericas dessas differentes acções toxicas da toxina. Todavia, corrobora ainda o ponto de vista unicista o facto de, sob a acção do formol, todas as propriedades toxicas da toxina diminuirem parallelamente, tal como demonstrou Burnet e nós mesmo confirmamos.

A hypothese pluralista, defendida principalmente por Weld e Gunther e por Panton e Valentin, dissocia o effeito erythrocytolytico do leucocytolytico, e tambem o primeiro do effeito necrosante. Esta hypothese, ante a evidencia de um principio activo unico, aifirmado pela neutralização proporcional dos varios effeitos toxicos da toxina por antitoxinas obtidas á custa de filtrados de

culturas de varias amostras de estaphylococcus, parece não mais se poder firmar em boas bases experimentaes.

Encaremos, agora, particularmente o effeito erythrocytolytico.

Como tivemos occasião de verificar, as hematias de differentes animaes, inclusive as do homem, não mostram uma sensibilidade igual ao effeito lytico da toxina. As hematias humanas se teriam mesmo mostrado resistentes á acção de 3 das nossas toxinas altamente lyticas para hematias de coelho e de carneiro. Glenny (em trabalho não publicado, cit. por Parish), encontrou 2 hemolysinas em filtrados estaphylococcicos, com anticorpos especificos. Panton e Valentin tambem assignalam toxinas com alto titulo erythrocytolytico para hematias de coelho, que não chegavam a hemolysar os globulos vermelhos humanos. A saturação dessa toxina com globulos vermelhos humanos não teria reduzido o titulo hemolytico para os globulos de coelho.

Os globulos vermelhos humanos seriam, então, mais resistentes á acção lytica da toxina do que as hematias de carneiro e coelho. Restaria comprovar si, em ensaios com hematias de individuos cujos soros são isentos ou pelo menos contêm pequena quantidade de antitoxina, o poder lytico desses filtrados não se mostraria mais accentuado. Com effeito, Bryce e Burnet, em estudos cuidadosos sobre o desenvolvimento da immunidad natural á toxina estaphylococcica, estabeleceram uma curva do teor antitoxico dos soros de individuos de varias idades, a qual se assemelha á curva da immunidad natural á toxina diphterica; por ella se vê que, nos individuos adultos, o teor anti-erythrocytolytico do soro é sempre elevado. Occasionalmente em coelhos (5%) se poderia observar tambem uma certa immunidad natural.

Por outro lado, Muller (34) pensa que o phenomeno da hemo-destruição, por parte do estaphylococco sobre as hematias, não estaria unicamente ligado á presença do estaphylococco (erythrocytolysina), mas tambem a um principio filtravel existente no sangue humano. Este principio seria thermo-labil e a sua actividade hemo-destructiva seria por sua vez condicionada á presença do estaphylococco.

Por fim, não seria de extranhar que, inversamente, os filtrados de culturas pouco erythrocytolyticos para hematias de coelho ou carneiro tivessem um maior effeito lytico sobre hematias humanas. Estas verificações, ainda não realizadas, merecerão futuramente de nossa parte estudo cuidadoso, dada a sua importancia na explicação de factos até agora obscuros no mecanismo desse effeito lytico.

Os resultados obtidos nos nossos estudos experimentaes, relativamente ás acções necrosante e mortal da toxina, em nada differiram dos já publicados por Parker, Burnet, Dolman, Parish e Clark, Burky e outros.

A acção tetanizante que se segue ás inoculações da toxina directamente no cerebro de coelhos e cobaias, não referida nos trabalhos publicados por aquelles

auctores, foi por nós estudada experimentalmente e os nossos resultados, em parte já publicados, são registados aqui na sua totalidade.

A syndroma experimental obtida pelas inoculações dos filtrados de culturas de estaphylococcus toxigenicos, e só por estes, directamente no cerebro após trepanação ou pelas vias cisternal ou transocular, parece superpor-se á da tetania acerebellada, que ocorre nas meningites infectuosas, permittindo esta observação firmar de uma vez a pathogenia do mal como decorrente do ataque aos elementos nervosos (cerebro, cerebello) pelas toxinas bacterianas. Os chamados meningismos, observados concomitantemente a infecções pyogenicas das proximidades (sinusites, otites, mastoidites), teriam assim sua explicação numa infiltração por parte da toxina elaborada pelo germe, alcançando determinado territorio cerebral. Aberto o foco cirurgicamente, o escoamento facil para o exterior logicamente eliminaria a infiltração que no caso seria de ordem mecanica.

A syndroma tetanizante agora observada parece não ser apanagio do producto aggressivo do estaphylococco. Alguns dos nossos filtrados de culturas de estreptococcus hemolyticos e de meningococcus (em meio harmonico de Huntoon) provocaram-na, embora em menor intensidade: os animaes inoculados (cobaias) retomavam o equilibrio em alguns minutos, si bem que a maioria morresse nas 24 horas. Os estudos recentes de Zdrowski e Voronine (73), de Branham e Lillie (74) e os de Ferry e colaboradores (75) sobre a meningite do coelho que sobrevem ás inoculações cisternaes de culturas de meningococcus ou de seus filtrados, falam do mesmo modo nesse sentido. Nas nossas verificações com filtrados de culturas de *E. typhi* ou toxinas dysenterica e tetanica, veneno de jararaca ou soluto de trypsina e com o caldo-Walburn collocado sob as mesmas condições de experiencia, não foi obtido effeito semelhante.

Essa acção toxica dos filtrados estaphylococcicos sobre as cellulas nervosas, demonstrada pela degeneração do typo hydropico em elementos cellulares do cerebro e do cerebello, mostra-se identica ao phenomeno inicial da necrose e lyse cellular, provocado pela toxina sobre diferentes tecidos, parecendo não guardar qualquer especificidade. Esta falta de especificidade para o tecido nervoso é revelada nos animaes inoculados por diferentes vias, os quaes não demonstram symptomas da syndroma tetanizante. Este ultimo facto foi comprovado pela reproducção das classicas experiencias de Wassermann e Takaki sobre a adsorpção da toxina tetanica pelo tecido nervoso: o filtrado estaphylococcico, após contacto mais ou menos prolongado com esse tecido (cerebro), não perdeu em todo ou em parte o seu effeito mortal e tetanizante. Neste particular a toxina estaphylococcica se afasta inteiramente da toxina tetanica, que apresenta uma especificidade accentuada para aquelle tecido.

A inoculação por via lombar da toxina estaphylococcica é seguida da paralysis dos membros posteriores e, quando inoculadas doses, acima de 0.5cc. ap-

parecem tardiamente os symptomas cerebraes, sobretudo o opisthotono, que progridem muito devagar.

Nas inoculações por via cisternal e transocular de toxinas muito activas e em doses fortes, pode-se ainda observar em certos animaes um ataque aos centros bulbares, frequentemente revelado por um typo de edema pulmonar que se traduz por uma hemorragia nasal caracteristica, morrendo os animaes, neste caso, em poucos minutos. Normalmente, a morte dos animaes é verificada após algumas horas da inoculação, notando-se certa relação entre o tempo de morte e a dose de toxina inoculada.

Uma relação chronometrica muito mais estreita poude ser verificada entre a dose de toxina inoculada e o apparecimento da syndroma, tomando-se como criterio de avaliação a queda tetanizante, revelada por perda do equilibrio, contracturas dos membros, opisthotonos. Estes dados, guardado certo criterio tecnico, permittiram assentar as bases experimentaes para a determinação de uma unidade, a dose tetanizante letal (D. T. L.), que foi usada nas experiencias immunologicas por nós realizadas. A D. T. L. da toxina, pouco superior á dose que limita a actividade da toxina (dose tetanizante symptomatica — D. T. S.), representa, em função da concentração, a menor dose de toxina capaz de produzir, systematicamente, a syndroma tetanizante typica, em periodo de tempo não superior a 30 minutos em cobaias de mais ou menos 350 grs. de peso e inoculadas por via transocular e a sua morte constante nas 24 horas. Dizemos em função da concentração, porque as experiencias por nós realizadas nesse sentido demonstraram que determinada dose de toxina, que numa concentração mais elevada é capaz de produzir a syndroma tetanizante na cobaia, em certa diluição maior nada produz. Ficou tambem verificado que, alem de um certo limite de diluição do filtrado, não é possivel obter-se qualquer symptoma na cobaia ou mesmo morte tardia, embora as doses de toxina inoculada sejam superiores á menor dose que, na diluição limite, foi capaz de produzir uma syndroma tetanizante completa com morte do animal. Neste particular, a fixação da toxina sobre as cellulas nervosas obedeceria, talvez, ás mesmas leis que regem as colorações vitaes electivas, regulando-se por um coefficiente de repartição, solubilidade e penetração, ou ainda, ás leis de adsorpção por superficies limitadas entre sistemas micro-heterogeneos ou colloides. Novas verificações serão futuramente feitas afim de comprovar si a toxina, em seus varios outros efeitos toxicos, guarda um comportamento semelhante.

A toxina estaphylococcica possui um poder antigenico accentuado: os soros de animaes repetidas vezes inoculados com pequenas quantidades de toxina pelas vias subcutanea e intradermica, possuem propriedades antitoxicas evidentes. Os animaes injectados por via venosa mostram-se difficilmente immunizaveis, não supportando na maioria das vezes as inoculações de doses crescentes de toxina.

A antitoxina desse modo obtida, segundo mostraram as nossas experiencias, neutraliza, tanto *in vitro*, como *in vivo*, todas as propriedades toxicas da

toxina, inclusive a acção tetanizante. Este ultimo facto fornece um argumento seguro a demonstrar que o principio toxico dos filtrados, neutralizavel pela antitoxina, é o responsavel pelo effeito tetanizante provocado nos animaes após as inoculações cerebraes, o que é corroborado pela observação de que somente os filtrados toxicos são capazes de provocar semelhante syndroma.

Os nossos animaes immunizados activamente resistiram, por outro lado, ás inoculações venosas de toxina em dose seguramente mortal e, tambem, mostraram-se immunes ás inoculações por via intradermica de quantidades de toxina capazes de produzir lesões necrosantes extensas em coelhos normaes.

O poder preventivo da antitoxina em relação aos effeitos necrosante, letal e tetanizante dos filtrados, ficou tambem demonstrado pelos resultados dos nossos estudos. Neste particular, as nossas experiencias foram mais extensas em relação ao effeito tetanizante da toxina, em animaes immunizados passivamente. Pode-se deduzir dessa serie de experiencias que, em cobaias e coelhos, a antitoxina protege os animaes contra o effeito tetanizante da toxina, por certo espaço de tempo, variavel com a dose de antitoxina e com a via de inoculação desta.

A antitoxina estaphylococcica, que possui uma propriedade preventiva manifesta, mostrou um poder curativo limitado em relação ao effeito tetanizante da toxina. Com 100, 200 e 300 unidades de antitoxina, inoculadas por via transocular e cisternal, não conseguimos restabelecer o equilibrio de 9 e 10 cobaias, 5 minutos depois de declarada a syndroma tetanizante. Sob este ponto de vista, a antitoxina estaphylococcica teria, talvez, acção identica á da antitoxina tetanica: um effeito curativo limitado, não pela falta de neutralização da toxina porventura livre no cerebro, mas pelo facto de não haver *restitutio ad integrum* das cellulas nervosas lesadas mais ou menos profundamente. A antitoxina poderia talvez agir curativamente, nos casos de intoxicação lenta, de marcha subaguda, pela neutralização gradativa da toxina elaborada continuamente e em pequenas doses, em focos não muito extensos.

Um dos pontos mais interessantes dos estudos sobre a antitoxina seria a verificação do seu poder preventivo contra as infecções estaphylococcicas propriamente ditas. Como se comportariam os animaes possuidores de elevado teor antitoxico no sangue em relação ás infecções estaphylococcicas generalizadas ou localizadas? Burnet, em verificações sobre o poder preventivo da antitoxina na septicemia experimental do coelho, observou uma maior resistencia dos animaes immunizados relativamente aos testemunhas, assignalando embora um augmento do numero de germes na corrente circulatoria, tanto nestes, como naquelles, perecendo todos os animaes, finalmente, em um periodo mais ou menos prolongado. As nossas experiencias, neste particular, tambem demonstraram na serie de animaes immunizados passivamente, em coelhos, tanto jovens como adultos, uma maior sobrevivencia á infecção por via venosa entre os immuni-

zados relativamente aos testemunhas. Nos exsudatos de certos destes animaes, principalmente dos que pereceram após poucos dias da inoculação, foi observada a presença de toxina livre. Que houve, nestes animaes, uma defesa inicial, provavelmente devida á presença da antitoxina, não resta duvida, pois a sobrevivencia por maior tempo dos immunizados em relação aos testemunhas bem a demonstra. Mas, por outro lado, o exgottamento da antitoxina seria um facto real, dada a presença de toxina livre, verificada nos exsudatos colhidos após a morte, principalmente dos animaes que pereceram após poucos dias da inoculação infectante.

A septicemia que decorre das inoculações de doses macissas de culturas, contingencia das condições de experiencia, em animaes de relativa sensibilidade ao germe, não permittiria uma reacção organica maior, mesmo com o auxilio da antitoxina. Os ioelhos jovens, mais sensiveis ao germe, soffrem uma intoxicação mais accentuada, dada a maior concentração que a toxina precocemente attinge (por maior elaboração em menor volume); mesmo immunizados passivamente com doses de antitoxina relativamente elevadas, parecem após um numero de horas pouco superior ao dos testemunhas. Os coelhos adultos, mais resistentes, soffrem uma intoxicação mais lenta, supportando a infecção por um periodo mais prolongado. Alguns destes, entretanto, resistem por um longo espaço de tempo, vindo a morrer tardiamente por cachexia, apresentando por vezes arthrites e paralyrias.

Examinando mais de perto a questão, podemos verificar que, nas mesmas condições experimentaes, existe neste particular certa analogia das infecções estaphylococcicas com as estreptococcicas, que, segundo Parish e Okell (50), possuem 2 modos de ataque: um agudo, inicial, toxico e um outro ataque tardio, septico ou pyohemico. Por inoculações venosas de germes muito virulentos, ou de doses muito fortes de culturas de estaphylococcus regularmente virulentos em coelhos jovens, observa-se uma septicemia pura, sem localizações visceras apparentes, morrendo os animaes em poucas horas por uma intoxicação brutal do organismo. Os estaphylococcus medianamente virulentos, inoculados por via venosa em coelhos adultos, passam do mesmo modo por uma phase inicial toxica, porem menos accentuada, podendo os animaes vir ou não a morrer nesta phase, seguida de uma outra, pyohemica, com abcessos nos rins, figado, pulmões, myocardio, por vezes arthrites, paralyrias, etc.

A antitoxina teria a propriedade de neutralizar essa phase toxica, quando em quantidade sufficiente no organismo e desde que não fosse exgottada por uma elaboração maior e constante da toxina por parte do germe infectante. Mas, naquellas condições experimentaes, não evitaria, por seu exgottamento final, o ataque posterior pyohemico ou septico, sempre tardio, do qual decorreria finalmente a morte, por uma intoxicação successiva e lenta. A standardização de uma dose de cultura de maneira a determinar a dose minima sufficiente para provocar a phase toxica mortal em coelhos adultos ou para permittir a ob-

servação rigorosa dos 2 ataques (toxico e septico) num rythmo chronometrico, é quasi que impraticavel, dada a resistencia individual, differente para cada animal, que responde deste ou daquelle modo. Si partirmos de infecções localizadas na esperança de se obter a generalização da infecção, os resultados ainda mais disparatados se mostrarão e por elles nada se pode concluir. No homem, as septicemias decorrentes de focos bem localizados, ou são brutaes e matam o individuo em poucas horas por uma intoxicação intensa, ou são mais attenuadas e mesmo pouco perceptíveis, só se revelando na phase pyoseptica, por localizações diversas. Uma immunização antitoxica, activa ou passiva, permanente, constante, de maneira a tornar o teor antitoxico do organismo, sinão superior, pelo menos proporcional á quantidade de toxina elaborada, protegendo os elementos de defesa contra a aggressão toxica e permittindo a estes o preenchimento de seus fins, certamente influirá beneficemente. No periodo inicial, focal ou de localização, seria, entretanto, importante debelar a infecção pelo augmento do teor antitoxico do organismo. Não só as nossas verificações therapeuticas com o emprego da anatoxina como as de Dolman, Jamieson (24), Kindel e Costello (76), Parish e Clark e tambem as de Greebaum, Harkins (18) e Weis (69), e outros, com toxina não modificada são demonstrativas da facilidade como se resolvem os furunculos, anthrazes e outras lesões estaphylococcicas, com o emprego deste methodo de immunização.

Por outro lado, si as infecções estaphylococcicas são geralmente localizadas, a intoxicação organica que pode derivar dos focos multiplos, por si só, é sufficiente para orientar uma therapeutica antitoxica concomitante aos demais methodos communs de tratamento. É por uma intoxicação successiva e lenta que, na maioria das vezes, os organismos, muitos já com menor resistencia, não reagem de modo sufficiente e posteriormente não supportam a violencia do ataque cada vez mais intenso. A abertura cirurgica dos focos, sempre que possivel, é indicada como meio de derivar grande parte dos germes e da toxina para o exterior, evitando a infiltração e a diffusão destes no organismo. Taylor (62), cita casos de tetano em tratamento pela antitoxina, com recidivas e que só cederam pela abertura e raspagem do foco antigo, já completamente cicatrizado. A toxina elaborada lenta e successivamente no foco (tecido necrotico e pus do qual foi isolado o *Cl. tetani*), aparentemente inexistente dada a sua completa cicatrização, foi exgottando a antitoxina inoculada pelo prazo de mais de 2 semanas, exercendo posteriormente a sua acção sobre as cellulas nervosas, provocando a volta da syndroma.

As nossas experiencias sobre as infecções localizadas provocadas por inoculações intradermicas de culturas em coelhos immunizados passivamente, por injecções de antitoxina *in loco* ou por via venosa, mostraram o effeito protector do soro contra o desenvolvimento da pustula estaphylococcica. A immunização *in loco* preveniu inteiramente o desenvolvimento da infecção, que, no

testemunha, produziu uma lesão necrosante extensa seguida de uma ulcera, pela eliminação do tecido necrosado. A immunização por via venosa, si não preveniu completamente o desenvolvimento da infecção, contudo não permittiu mais do que uma ligeirissima lesão inflammatoria *in loco*, que cedeu rapidamente.

As inoculações cerebraes em cobaias immunizadas passivamente, mostraram, como vimos, uma maior sobrevivencia destas em relação ás testemunhas. A pequena quantidade de antitoxina inoculada, exgottando-se por sua neutralização da toxina gradativamente secretada, não permittiu uma reacção organica maior, não conseguindo evitar, assim, a maior proliferação da bacteria em terreno muito sensivel e a consequente invasão do organismo.

A immunização antitoxica do homem pode ser obtida activa ou passivamente.

Com o emprego da toxina, por inoculações de doses crescentes, Greenbaum e Harkins, Pilot e Afrenow (54), Weise e outros conseguiram augmentar o teor antitoxico dos soros de pacientes portadores de lesões estaphylococcicas diversas, havendo, na maioria dos casos, resultados conclusivos sobre o valor therapeutico do methodo. O emprego da toxina teria o inconveniente de provocar accentuadas reacções locais, podendo mesmo chegar á necrose, si a dose fosse um pouco mais forte. Todavia, os estudos de Burnet sobre a possibilidade de a toxina estaphylococcica transformar-se, quando tratada pelo formol, em uma verdadeira anatoxina no sentido de Ramon, com a perda completa do poder toxico e conservação do poder antigenico, permittiram a utilização definitiva deste methodo na therapeutica humana (Dolman, Jamieson e Powel, Kindel e Costello, Parish, O'Meara e Clark).

Os nossos estudos sobre a anatoxina estaphylococcica mostraram que, conforme a dose de formol empregada, a temperatura de incubação e o pH do meio, obtêm-se productos atoxicos que, inoculados em animaes e no homem, lhes elevam de muito o teor antitoxico dos soros. Por inoculações subcutaneas repetidas em cavallos, conseguimos attingir um titulo antitoxico que, mesmo após posteriores inoculações de toxina não modificada, não foi ultrapassado. Este facto mostra que o estimulo primario da anatoxina é sufficiente para attingir o mais alto titulo da curva da immunidade antitoxica nos animaes e demonstra a conservação do poder antigenico pela toxina após tratamento pelo formol. Coelho inoculados pelas vias intradermica ou subcutanea com esta anatoxina, como vimos, apresentam, não só um maior teor antitoxico no soro sanguineo, como se mostram immunes ás inoculações da toxina, tanto por via intradermica, como por via venosa. A via venosa não se prestou á immunização dos animaes.

Esta anatoxina tambem conserva a propriedade de ser fixada pela antitoxina e, ainda, segundo o demonstraram Burnet e Gengou, floccula especificamente em presença da antitoxina. Outrosim, no homem as inoculações de anatoxina provocaram-lhe o augmento do teor antitoxico do soro. Os resultados therapeuticos por nós obtidos e que serão demonstrados em trabalhos ora em pre-

paro, são favoráveis e recommendam o methodo na pratica corrente das estaphylococcicas localizadas em geral.

Chamou-nos a attenção o facto de os soros de certos individuos portadores de lesões estaphylococcicas chronicas (osteomyelite), apresentarem, sem previa immunização, um titulo antitoxico elevado, muitas vezes proximo ao de outros que o conseguiram á custa de uma immunização activa pela anatoxina. A lesão dos primeiros, chronica, não mostra signaes de regressão, apesar do teor antitoxico elevado do sangue, enquanto que nestes mesmos titulos, as dos ultimos (furunculose, anthrazes) cicatrizam-se totalmente. Este facto talvez esteja ligado á propria natureza da lesão. Na lesão chronica, o foco reveste-se de formações diversas que constituiriam uma parede defensiva, por vezes espessa, que delimita toda a area necrosada da lesão. Ora, sabe-se que a antitoxina não é dialysavel, enquanto que as exotoxinas o são, embora lentamente. A toxina dialyzavel forneceria o elemento antigenico que estimularia a formação da antitoxina, mas esta não poderia transpor a barreira, pelo menos em quantidade sufficiente para collocar o estaphylococco em condições de menor aggressividade. Decorre dahi o facto da necessidade da intervenção cirurgica nos focos chronicos com o fim de retirar essas formações, a qual, acompanhada da immunização antitoxica activa ou passiva, segundo os casos de maior ou menor reacção do organismo, provavelmente facilitará os resultados therapeuticos.

A immunização passiva do homem é feita pela inoculação da antitoxina elaborada em animaes de grande porte (cavallos), hyperimmunizados com a anatoxina ou a toxina. A preparação da antitoxina em escala industrial foi tambem por nós realizada e discutida sob o ponto de vista technico. As inoculações de toxina, em cavallos, segundo as experiencias do Parker, tornam-se perigosas, não supportando os animaes as injecções de uma quantidade maior de filtrado. Alem disso, a acção necrosante da toxina provoca por vezes lesões extensas da injecção, desenvolvendo-se abcessos e escaras. Os nossos cavallos foram immunizados com anatoxina em doses crescentes, supportando bem essas inoculações, mesmo até um volume de 150cc., dado de uma só vez em logares diversos. Nas inoculações posteriores com toxina, quando a dose era elevada, observámos edema e por vezes abcessos. As reacções febris dos animaes foram de pequena monta, mantendo-se numa media de 38°5 e 39°.

Somente com as inoculações de anatoxina conseguiu-se attingir o titulo antitoxico maximo que puderam desenvolver os animaes, titulo que não pode ser ultrapassado após repetidas inoculações de toxina.

Para os doseamentos da antitoxina uma vez que as nossas experiencias, coincidentes com as de Burnet, nos proporcionaram a unidade da antitoxina e, consequentemente, a unidade antigenica dos filtrados, usámos um methodo que se assemelha ao de doseamento das antitoxinas tetanica e diphterica.

Esse methodo tem a vantagem de afastar as causas de erro que foram acima assignaladas. Consiste na determinação previa da menor quantidade de toxina

que, em presença da unidade de antitoxina tomada como padrão, produz systematicamente a queda tetanizante e a morte, em cobaias, dentro de certas bases experimentaes, quantidade essa ($L\ddagger$) que é tomada como unidade para a avaliação do poder neutralizante das antitoxinas a dosear. Tomámos provisoriamente como unidade da antitoxina padrão a menor quantidade de antitoxina que, misturada e após incubação a 37° com 10 D.T.L. da toxina avaliada na vespera, evita, não só a queda dos animaes nos 30 minutos de observação, como a sua morte nas 24 horas. Desde que se possam aperfeiçoar os methodos de immunização, obtendo-se titulos antitoxicos superiores aos actuaes, poder-se-á augmentar a unidade da antitoxina padrão de 10 vezes, como actualmente se faz nos doseamentos de antitoxina diphterica. Com toxinas dessecadas, calculadas relativamente ao peso, é possivel obterem-se as 100 D.T.L. em volume pequeno, dentro das condições requeridas pelo methodo.

Tambem ficou demonstrada pelos nossos estudos experimentaes a possibilidade de concentrar-se a antitoxina pelo methodo commummente usado para a refinação das antitoxinas diphterica, tetanica, etc.. Si bem que, após concentração, tivessemos antitoxinas que alcançaram titulos superiores a 2.500 unidades por cc., por motivos de ordem industrial a distribuimos em empolas de 10 cc. correspondente cada cc. a 500 unidades.

Aguardamos a oportunidade para a experimentação therapeutica deste producto, o que será feito com a cooperação valiosa dos drs. J. A. Arantes e J. T. Piza, do Hospital Emilio Ribas de São Paulo.

SUMMARIO

I — Com certas amostras toxigenicas de estaphylococcus consegue-se preparar uma toxina de alto valor lytico, em culturas, tanto em meio liquido, como em meio solido e mantidas numa atmospherica de 10 a 20 % de CO_2 .

II — Os filtrados estaphylococcicos mostram accentuado poder lytico, não só para as cellulas sanguineas (hematias, leucocytos, hematoblastos), como para as cellulas dos demais tecidos. Inoculados por via intradermica, produzem uma lesão necrosante intensa; por via venosa matam o coelho e outros animaes em poucos minutos; por via cerebral produzem uma syndroma tetanizante em curto espaço de tempo, seguida de morte do animal.

III — As culturas de estaphylococcus pathogenicos coagulam o plasma e lysam a fibrina; tambem certas culturas de estaphylococcus, por via oral, produzem uma syndroma gastro-intestinal. A acção coagulante do plasma e o veneno gastro-intestinal parecem separar-se do principio toxico, filtravel, e por conta deste decorrem todas as demais acções toxicas estudadas: acção lytica, acção necrosante, acção letal e acção tetanizante.

IV — Este principio possui as propriedades geraes das exotoxinas.

V — A toxina é elaborada *in vivo*.

VI — A toxina demonstrou possuir um poder antigenico accentuado. Soros dos animaes immunizados neutralizam as acções toxicas do principio activo filtravel. Os animaes immunizados activamente mostram-se immunes ás acções necrosante e letal da toxina. Os animaes immunizados passivamente e por um determinado espaço de tempo, são protegidos segundo a dose de antitoxina inoculada, contra as acções necrosante, letal e tetanizante de toxina. A antitoxina parece não possuir poder curativo manifesto em relação á syndroma tetanizante aguda, provocada na cobaia pela inoculação transocular da toxina.

VII — Coelhos immunizados activa ou passivamente, resistem por maior espaço de tempo do que os testemunhas, quando submettidos a uma injeccção intravenosa de cultura de estaphylococcus. O mesmo acontece em cobaias immunizadas passivamente e inoculadas por via cerebral com cultura de estaphylococcus virulentos. Coelhos immunizados passivamente mostram grande resistencia ás infecções localizadas da pelle, provocados experimentalmente.

VIII — A toxina sob a acção do formol transforma-se, em poucas horas, em uma anatoxina no sentido de Ramon. Ella é antigenica, é fixavel pela antitoxina e floccula em presença desta. Do ponto de vista scientifico e pratico é indiscutivel o valor da anatoxina no tratamento das estaphylococcias.

IX — A antitoxina pode ser obtida, em escala industrial, conforme processo descripto no texto. O doseamento corrente da antitoxina baseia-se na sua acção neutralizante sobre o poder tetanizante da toxina, evitando-se por este methodo as varias causas de erro. A antitoxina estaphylococcica pode ser concentrada pelo methodo de precipitações fraccionadas, usualmente empregado na concentração de outras antitoxinas: diphterica, tetanica, escarlatinica, anti-venenos, etc..

ABSTRACT

It is possible to prepare a highly lytic toxin by using certain toxigenic samples of *Staphylococcus aureus* in solid or liquid media and maintained under 10 to 20% CO².

The lytic power of the filtrate of such cultures affects not only blood cells (red cells, leucocytes and hematoblasts) but the cells of other tissues as well. When inoculated intradermally the filtrates cause an intense necrosis; intravenously, they kill rabbits and other animals in a few minutes; intracerebrally, they bring about a tetanizing syndrome after a short incubation.

Cultures of pathogenic staphylococci are apt to clot the plasma and to lysate the fibrin; certain of them on oral administration also cause a gastro-enteric

syndrome. The plasma coagulating power and the gastro-enteric poison both seem to be independent from the main filterable principle which is apparently responsible for the remaining toxic actions that have heretofore been investigated: lytic, necrosing, lethal and tetanizing actions.

The filterable principle bears the general properties of exotoxins.

The toxin is elaborated *in vivo* and has shown to bear a highly antigenic power. The serum of animals immunized against it is able to neutralize all of its toxic actions. The animals regularly inoculated with it prove to be immune to its necrosing and lethal effects.

Depending on its dosis the animals passively immunized with the antitoxin appear protected for a while against the toxic, the necrotic, the lethal and the tetanizing effects of the toxin. The antitoxin seems not to bear any definite curative power as regards the acute tetanizing syndrome guinea-pigs develop following transocular inoculation of the toxin.

Rabbits immunized either actively or passively survive for a longer period than the controls to an intravenous injection of a staphylococcus virulent culture. Guinea-pigs passively immunized show an identical resistance when cerebrally inoculated with a staphylococcus virulent culture. Passively immunized rabbits develop a great resistance to experimental infections localized on their skin.

Under the action of formalin the toxin rapidly (in a few hours) changes into anatoxin. It remains antigenic and is apt to be fixated by the antitoxin in the presence of which it also flocculates. From both the scientific and the practical standpoints the value of the anatoxin in the treatment of staphylococcic (*St. aureus*) infections is indiscussable.

The staphylococcic antitoxin may be produced in an industrial scale like other antitoxins. Its principal method of titration is based on its neutralizing action on the tetanizing effect of the toxin. The antitoxin can also be concentrated by the fractionated precipitation method as employed in the case of other antitoxins.

BIBLIOGRAPHIA

1. Burnet, F. M. — J. of Path. and Bact. XXXII(4):717.1929; idem XXXIII(1):1.1930; idem XXXIV(4):471.1931; idem XXXIV(6):759.1931.
2. Brice, L. M. & Burnet, F. M. — J. of Path. and Bact. XXXV(2):183.1932.
3. Burky, E. L. — J. of Immunology XXIV(2):93, 115, 127.1933; idem XXIV(5):419, 513.1933; Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXXI(1):75.1933.
4. Bail, O. — Zeitschr. f. Hyg. XXXII:133.1898.
5. Barker — Philippine J. of Science IX:515.1914.
6. Borthwick, G. R. — Brit. J. of Exper. Path. XIV(4):236.1933.
7. Bowler, J. P. & Boardman, J. J. — New England J. Med. CC:327.1929.

8. *Bigger, J. W.; Boland, C. R. & O'Meara, R. A.* — J. of Path. and Bact. XXX:271.1927.
9. *Bigger, J. W.* — J. of Path. & Bact. XXXVI(1):87.1933.
10. *Christmas* — Ann. Inst. Pasteur II: .1888.
11. *Combiesco, N.; Combiesco, D. & Istrati, G.* — C. R. Soc. Biologie CXIV(30):292.1933.
12. *Dolman, C. E.* — Trans. Can. Publ. Health J. XXIII:125.1932 in St. Connaught Lab., Toronto V.1931/32; Trans. Royal Soc. Can. XXVI. Sect. V:309.1932 in St. Connaught Lab., Toronto V.1931/32; J. Amer. Med. Assn. C(13):1007.1933.
13. *Dack et als* — J. Prev. Med. IV:167.1930.
14. *Gross, H.* — Klin. Woch. XI:1079.1929; Centralbl. f. Bakt. Ref. XCVI(19/20):14. 1930; Centralbl. f. Bakt. Orig. CXV:367.1930; idem CXXII:359.1931; Zeitschr. f. Immun. LXXIII:14.1931; idem LXXIX:163.1933; Klin. Woch. XII:315.1933; idem XII:907.1933.
15. *Gengou, O.* — Arch. Int. Med. Exper. IV:211, 633.1930; Ann. Inst. Pasteur XLVIII:19, 135.1932; idem LI:14.1933.
16. *Gratia, A.* — C. R. Soc. Biol. XCI:1442.1924; idem XCII:461,1125.1925; idem XCIII: 451.1926; idem XCIV:1267.1927; idem CIV:1058.1930.
17. *George, P. & Giroire, H.* — Presse Méd. XXXIV(39):611.1926.
18. *Greenbaum, S. S. & Harkins, M.* — J. Amer. Med. Assn. XC:1699.1928; idem XCV: 815.1930; Arch. Dermat. Syph. XX:245.1929.
19. *Hektoun, L.* — J. Amer. Med. Assn. XLVI:1407.1906.
20. *Jordan, E. O.* — J. Amer. Med. Assn. XCVII(23):1704.1931.
21. *Jordan, E. O. & McBroon, J.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXIX:161.1931.
22. *Jordan, E. O. & Burrows, W.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXX(4):448.1933.
23. *Julianelle, L. A.* — J. Inf. Dis. XXXI:256.1922.
24. *Jamieson, W. A. & Powell, H. M.* — Amer. J. of Hyg. XIX(1):246.1934.
25. *Kellaway, C. H.; Burnet, F. M. & Williams, F. E.* — J. of Path. and Bact. XXXIII(4): 889.1930; idem XXXV(2):199.1932.
26. *Kraus, R.* — Wien. Klin. Woch. XIII:49.1900.
27. *Kraus, R. & Pribram, E.* — Wien. Klin. Woch. XIX:493.1906.
28. *Kendall, A. J. & Walker, A. W.* — J. Inf. Dis. XVII:442.1915.
29. *Lowenstein, P. S.* — J. Amer. Med. Assn. XCVII(5):319.1931; Amer. J. Med. Sc. CLXXXI(2):196.1931.
30. *Lingelsheim* — Aetiologie und Therapie der Staphylokokkeninfektion, Berlin, 1900.
31. *Leber,* — Fortschr. der Med. (2). .1888.
- 31a. *Menkin, V. J.* — J. Exper. Med. LVII(6):977.1933.
32. *Mosny & Marcano* — C. R. Acad. Sc. CXIX:962.1894.
33. *McBurney, R.* — J. Amer. Med. Assn. C(25):1999.1933.
34. *Muller, L.* — C. R. Soc. Biol. XCVI:189.1927.
35. *Nicolle, M. & Cesari, E.* — Ann. Inst. Pasteur XXVIII:219.1914.
36. *Neisser, M. & Wechsberg, F.* — Munch. Med. Woch. XLVII:1261.1900; Zeitschr. f. Hyg. XXXVI:299.1901.
37. *Nélis, P.* — C. R. Soc. Biol. CXIII(17):7.1933; CXIII(32):598.1933; Ann. Inst. Pasteur LII(16):597.1934.
38. *Nélis, P. & Bouckaert, J. J.* — C. R. Soc. Biol. CXIII(26):1157.1933.
39. *Nélis, P. & Picard, E.* — C. R. Soc. Biol. CXIII(28):321.1933.
40. *Otten, M.* — Deut. Arch. Koin. Med. XC:461.1907.
41. *Oppenheimer, H.* — Centralbl. f. Bakt. Orig. LIX:188.1911.
42. *Pett, M. M.* — Tice Loose-leaf Practice of Med. V:421.1921, W. F. Prior Company.
43. *Parker, J. T.* — J. Exper. Med. XL:761.1924.

44. *Parker, J. T.; Hopkins, J. C. & Gunther, A.* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXIII: 344.1925.
45. *Parker, J. T. & Banzhaf, E. J.* — J. of Immunology XIII:25.1927.
46. *Parker, J. T. (Weld) & Gunther, A.* — J. Exper. Med. LIV(3):315.1931.
47. *Parish, H. J.* — Brit. Med. J. II(3788):277.1933.
48. *Parish, H. J. & Clark, W. H. M.* — J. Path. and Bact. XXXIV:593.1931; idem XXXV(2):251.1932.
49. *Parish, H. J.; O'Meara, R. A. & Clark, W. H. M.* — Lancet CCXXVI(5777): 1054.1934.
50. *Parish, H. J. & Okell, C. C.* — Lancet CCXIV:746.1928.
51. *Panton, P. N. & Valentine, F. C. O.* — Brit. J. Exper. Path. X:257.1929; Lancet CCXXII:506.1932.
52. *Panton, P. N.; Valentine, F. C. O. & Dir, V. W.* — Lancet CCXXI:1180.1931.
53. *Pike, R. M.* — J. of Immunology XXVI(1):69.1934.
54. *Pilot, I. & Afremow, M. L.* — J. Amer. Med. Assn. LXXXIX(12):939.1927.
55. *Reed, A. C. & Stiles, F. E.* — California and West Med. XXVI:492.1927.
56. *Rodet & Courmont* — Revue de Med. XIII:84.1893.
57. *Russ, V. K.* — Zeitschr. f. Exper. Path. Th. XVIII:220.1916.
58. *Ramsy & Tracy* — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXVIII:390.1931.
59. *Soper, W. B.* — Proc. New York Path. Soc. XII:225.1912.
60. *Sudhues, M.* — Zeitschr. f. Immun. LXXX:42.1933.
61. *Timmerman, W. A.* — Nederland Tijdschr. Hyg. Mic. Serol. VII:178.1932 ref. Biol. Chemistry XXVII:335.1933.
62. *Taylor, F. W.* — J. Amer. Med. Assn. CII(12):895.1934.
63. *Travassos, J.* — C. R. Soc. Biol. CXIV(30):369,371.1933; idem CXV(12):1354, 1356.1934.
64. *Van de Velde, H.* — La Cellule X(2):403.1894.
65. *Van de Velde, H. & Denys* — La Cellule XI:395.1895.
66. *Woolpert, O. C. & Dack, G. M.* — J. Inf. Dis. LII(1):6.1933.
67. *Walbum, L. E.* — Bioch. Zeitschr. CXXIX:367.1922.
68. *Wadsworth, A. B. & Hoppe, E. N.* — J. of Immunology VI:399.1921.
69. *Weise, E. C.* — J. Amer. Med. Assn. XCV:324.1930.
70. *Willstätter, Krant & Erbacher* — Berl. d. deutsch. Chem. Gesellschaft LVIII:2448.1925.
71. *Wassermann, A. & Takaki, T.* — Berl. Klin. Woch. XXXV:5.1898.
72. ———— Lancet CCXIX(5592):974.1930.
73. *Zdrodowski, P. & Voronine, E.* — Ann. Inst. Pasteur XLVIII(5):617.1932.
74. *Branham, S. E. & Lillie, R. D.* — J. Bacteriology XXV:90.1933; Publ. Health. Rep. XLVII:1683,2137.1932.
75. *Ferry, N. S.; Norton, J. F. & Steeb, A. H.* — J. Immunology XXI(4):293.1931.
76. *Kindell, D. & Costello, M. J.* — J. Amer. Med. Assn. CII:1287.1934.

(Trabalho da Secção de Immunologia Experimental e Soroterapia do Instituto Butantan, recebido em maio de 1934. Dado á publicidade em dezembro 1934).



Ação dermatotóxica da toxina



Lesões necrosantes produzidas pela inoculação da toxina 115,
por via intradérmica.



Fig. 1

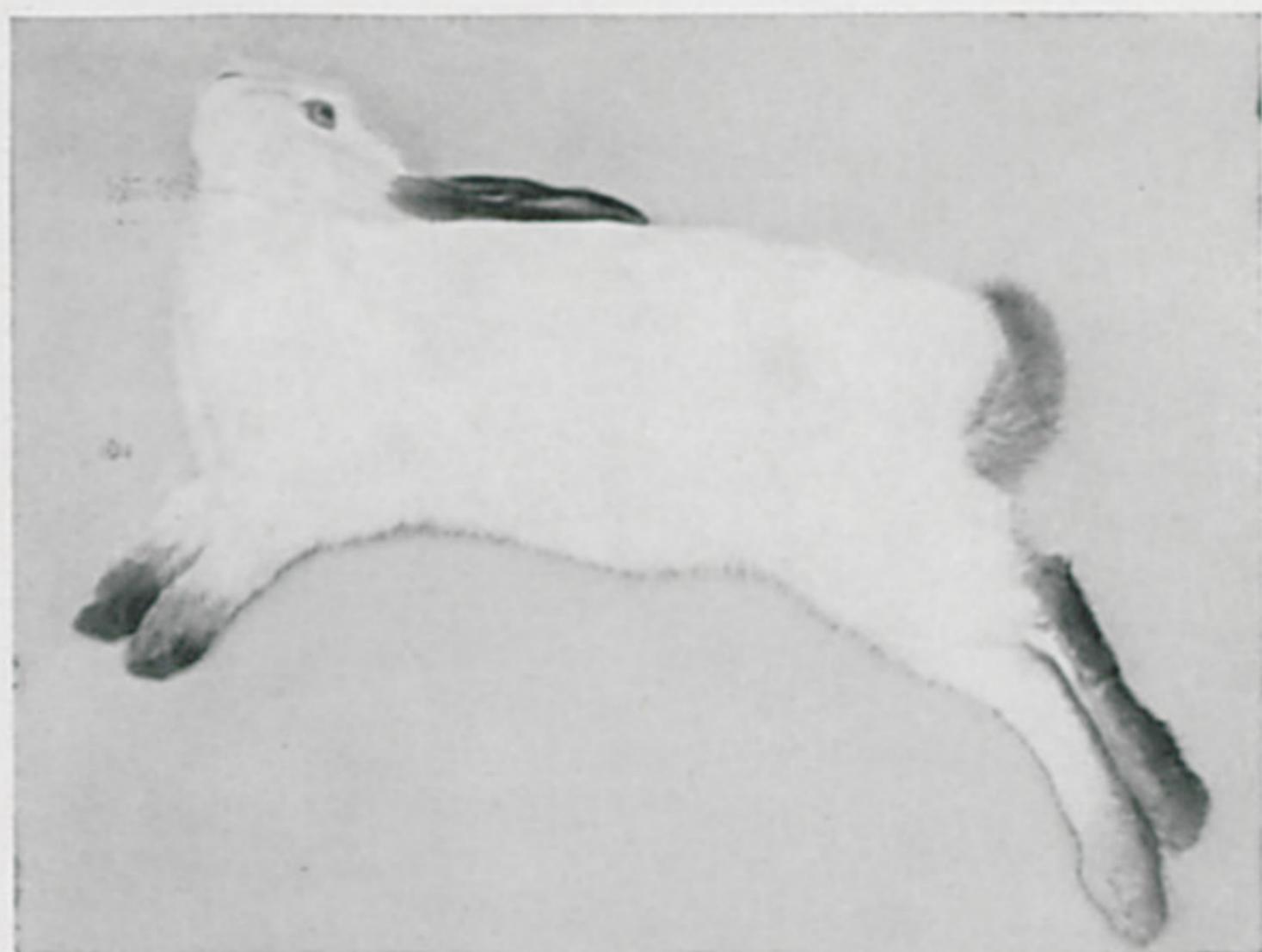


Fig. 2

Cobaias e coelho em tetania, inoculados com a toxina estaphylococcica por via transocular.