

SOBRE O PHENOMENO DE D'HÉRELLE

O BACTERIOPHAGO NAS POLPAS VACCINICAS GLYCERINADAS. CONSIDERAÇÕES SOBRE A NATUREZA DO PHENOMENO (*)

POR

J. LEMOS MONTEIRO

Poucos são os trabalhos que se referem a pesquisas de principios lyticos, com os caracteristicos do bacteriophago, nas polpas vaccinicas glycerinadas.

Twort, em 1915, semeando a lymphá vaccinica em tubos de gelose, verificou, após 24 horas a 37°, areas de aspecto aquoso e observou que, nas culturas onde se desenvolviam os micrococcus, as colonias destes tornavam-se vitreas e transparentes. Uma cultura pura de micrococco, isolado da lymphá, tocada com um fragmento da colonia transparente, tomava este aspecto, sendo logo toda invadida.

Este principio transparente, mesmo diluido a 1 por 1.000.000 em solução physiologica, atravessa facilmente os filtros finos de porcelana, sendo uma gotta do filtrado, espalhada n'um tubo de gelose, sufficiente para tornal-a impropria á cultura do micrococco. Se este for semeado, logo que começa a desenvolver-se, a cultura mostra pontos transparentes, que se estendem por toda a superficie do meio, dependendo a intensidade do phenomeno da diluição do material original.

Este estado ou doença dos micrococcus, como o chamou Twort, pode ser transmittido em serie, n'um numero infinito de gerações, sempre á custa dos micrococcus.

Esta observação de Twort é anterior á primeira communicação de d'Hérelle sobre o phenomeno da bacteriophagia.

D'Hérelle, baseando-se na propria descripção de Twort, não identifica a verificação deste com o phenomeno que descreve pela primeira vez dois annos depois.

Assignala d'Hérelle que no phenomeno de Twort "*não se trata de uma lyse, dissolução de uma bacteria*", ha uma fragmentação dos coccus, tratando-se, pois, de um phenomeno de bacterioclasia. Diz mais que na bacteriophagia o que se produz é uma *dissolução total* do corpo microbiano, sem nenhum residuo.

(*) Trabalho entregue para publicação em agosto de 1929.

E' surprehendente o facto de não serem bastante numerosos os trabalhos referentes a pesquisas, segundo a technica de d'Hérelle, do bacteriophago nas polpas vaccinicas.

Somente Gratia, tendo isolado de uma polpa vaccinica um bacteriophago para o estaphylococco, cita pesquisas que fez a respeito e pelas quaes procura mostrar a identidade do phenomeno de d'Hérelle com o de Twort.

Segundo d'Hérelle, porém, a verificação de Gratia mostra sómente que na polpa vaccinica podem ser encontrados os dois principios que provocam os phenomenos da bacterioclasia e o da bacteriophagia.

Sabemos que na polpa vaccinica, ao lado de elementos cellulares e do virus, se encontra associada uma flora microbiana, impossivel de ser evitada e na qual predominam os coccus (micrococcus e estaphylococcus).

Por outro lado, durante o periodo de evolução das pustulas, 5 dias geralmente, é quasi que impossivel evitar a contaminação fecal do campo vaccinado do vitello (região thoraco-abdominal). E antes da colheita, por maiores que sejam os cuidados (lavagens repetidas com agua esterilizada, sabão e escova e agua esterilizada pura, por fim) é razoavel acreditar-se na persistencia dessa contaminação da polpa, principalmente por elementos, como o bacteriophago, por ventura existente nas fezes do vitello. Isto porque a existencia deste principio, quando verificada em culturas e em condições que não falam muito a favor da hypothese invocada por d'Hérelle - de um virus autonomo parasita das bacterias, - tem sido explicada pela contaminação por este "virus" cujo habitat principal é o intestino do homem e dos animaes e que é dotado de grande ubiquidade, capaz de atravessar a parede intestinal e infectar os orgams (razão porque pode ser encontrado em productos de origem organica, no sangue, em exudatos etc.) e existente nas aguas dos rios, nos esgotos, na terra, e em tudo que fôr susceptivel de soffrer, directa ou indirectamente, a contaminação fecal.

O modo de acção de principios lyticos porventura existentes nas polpas vaccinicas, nos daria indicações valiosas para o conhecimento de sua natureza e origem.

Como pesquisas preliminares procurámos verificar a existencia do bacteriophago no conteúdo intestinal dos vitellos normaes e vaccinados.

Resumiremos, a seguir estes resultados, apezar de já publicados alhures.

CAPITULO I

O bacteriophago no intestino dos vitellos normaes e vaccinados

E' relativamente facil a verificação da presença do bacteriophago no intestino do homem e dos animaes normaes. No homem, essa presença se assignala desde o 4.º dia após o nascimento (Vedrenne, Suranyi et Kramer), coincidindo com o apparecimento da flora microbiana. Nos individuos normaes, geralmente o principio lytico tem preferencia para o bacillo coli, hospede habitual do intestino, podendo aquelle principio agir tambem sobre outros germes, saprophytas e pathogenos, para os quaes o conteúdo intestinal se torna um habitat favoravel. Entre os germes pathogenos a acção tem-se estudado principalmente em relação aos bacillos dysentericos, typhico, paratyphicos, etc.

Nos animaes e aves, a acção do phago existente no conteudo intestinal se exerce mais facilmente sobre os dysentericos, typhicos e paratyphicos (d'Hérelle).

Nas verificações feitas em 6 bovinos, d'Hérelle nos mostra os resultados seguintes: no 1.º, vivendo n'uma fazenda onde havia typhose aviaria, encontrou um bacteriophago para o bacillo dysenterico Hiss (+++) e bacillo gallinarum (+); no 2.º, nas mesmas condições o phago encontrado mostrou-se activo para o bacillo coli (++), dysenterico Shiga (++), Flexner (+), Hiss (+) e gallinarum (++); no 3.º, vivendo em região indemne de doenças epizooticas, o phago mostrou-se activo para o bacillo coli (+), Shiga (++) e Flexner (++); no 4.º, nas condições do anterior, para o Shiga (++) somente; no 5.º, para o coli (++), Shiga (+++), Flexner (++), Hiss (+) e paratyphico B (++); e no 6.º, o phago existente mostrou-se activo para o coli (+) e Flexner (+). O autor diz possuir, alem destes, outros 42 exemplos comparaveis. Suas verificações foram feitas sobre o b. coli, b. dysentericos (typos Shiga, Flexner e Hiss), b. typhico e paratyphicos A e B, b. do "barbone" e b. gallinarum.

Verificações feitas em vitellos não são assignaladas por d'Hérelle e outros.

Nossas pesquisas foram feitas em 8 vitellos normaes do serviço de vaccina animal do Instituto, n'um dos quaes a verificação foi repetida com material obtido 24 horas após a vaccinação, depois da polpa ter sido colhida e, mais tarde, com o material retirado directamente do recto, por occasião da necropsia do vitello.

A verificação da acção do principio lytico foi feita em relação aos germes do grupo coli-typhico-dysenterico e a estaphylococcos isolados de polpas vaccinicas, ou de origem humana.

Em virtude dos resultados já assignalados por outros autores, referentes á acção dos phagos isolados do conteudo intestinal dos animaes e suas preferencias para os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, e tambem pelos nossos resultados nos 8 animaes examinados, julgamos desnecessario, para o fim que tinhamos em vista, augmentar o numero de verificações.

Technica adoptada.

Com uma espatula esterilizada retiram-se cerca de 20 grs. de fezes recentemente emittidas pelo vitello, escolhendo-se uma parte central e que não tenha soffrido contacto com o exterior e colloca-se n'uma placa esterilizada. Em seguida, este material é introduzido n'um balão contendo 100 c.c. de caldo commum e levado para a estufa a 37°, onde se conserva durante 24 horas.

No fim deste tempo, o caldo turvo com a cultura obtida é filtrado em papel grosso, fino e por fim em vela Chamberland L5, sob uma pressão negativa de 30 a 40 cm. de mercurio.

Com o filtrado obtido, fazem-se as verificações da sua acção lytica em relação ás diferentes especies microbianas. Para avaliar, até certo limite, a actividade do principio lytico, porventura existente no filtrado, para cada typo microbiano, tomamos 4 tubos com 9 c.c. de caldo commum (reacção pH=7,6). No 1.º collocamos 1 gotta do filtrado; no 2.º, 10 gottas; no 3.º, 2 c.c., e no 4.º, testemunha, não é collocado o filtrado. Em seguida, juntamos para cada tubo 1 c.c. de cultura em caldo; de 18 a 24 horas, da especie microbiana a ser verificada. Os tubos são agitados, apresentando-se, conforme o germe usado, mais ou menos opalescentes; depois, são levados para a estufa a 37°. Após 24 horas, faz-se a verificação dos resultados, observando-se o aspecto das culturas comparativamente ao tubo testemunha.

Neste tubo, testemunha, costumamos semear uma alça apenas da cultura, em vez de 1 c.c. como nos outros 3 tubos da verificação propriamente; desta forma é muito grande a differença de quantidade de germes no tubo testemunha e nos com o filtrado e mais evidente se mostrará a acção deste sobre a emulsão microbiana; tambem se saberá se o meio é bastante favoravel para o germe em apreço, partindo-se de menor quantidade de semente ou se é lysogeno, facto que melhor pode ser evidenciado nestas condições.

Uma vez verificado o resultado no caldo (turvação ou dissolução mais ou menos completa), retira-se de cada tubo uma alça carregada e passa-se em estria, sobre um tubo com gelose inclinada, que receberá o numero correspondente.

Os tubos de gelose são levados e conservados na estufa a 37° durante outras 24 horas, depois do que se verifica a existencia, ao longo da estria praticada, de colonias atypicas, influenciadas pelo bacteriophago e que são characteristics do phenomeno de d'Hérelle.

Depois desta verificação em meio solido é que se pode ter ideia da existencia ou não de um phago na cultura, pois muitas vezes, embora turvo o meio liquido, só esta verificação põe em evidencia a existencia do principio lytico. Quando este é muito activo, além da dissolução dos germes no caldo, não se observa desenvolvimento de colonias, mesmo atypicas, na estria em gelose, no tubo correspondente a 1 gotta do filtrado; quando de actividade pequena, no tubo com 2 cc. do filtrado e turvo em caldo, se verificam na gelose raras "plages" ou raras franjas characteristics. Entre estes 2 extremos vêem-se os aspectos decorrentes

QUADRO N.º 1

N.º do vitello	Estaph 45E1	Estaph 45E2	Estaph 45E3	Estaph 46E1	Estaph 46E2	Estaph 46E3	Estaph 38E1	Estaph 38E2	Estaph S. Casa	Estaph M. C.	B. dys. Shiga 980	B. dys. Flexner 2	B. typhico Amparo	B. paratyphico A. 145	B. paratyphico B-3	B. coli communis 14	B. coli communior 13
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+++
54 normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++	0	0	0	0	0
54 24 horas após a vacinação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++	0	0	0	0	0
54 10 dias após a vacinação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0
54 15 dias após a vacinação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0	0	0	0

das diversas actividades e proporções do bacteriophago por ventura existente. No tubo testemunha, a estria em gelose deve ter sempre o aspecto de uma cultura normal.

Resultados.

Os resultados verificados com o material de 8 vitellos estão resumidos no quadro annexo.

A actividade assignalada no quadro é a correspondente ao 2.º tubo, com 10 gottas do filtrado, após a verificação em gelose.

Os signaes significam:

+ : cultura ao longo da estria em gelose, notando-se raras zonas claras e colonias atypicas;

++ : idem, observando-se numerosas zonas claras e colonias atypicas;

+++ : cultura interrompida ao longo da estria, com largos espaços claros com colonias atypicas;

++++ : estria quasi toda clara, observando-se apenas raras colonias atypicas, influenciadas;

+++++ : não se observa colonia alguma, ficando toda a estria clara e o meio com apparencia de esteril;

0 : cultura em estria, de aspecto normal, semelhante ao tubo testemunha.

Os typos microbianos sobre os quaes foi pesquisada a acção dos filtrados foram representados por germes do grupo coli-typhico-dysenterico (b. dysenterico Shiga 980, da collecção, e Flexner 2, b. typhico Amparo, b. paratyphico A 145, b. paratyphico B 3, b. coli communis 14 e coli communior 13) e coccus (estaphyl. 45E1, 45E2, 45E3, 46E1, 46E2, 46E3, 38E1, 38E2, isolados de polpas vaccinicas e estaphyl. Sta. Casa 1 e M.C., de origem humana).

Destes resultados experimentaes verifica-se que, n'um dos vitellos, o de n.º 54, antes de ser vaccinado, isto é, no estado normal, se encontra no conteúdo intestinal um principio lytico cuja actividade se manifesta unicamente para o bacillo dysenterico, typo Flexner 2 da collecção. Realizámos 2 passagens em serie sobre este typo microbiano e, embora a exaltação do principio lytico não se accentuasse muito, apresenta elle todos os caracteristicos do bacteriophago. Este vitello foi escarificado na região thoraco-abdominal com o virus vaccinico, para o serviço de vaccina animal e 24 horas depois é de novo pesquisado o bacteriophago nas fezes. Encontra-se um principio identico ao verificado anteriormente. Após 10 dias da vaccinação e 5 da colheita da polpa, a pesquisa é repetida e o resultado ainda é identico, parecendo, porém, ter havido uma diminuição da actividade do phago em relação ao germe. Por fim, 15 dias após a vaccinação e 10 da colheita da polpa, o animal é sacrificado, por exigencia do serviço de vaccina. Durante

a necropsia, é feita a colheita do material directamente do recto, depois de seccionada a parede intestinal, com todos os cuidados de asepsia. Neste material, com a mesma technica já descripta, se nota agora que o principio lytico existente deixa de agir sobre o *b. dysenterico Flexner 2*, para agir sobre o *b. dysenterico Shiga 980*, embora sua actividade não seja muito accentuada.

Nos outros vitellos normaes, apenas com uma excepção, se encontram principios lyticos que agem sobre germes pertencentes ao grupo coli-typho-dysenterico, de preferencia para os typos Shiga e Flexner.

Em nenhum foi encontrado um bacteriophago que agisse sobre os coccus, quer isolados de polpas vaccinas, quer de origem humana.

Quanto ao numero de especies microbianas estudadas, pode-se allegar talvez que, se maior fosse o numero de typos de coccus (*estaphylococcus*, *micrococcus*, etc.), possivel seria encontrar algum sobre o qual a influencia se manifestaria. No entanto, o numero de representantes do grupo coli-typhico-dysenterico foi ainda mais reduzido do que o de coccus e mesmo assim um ou outro typo daquelle grupo, e ás vezes mais de um, se mostrou influenciado pelo phago existente no conteudo intestinal do animal.

A polpa vaccinica do vitello 18, recebe o numero 4538; do vitello 31, o numero 4545; do vitello 54, o numero 4568 e do vitello 55, o numero 4569. Nestas polpas, assim como em outras em differentes periodos de permanencia no frigo, são feitas pesquisas relativas á presença do bacteriophago e sua acção, e os resultados serão dados a seguir.

CAPITULO II

O bacteriophago nas polpas vaccinicas glicerinadas

Veremos agora os resultados obtidos com as pesquisas praticadas nas polpas vaccinicas glicerinadas, em differentes periodos de permanencia no frigo de -5° a -8°C. , algumas provenientes de vitellos em cujas fezes esta verificação havia tambem sido feita.

Technica adoptada.

A polpa vaccinica, depois de colhida e pesada, é geralmente addicionada de 3 a 4 partes do seu peso de glicerina pura, neutra (Schering). Depois de emulsionada com uma espatula é collocada no aparelho triturador, onde soffre uma primeira trituração grossa que torna mais intimo o contacto da glicerina; em seguida, a polpa é levada para um aparelho "frigo" onde é mantida n'uma temperatura que oscilla entre -5° e -8°C.

Para a pesquisa do bacteriophago na polpa vaccinica tomamos 1 c.c. da emulsão glicerinada e semeamos em 100 c.c. de caldo commum. Incubação a 37° durante 24 ou 48 horas (*).

No fim deste tempo o caldo apresenta-se turvo em virtude do desenvolvimento dos germes contidos na polpa semeada; a cultura é filtrada em papel e em vela Chamberland L2 ou L5, sob pressão negativa de 30 a 40 cm. de mercurio.

Com o filtrado fazem-se as verificações da sua acção lytica em relação a culturas recentes das differentes especies microbianas.

Para cada germe tomam-se 4 tubos com 9 c.c. de caldo commum (pH=7,6); no 1.º, colloca-se 1 gotta de filtrado, no 2.º, 10 gottas, no 3.º, 2 c.c. e no 4.º, que servirá de testemunha, não se junta o filtrado. Adiciona-se em seguida, 1 c.c. da emulsão microbiana (cultura em caldo de 18 a 24 horas). Os tubos são agitados e levados para a estufa a 37°, durante 24 horas.

No tubo testemunha costumamos tambem semear apenas 1 alça da cultura em caldo, em vez de 1 cc. como nos outros 3, sendo, por isso, consideravel a differença de quantidade de germes nestes em relação áquelle. Esta technica tem a vantagem de mais seguramente evidenciar a possivel acção lytica do filtrado; mostra tambem se o meio é favoravel ao desenvolvimento da cultura, partindo de menor porção de germes e dá ainda indicações sobre se a cultura é ou não lysogena, facto que assim melhor se revela.

Verificado o resultado no caldo, uma alça carregada de cada tubo é passada em estria sobre a gelose inclinada em outro tubo que receberá o numero correspondente.

Os tubos de gelose são levados para a estufa a 37° durante 24 horas, verificando-se então o aspecto da cultura desenvolvida ao largo da estria (aspecto normal, existencia de "plages" ou zonas claras, colonias atypicas, influenciadas, etc.) e que nos dará informações sobre a existencia e actividade do principio, de accordo com as varias proporções do filtrado ajuntado em relação ao germe em apreço.

Só depois desta verificação em meio solido é que se pode ter uma ideia da existencia ou não de um phago na cultura, pois muitas vezes, embora turvo o caldo, é ella que vem evidenciar o phenomeno.

Parte experimental.

I. *Polpa n.º 4569* (proveniente do vitello 55 (**)), semeada immediatamente após a colheita e addição de glicerina e de ter soffrido uma primeira trituração grossa.

(*) N'uma polpa semeada em balão que permaneceu 10 dias a 37°, verificámos o mesmo resultado observado após 48 horas apenas.

(**) Antes da colheita da polpa, após a lavagem, havendo reacção inflammatoria local um pouco intensa, faz-se agir, sobre a zona vaccinada, uma solução de verde brilhante a 1:50.000, durante 10 minutos. O corante é eliminado por varias lavagens com agua esterilizada e o campo é enxuto, procedendo-se a colheita.

A acção lytica do filtrado da cultura é verificada em relação aos germes abaixo assignalados, sendo o resultado indicado observado no tubo onde se adicionaram 10 gottas do filtrado:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	LL	++++
„ 45E2	T	0
„ 45E3	T	0
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	T	0
„ 38E1	T	0
„ 38E2	T	0
„ 47E1	T	0
B. dys. Shiga 980	T	0
B. dys. Flexner 2	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Os signaes com que assignalamos os resultados com 10 gottas do filtrado (2.º tubo) têm a seguinte significação:

T - turvação (como no tubo testemunha);

L - lyse ou dissolução apenas perceptivel;

LL - lyse ou dissolução incompleta;

LLL - lyse ou dissolução completa.

+ - cultura ao longo da estria, notando-se raras zonas claras e colonias atypicas;

++ - idem, observando-se numerosas zonas claras e colonias atypicas;

+++ - cultura interrompida ao longo da estria, com largos espaços claros com colonias atypicas;

++++ - estria quasi toda clara, observando-se apenas raras colonias atypicas influenciadas;

+++++ - não se observa colonia alguma, ficando toda a estria clara e o meio com a apparencia de esteril;

0 - cultura em estria, de aspecto normal, semelhante ao tubo testemunha.

Esta polpa é proveniente do vitello n.º 55 em cujo conteudo intestinal se encontrou um bacteriophago activo (++) para o bacillo dysenterico Flexner 2.

Verifica-se, pelo resultado acima, que ella possui, depois de emulsionada em glicerina e antes de ter permanecido no frigo, um principio lytico que age sobre um dos typos de estaphylococcus empregados (estaphyl. 45E1), não tendo acção sobre os outros e sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

II. *Polpa n.º 4545* (proveniente do vitello 31). Colheita, addição de glicerina, primeira trituração grossa e collocação no frigo em 21/5/928.

Parte da cultura é filtrada após 48 horas e o restante após 10 dias de permanencia a 37°.

Resultado da acção do filtrado da cultura de 48 horas:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	0
„ 45E2	T	0
„ 45E3	T	++
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	LLL	++++
„ Sta. Casa 1 (*)	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Esta polpa provém do vitello n.º 31 em cujo conteudo intestinal foi verificada a presença de um bacteriophago para o bacillo dysenterico Shiga 980 (+++).

Pelo resultado acima vê-se que ella contém um bacteriophago activo para 2 dos typos de estaphylococcus verificados (45E3, isolado desta propria polpa e 46E3) para o qual a actividade é maior, não mostrando acção sobre os outros, mesmo d'ella tambem isolados (45E1 e 45E2), nem sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

Os 3 tubos da verificação sobre o estaphylococcus 46E3 são filtrados e, fazendo-se 3 passagens em serie sobre este germe, nota-se a exaltação da actividade do filtrado após cada passagem.

O resultado da actividade após a primeira passagem pode ser verificado pela photographia da fig. 1.

(*) De origem humana.

Resultado da acção do filtrado da cultura após 10 dias de estufa a 37°:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	0
„ 45E2	T	0
„ 45E3	T	++
„ 46E1	T	0
„ 46E2	T	0
„ 46E3	T	+++
„ Sta. Casa 1 (*)	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Verifica-se assim que, após 10 dias, o principio lytico existente é semelhante ao observado após 48 horas, parecendo apenas que sua actividade tenha diminuido um pouco.

Com este phago realizamos tambem 3 passagens sobre o estaph. 46E3, sendo que sua exaltação, após as passagens, foi menos accentuada do que com o filtrado de 48 horas.

III. *Polpa n.º 4568* (proveniente do vitello 54). Colheita, addição de glicerina, primeira trituração grossa e collocação no frigo em 17/7/928.

Semeada para a pesquisa do bacteriophago após 2 mezes de permanencia no frigo. Verificação da acção lytica do filtrado da cultura após 24 horas.

No conteudo intestinal do vitello 54 que forneceu esta polpa foram feitas varias verificações quanto á presença do bacteriophago em relação aos mesmos germes do grupo coli-typhico-dys. e alguns dos estaphylococcos agora verificados.

Antes da vacinação do vitello, verificou-se a presença de um principio lytico para o b. dysenterico Flexner 2, somente; principio lytico identico verifica-se 24 horas e 10 dias após a vacinação (actividade menor agora), ao passo que, 15 dias após a vacinação, este principio passa a agir sobre o b. dysenterico Shiga 980.

(*) De origem humana.

Tipos microbianos sobre os quaes foi verificada a acção e resultado obtido:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	++
" 45E2	T	0
" 45E3	L	++++
" 46E1	T	0
" 46E2	T	0
" 46E3	L	++++
" 38E1	T	0
" 38E2	T	+
" 47E1	T	0
" 52E1	T	0
" 56E1	T	0
" Sta. Casa 1 (*)	T	0
" M. C. (*)	T	0
" 97 (*)	T	0
" 98 (*)	T	0
" 152 (*)	T	0
" 153 (*)	T	++
" 184 (*)	T	0
B. dysenterico Shiga 980	T	0
B. dys. Flexner	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Pelo quadro acima vê-se que, após 2 mezes de permanencia no frigo, na polpa proveniente deste vitello, não se constata a presença de phago para esses germes e sim para varios dos estaphylococcos examinados, um delles de origem humana (var. *citreus*, de um caso de furunculose).

IV. Polpa n.º 4538 (proveniente do vitello 18). Colheita, addição de glicerina, primeira trituração grossa e collocação no frigo em 20/3/928.

Semeada em caldo na proporção de 1 por 100, para pesquisa do bacteriophago, após 3 mezes e 20 dias.

Cultura a 37° durante 48 horas.

(*) Isolados de casos diversos de origem humana.

Resultado da verificação da acção lytica do filtrado sobre diferentes typos microbianos:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	L	+++
" 45E2	L	+++
" 45E3	LL	+++
" 46E1	L	++
" 46E2	T	+
" 46E3	LLL	++
" 38E1	T	0
" 38E2	LL	++++
" Sta. Casa 1 (*)	T	0
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14.	T	0
B. coli communior 13	T	0

No conteúdo intestinal do vitello 18, que forneceu esta polpa foi verificada a presença de um bacteriophago activo para o b. dysenterico Flexner 2 (++).

Vê-se que na polpa glicerinada, colhida deste vitello, após ter permanecido mais de 3 mezes a -8°C., não se constata phago para os germes do grupo colityphico-dysenterico, mas sim para diversos estaphylococcos empregados, com excepção de 2 apenas (um, typo Sta. Casa, isolado de um caso de phlegmão da coxa e outro typo 38E1, isolado da propria polpa). Os outros typos de estaphylococcos são oriundos de polpas vaccinicas, sendo o 38E2 da polpa homologa (**).

As photographias das figuras 2, 3 e 4 mostram os resultados obtidos com o principio lytico da polpa n.º 4538 em relação aos estaphylococcos sobre os quaes mostrou acção, sendo apenas vistos os resultados da verificação em gelose nos tubos aos quaes se juntaram, respectivamente, 10 gottas e 2 c.c. do filtrado, comparativamente com o tubo testemunha.

V. Polpa n.º 4512 colhida em 27/9/927. Depois de submettida ás diversas phases do preparo, soffreu a 2.ª trituração fina, tamisação e extracção do excesso

(*) De origem humana.

(**) Os numeros dados aos estaphylococcos isolados de polpas correspondem aos dois algarismos finais da polpa donde provêm, sendo os seus dois primeiros algarismos o numero 45. Assim o estaphylococco 38E1 provem da polpa n.º 4538; o estaphylococco 45E1 provem da polpa 4545 e assim por diante.

de ar, sendo conservada no frigo, para experiencias sobre o tempo de duração da actividade do virus.

Em 27/8/928, isto é, 11 mezes após a permanencia no frigo, é semeada na proporção de 1 c.c. de polpa para 100 de caldo commum, para a pesquisa do bacteriophago. Incubação a 37° durante 48 horas; filtração em Chamberland L2 e verificação da acção lytica do filtrado sobre os germes constantes do quadro abaixo, com os respectivos resultados:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	L	0
" 45E2	T	0
" 45E3	L	+++
" 46E1	T	0
" 46E2	T	0
" 46E3	T	++
" 38E1	T	0
" 38E2	T	0
" 47E1	T	+
" 52E1	T	0
" 56E1	T	0
" Sta. Casa 1 (*)	L	0
" M. C. (*)	LLL	++++
" 97 (*)	T	0
" 98 (*)	T	0
" 152 (*)	T	0
" 153 (*)	LL	+++
" 184 (*)	T	++
B. dys. Shiga 980.	T	0
B. dys. Flexner 2.	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Verifica-se assim que, mesmo após quasi 1 anno de permanencia a -8°C, nesta polpa, apenas com a cultura de pequena quantidade em caldo durante 48 horas e filtração, se evidencia um principio lytico capaz de agir sobre culturas recentes de diversos typos de estaphylococcus, varios de origem humana, o qual não manifesta acção sobre germes do grupo coli-typhico-dysenterico. A actividade da polpa vaccinica 4512, verificado mais ou menos nesta occasião (18/8/28), segundo o methodo de Gins, dá uma reacção positiva (++) até a diluição de

(*) De origem humana.

1/10.000. O numero de germes por c.c. de polpa bruta glycerinada (portanto, não diluida) é de 120.000.

No quadro acima observa-se que, ás vezes, pela simples inspecção do resultado em caldo pode-se pensar na dissolução, lyse, das bacterias e que é indispensavel, para se ter a certeza da acção bacteriophagica, proceder-se a verificação em gelose.

VI. *Polpa n.º 4545* (2.ª verificação) após 110 dias de permanencia no frigo.

Os resultados da verificação da acção lytica do filtrado constam do quadro seguinte:

Cultura de	Resultado no caldo	Verificação em gelose
Estaphyl. 45E1	T	++
" 45E2	T	0
" 45E3	T	+++
" 46E1	T	0
" 46E2	T	0
" 46E3	T	0
" 38E1	T	0
" 38E2	T	++
" 47E1	T	0
" 52E1	T	0
" 56E1	T	0
" Sta. Casa 1 (*)	T	0
" M. C. (*)	T	0
" 97 (*)	T	0
" 98 (*)	T	0
" 152 (*)	T	0
" 153 (*)	T	0
" 184 (*)	T	0
B. dys. Shiga 980	T	0
B. dys. Flexner 2	T	0
B. typhico Amparo	T	0
B. paratyphico A 145	T	0
B. paratyphico B 3	T	0
B. coli communis 14	T	0
B. coli communior 13	T	0

Esta polpa é proveniente de um vitello em cujo conteudo intestinal se evidenciou um bacteriophago para o b. dysenterico Shiga 980 (+++). No fim de 16 dias de permanencia no frigo a acção do phago n'ella existente está indicada na experiencia II. Agora, depois de 110 dias de permanencia a -8°C, esta acção differe um pouco da verificada n'aquella occasião, como se pode ver comparando os 2 resultados. Com 16 dias, actua sobre os typos 45E3 (isolado da propria

(*) De origem humana.

polpa) e 46E3; com 110 dias, age sobre os typos 45E1 e 45E3 (isolados da propria polpa) e sobre o 38E2. Em ambas as occasiões, agiu sobre o estaphylococco 45E3; com 16 dias, deixou de agir sobre o 45E1 e com 110 dias deixou de ter acção sobre o estaphylococco 46E3.

Este facto é interessante e mostra que modificações do meio, operadas durante o periodo de permanencia no frigo, devem ter influido na elaboração e modificação da actividade do principio da lyse transmissivel.

Antes de passar á discussão destes resultados experimentaes, devemos dizer que todos os germes empregados nestas experiencias soffreram, antes da sua utilização, numerosas repicagens em caldo commum e gelose inclinada, dando sempre culturas de aspecto normal. Sómente 2 typos se mostravam lysogenos e foram logo eliminados das verificações: um de origem humana (Estaphyl. 183) e outro isolado de uma polpa vaccinica (Estaphyl. 52E2).

CAPITULO III

Discussão e considerações sobre a natureza do phenomeno

Verificamos, nas pesquisas preliminares, que no conteúdo intestinal dos vitellos normaes se encontra um bacteriophago que age sobre germes do grupo coli-typhico-dysenterico e que em nenhuma occasião manifestou acção sobre os coccus (estaphylococcus). Vemos agora que, nas polpas vaccinicas glicerinadas, em differentes periodos de permanencia no frigo (de 16 dias e 11 mezes) e mesmo immediatamente após a colheita e addição de glicerina, se evidencia facilmente, pela technica que descrevemos, a presença de principios lyticos que somente agem sobre os estaphylococcus e que em nenhuma occasião manifestaram acção sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo quando as polpas de onde foram isolados eram provenientes de vitellos em cujo conteudo intestinal haviamos previamente verificado a presença de um bacteriophago para germes deste ultimo grupo.

Acceitando-se a hypothese de d'Hérelle, é muito razoavel, como assignálamos no inicio deste trabalho, pensar-se n'uma contaminação fecal da polpa vaccinica, onde se deveria encontrar um protobio semelhante ao existente no conteudo intestinal do vitello.

Mesmo na hypothese de uma adaptação do virus ao novo meio (impossivel pela experiencia I), a natureza de um organismo preformado e parasita, como quer d'Hérelle, não pode receber o apoio destes nossos resultados experimentaes.

Sabemos que quanto mais simples é o ser vivo, maior é a sua faculdade de adaptação e, como consequencia, maior a sua variabilidade. Segundo d'Hérelle,

o bacteriophago (*Protobio bacteriophagus*, syn. *Bacteriophagum intestinale*) possue estes attributos, alem de outros que são apanagio dos seres vivos. Nesta hypothese, podendo adaptar-se ao novo meio (polpa glycerinada) e agir sobre germes nelle contidos, o "virus" não deveria perder seus caracteres originaes, quando em condições propicias. Por isto, em contacto novamente com germes do grupo coli-typhico-dysenterico, para os quaes agia antes desta adaptação a germes de natureza differente (estaphylococcus), deveria evidenciar sua acção primitiva.

Acceitando-se a possibilidade de uma contaminação fecal, sempre tão facil e lembrada em estudos sobre o bacteriophago, devemos admittir então que este "virus", proveniente do intestino do vitello, se tenha inactivado ou morrido na polpa vaccinica glycerinada, mesmo na recémcolhida, surgindo outro de natureza e modo de acção differentes.

E' evidente a existencia de uma certa relação entre o bacteriophago isolado e os germes existentes no meio, quer normalmente, quer sob determinadas circunstancias, e na sua elaboração a influencia da flora microbiana é incontestavel, não sendo desrazoavel acreditar-se no papel da concorrência vital entre as varias especies e outras "influencias", tanto do meio, como dos germes.

Nestas condições, se poderia considerar o "virus" bacteriophago como um elemento oriundo dos proprios germes, cuja formação seria provocada por "influencias" que se encontram no conteúdo intestinal dos animaes, na polpa vaccinica glycerinada, na agua dos rios, nos esgotos, na terra, etc., onde este principio lytico tem sido verificado.

Se os resultados experimentaes assignalados não autorizam, por si sós, esta deducção sobre a natureza do phenomeno, parece-nos ser ella perfeitamente acceitavel tendo-se em conta tambem os trabalhos experimentaes de grande numero de autores.

N'uma revisão da já vasta bibliographia sobre a bacteriophagia e das differentes hypotheses propostas para a explicação do phenomeno, um facto resalta quasi sempre: as características vitaes do principio lytico, postas em evidencia principalmente por d'Hérelle.

Por outro lado, se recordarmos os estudos sobre o metabolismo bacteriano, tanto no organismo animal, como *in vitro*, sobre as mutações que podem soffrer as bacterias em differentes condições, sobre o phenomeno da dissociação microbiana, tão bem estudado por P. Hadley, se juntarmos a todos estes estudos os do nosso eminente patricio Antonio Fontes, sobre as phases da evolução do bacillo de Koch e sobre o cyclo vital das bacterias e tantos outros, veremos quão complexa é a cyclogenia bacteriana e qual a importancia que devem merecer em nossos dias novos capitulos da bacteriologia relacionados com a biologia dos micro-organismos.

O phenomeno da bacteriophagia ou da lyse transmissivel deve ser tambem collocado entre os que se relacionam com a biologia microbiana. Das differentes theorias propostas para a explicação do phenomeno de d'Hérelle, as chamadas *autogenas*, isto é, para as quaes o principio lytico é oriundo da propria cellula

bacteriana e theorias defendidas, sob differentes modalidades, por Twort, Kabeshima, Bordet, Ciuca e Renau, Wollman etc., tornaram em nossos dias a theoria parasitaria de difficil sustentação.

Juntem-se a isso os trabalhos de Burnet, verificando uma coordenação entre a capacidade de absorpção de agglutininas de certos microorganismos e o que se poderia chamar sua capacidade de absorpção phagica, falando a favor de uma independencia biologica das particulas bacteriophagicas em contradicção com a unidade biologica da theoria de d'Hérelle; tambem em contraposição a esta unidade biologica, a descoberta de Koser relativa a um bacteriophago para uma especie thermophila, agindo a uma temperatura que destrua a maioria dos germes não esporulados e a de Elder e Tanner, com o seu bacteriophago psychophilico, agindo na temperatura de 4°C.

Estes factos e muitos outros que poderiam ser citados, mostram que o bacteriophago está em relação com a cultura onde se desenvolve, e por isto, com a flora microbiana, como assignalamos em nosso trabalho.

As pesquisas, referentes á presença do bacteriophago em culturas de differentes germes, de Bail, Otto e Munter, Lemos Monteiro e outros; as de Hadley, Klimak e Kieseewetter, mostrando que o agente lytico pode ser gerado n'um tubo de caldo unicamente por uma serie de culturas e filtrações successivas; as de Béguet, sobre a influencia da variação da pressão osmotica entre as colloides microbianas e do meio, tendo-se em conta os phenomenos de adsorpção e tensão superficial, na elaboração phenomeno lytico, etc., todas ellas apoiam esse modo de ver.

A cellula microbiana não deve mais ser considerada como uma unidade vital, mas sim constituida por um conjuncto de unidades vitaes que, para certos germes e sob certas condições ou "influencias", se multiplicariam neste estado primordial, invisivel, da materia viva. Nestas condições, poder-se-ia admittir a hypothese de que a bacteriophagia seria a manifestação da multiplicação destas formas invisiveis do proprio germe, assim surgindo sob certas condições e capazes, quando em contacto com formas normaes e visiveis, de transmittir a estas a mesma propriedade.

A relação existente entre o bacteriophago especifico e a cultura onde se desenvolve, suggerindo que o protoplasma do agente se continua com o da cellula microbiana, serviu a Hadley para formular sua interessante theoria para a explicação do phenomeno. Segundo esta theoria, que Hadley denomina de "homogamica da acção bacteriophagica", ambos os elementos, principio lytico e bacteria sensivel, são componentes necessarios a um mecanismo de reproducção que muitas, senão todas, as bacterias possuem.

Em summa, as controversias existentes sobre o assumpto não repousam no reconhecimento de factos estabelecidos, mas na sua interpretação e não diminuem o valor do incomparavel trabalho de d'Hérelle.

CONCLUSÕES

I. No conteúdo intestinal de vitellos normaes encontra-se quasi sempre um bacteriophago, cuja acção se manifesta para germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

II. A acção deste principio lytico em nenhuma occasião se manifestou sobre os coccus (estaphylococcus), quer isolados de polpas vaccinicas, quer de origem humana.

III. Nas polpas vaccinicas glycerinadas mantidas a -8°C . desde alguns dias até quasi um anno, encontra-se um "bacteriophago" cuja acção se manifesta para os coccus (estaphylococcus), quer isolados de polpas vaccinicas, quer de origem humana.

IV. Em nenhuma occasião sua acção se manifestou sobre germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo quando a polpa vaccinica é oriunda de vitello em cujo intestino se encontra um principio lytico agindo sobre germes deste grupo.

V. E' evidente a existencia de uma relação entre o principio lytico isolado e a flora microbiana predominante do meio.

RESUMO

J. LEMOS MONTEIRO (Instituto Butantan, São Paulo). — Sobre o phenomeno de d'Hérelle. O bacteriophago nas polpas vaccinicas glycerinadas; considerações sobre a natureza do phenomeno.

O autor fez a pesquisa de principios lyticos com os caracteristicos do bacteriophago nas polpas vaccinicas glycerinadas em diferentes periodos de permanencia do frigo a -8°C (de 11 dias a quasi 1 anno), indicando a technica de que se serviu. Muitas das polpas verificadas eram oriundas de vitellos em cujo conteúdo intestinal identicas pesquisas haviam sido feitas e são tambem descriptas.

A acção dos phagos existentes nas polpas glycerinadas foi verificada em relação a germes do grupo coli-typhico-dysenterico e a diferentes amostras de estaphylococcus.

Ao contrario do que acontece com o principio lytico existente nas fezes do vitello, o verificado nas polpas vaccinicas glycerinadas manifesta acção sobre os estaphylococcus e em nenhuma occasião sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo na recém-colhida.

Sabe-se como é difficil, impossivel mesmo, por maiores que sejam os cuidados, evitar a contaminação fecal do campo vaccinado do vitello. Pela hypothe-

se de d'Hérelle para a explicação do phenomeno, isto é, de um "virus" parasita das bacterias, este elemento existente no conteúdo intestinal do vitello deveria ser encontrado nas polpas vaccinicas e agir sobre os mesmos germes para os quaes agia anteriormente. Isto tambem porque, segundo os defensores desta theoria parasitaria, o bacteriophago é dotado de grande ubiquidade, podendo ser encontrado em tudo que fôr capaz de soffrer directa ou indirectamente a contaminação fecal. O A. verificou que assim não acontece; o bacteriophago encontrado nas polpas vaccinicas sempre mostrou acção sobre os estaphylococcus, isolado de polpas ou de origem humana, e em nenhuma occasião agiu sobre os germes do grupo coli-typhico-dysenterico, mesmo quando oriundas de vitellos em cujo conteúdo intestinal havia verificado a existencia de principio lytico para germes deste ultimo grupo. Em virtude dos resultados experimentaes deste e de outros trabalhos e dos de numerosos experimentadores, o A. mostra uma hypothese que lhe parece razoavel para a explicação de tão interessante phenomeno, que considera ligado á biologia e cyclogenia microbianas.

ABSTRACT

Lytic principles bearing bacteriophage characteristics were found in the glycerin-vaccin lymph as kept in the ice-box at -8°C for a period varying from 11 days to 1 year. Several batches of the lymph were obtained from calves on whose intestinal contents the search for the bacteriophage was also made, in both cases the action of the phage being investigated in regard to staphylococci and germs of the coli-typhoid-dysentery group.

The lytic principle found in the vaccin lymph, even from a recent batch, acts on staphylococci but not on the coli-typhoid-dysentery group, whilst that found in the faeces of calves shows a reverse action. It is known how difficult it is to avoid fecal contamination of the vaccinated region of a calf in spite of any precautions that may be taken in this regard. Should the phage be accepted as a parasite of bacteria, in the light of d'Hérelle's explanation, then the element found in the calf's intestinal content ought to be also found in the vaccin lymph and thus keep its original lytic action on the germs under the same conditions, inasmuch as, in the light of that theory, the bacteriophage is quite ubiquitous, as it uses to occur in any object or place liable of contamination by faeces. This, however, is not the case since the phage found in the vaccin lymph always shows its action on staphylococci of any origin, whilst it never acts on germs of the coli-typhoid-dysentery group even though the lymph proceeds from calves in whose faeces the lytic principle for the latter germs has been found.

The phenomenon seems rather to be related to a special feature of the bacteria cycle life.

REFERENCIAS

- Béguet* — Arch. Inst. Pasteur d'Algérie V(1):25.1927.
Burnet (F. M.) — British J. Exp. Path. VIII:121.1927.
Elder (A. L.) and Tanner (F. W.) — J. Inf. Diseases XLIII(5):403.1928.
Fontes (A.) — Mem. Inst. Oswaldo Cruz XVIII(1).1925.
Gratia (A.) — Proc. Exp. Biol. & Med. XVIII:217.1921 — C. R. Soc. Biologie LXXXV:
25.1921.
Hadley (P.) — J. Inf. Diseases XL(1).1927 — Ib. XLII(4).1928.
Hérelle (F. d') — Le bactériophage et son comportement. 2ème. édition, 1926.
Hérelle et Eliawa — C. R. Soc. Biologie LXXXV:701.1921.
Koser (S.) — J. Inf. Diseases XLI(5):365.1927.
Twort — Lancet II:124.1915.

Fig. 1

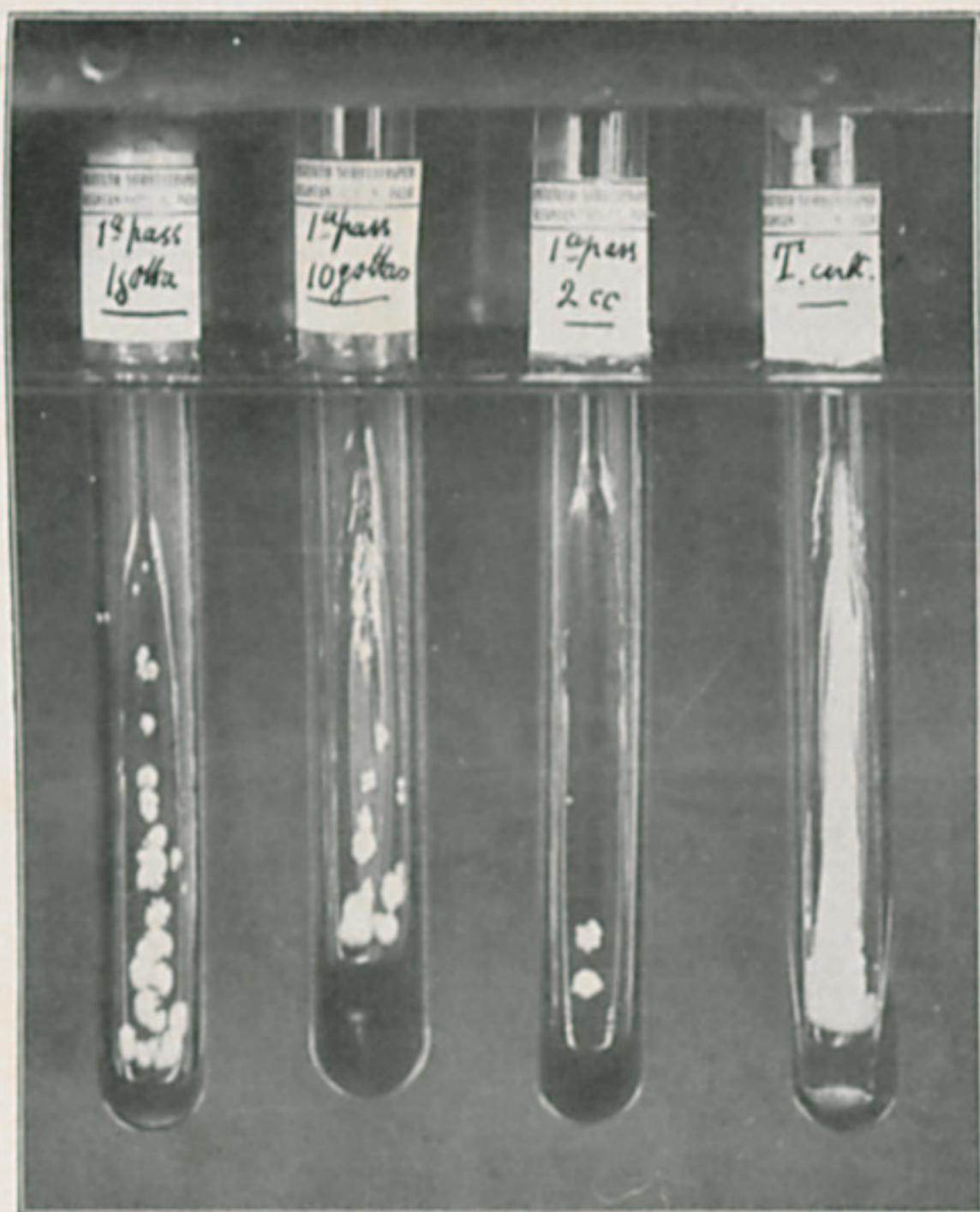


Fig. 4

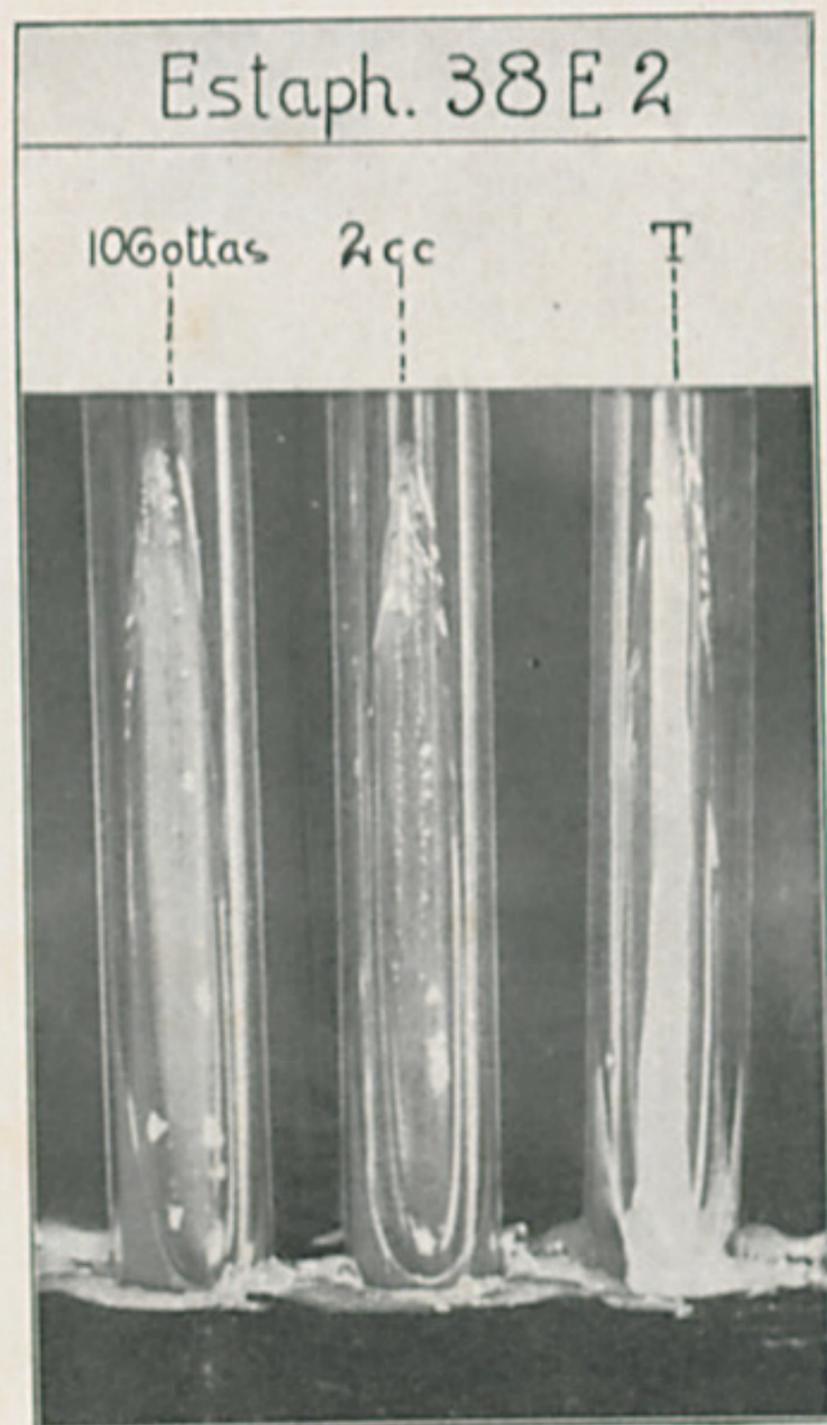


Fig. 2

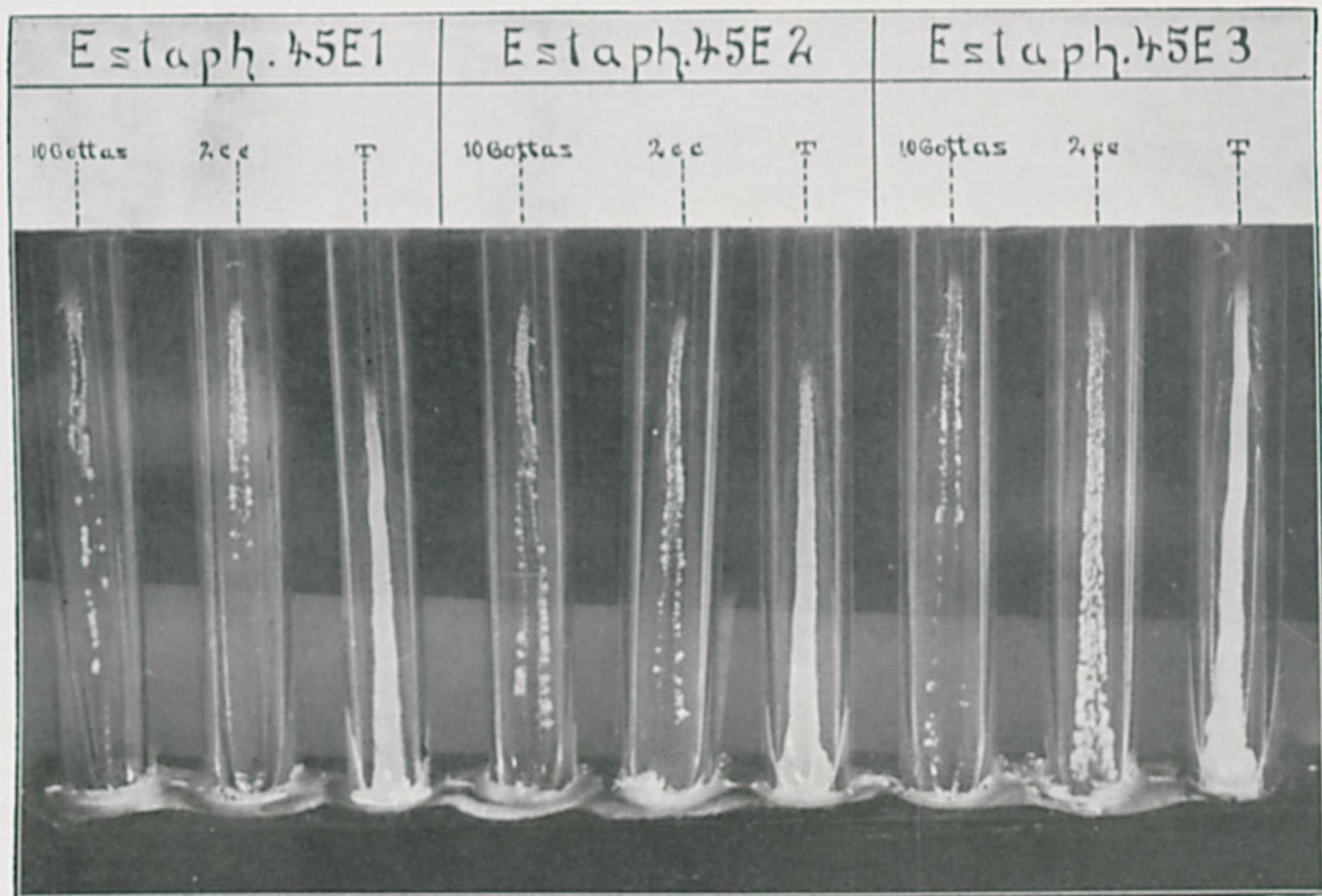


Fig. 3

