

H. VON BONHORST

OPSONINAS

Contribuição para o estudo da Immunidade

THESE INAUGURAL

OUTUBRO — 1909.



ESCOLA MEDICO-CIRURGICA DE LISBOA

OPSONINAS

Parte experimental feita
no Laboratorio de Análises Clínicas do Real Hospital
de S. José

Dissertação apresentada e defendida perante a Escola
Medico-Cirurgica de Lisboa

POR

HENRIQUE VON BONHORST

~~~~~  
OUTUBRO 1909  
~~~~~

LISBOA

COMPOSTO E IMPRESSO NA IMPRENSA LUCAS

Rua do Diario de Noticias, 93

—
1909



RC
HNCI
57
BON

Aos Ex.^{mos} Professores :

Moreira Junior

Bello Moraes

e

Dr. Costa Uery

Profundo reconhecimento

Duas Palavras

Que estas palavras sejam a traducção do grande reconhecimento e perduravel gratidão pelos favores de toda a ordem que tenho recebido dos Ex.^{mos} Professores Moreira Junior, Bello Moraes e Dr. Costa Nery.

No testemunho publico com que abro a minha these, n'estas escassas palavras, não posso traduzir o que o meu espirito sente relativamente a esse reconhecimento. Que me desculpem este preito de gratidão e que levem a sua benevolencia ao ponto de me permittirem que lhes dedique este modesto trabalho.

Ao Ex.^{mo} Sr. Dr. Dyonizio Alvares quero tambem deixar consignados aqui os meus sinceros agradecimentos pela sollicita coadjuvação que me dispensou n'este trabalho, encaminhando-me na technica que em Londres estudára com Wright.

*
* •

Aos Ex.^{mos} Srs. Professor Curry Cabral, dignissimo enfermeiro-mór dos Hospitaes e Dr. Azevedo Neves, dignissimo director do Laboratorio de Analyses Clinicas do Hospital de S. José e Annexos, os protestos do meu reconhecimento.

Outubro de 1909.

Henrique Bonhorst.

INDICE

- Capitulo I* — Immunidade. Estado actual da questão
Capitulo II — Oponinas
Capitulo III — Technica opsonica ; phagocytose experimental
Capitulo IV — Influencia de varios factores no phenomeno da opsonisação
Capitulo V — Conclusões

CAPITULO I

- A) Theoria cellular :
- a) Immunidade anti-bacteriana
 - b) Immunidade antitoxica
- B) Theoria humoral :
- a) Immunidade anti-bacteriana
 - b) Immunidade antitoxica
- C) Estado actual da questão
- a) Hemolyse
 - b) Bacteriolyse
 - c) Bacteriotropinas

CAPITULO II

- a) Historia das opsoninas
- b) Origem das »
- c) Especificidade das opsoninas
- d) Natureza das opsoninas
- e) Modo d'acção das opsoninas

CAPITULO III

- a) Corpusculos de sangue lavados
- b) Emulsão bacteriana
- c) Sêro sanguineo normal ou doente
- d) Inclusão bacteriana
- e) Preparações microscopicas
- f) Contagem de phagocytos e bacterias
- g) Considerações geraes

CAPITULO IV

- a) Influencia da quantidade de sôro
- b) » » diluição » »
- c) » » mistura » »
- d) » » acidez ou alcalinidade do sôro
- e) » » emulsão bacteriana
- f) » dos leucocytos
- g) » do frio
- h) » do calor
- i) » de agentes chimicos

CAPITULO V

- a) Indice opsonico
- b) Vaccinotherapia

CAPITULO I

Immuniidade. Estado actual da questão

Abriremos este capitulo, o primeiro do nosso trabalho, com a affirmação de que a immuniidade é um dos mais bellos estudos do conjuncto das sciencias medicas e ao mesmo tempo uma componente, de promettedores effeitos, do mixto de processos de que o homem se auxilia para a defeza da sua vida.

A par d'isso, a immuniidade, representa tambem um trilho cheio de difficuldades, trilho que, desde Pasteur, tem sido infatigavelmente percorrido por brilhantes descobridores, que, com suas descobertas, concorreram e concorrem para a victoria, na lucta dos organismos superiores contra os infinitamente pequenos.

O que tem sido este labutar de todos os dias, constante, arduo e difficil, não podemos nós descrever e, por esse motivo, o nosso estudo sobre a immuniidade dirigir-se-ha á apresentação das ideias que actualmemente dominam, relativas ao mechanismo intimo pelo qual ella se realiza.

Em breve esboço apresentaremos as theorias cellullar e humoral, conjunctamente com algumas palavras sobre a sua historia, e abandonaremos tudo o que se

relaciona com definições, descrições detalhadas das étapes que as theorias immunitarias tem atravessado, as suas criticas, ataques e defezas, emfim todos os assumptos que se prendem com as minucias do processo e que facilmente podem ser encontrados nos tratados sobre immundade.

Em maio do anno que vac passando (1909) realizou-se em Stockolmo uma conferencia na qual foi concedido o premio Nobel, a dois dos mais brilhantes espiritos do mundo scientifico moderno, Metchnikoff e Erlich. Foi a recompensa dos seus extraordinarios trabalhos sobre immundade, recompensa cheia de justiça, pois são admiraveis as pesquisas d'esses dois extraordinarios trabalhadores. Metchnikoff foi a Stockolmo receber o seu premio e aproveitou o ensejo para fazer uma exposição synthetica sobre o estado actual da questão da immundade.

Vem a exposição de Metchnikoff reproduzida nos dois numeros do Boletim do Instituto Pasteur referentes ao mez de julho de 1909 e a essa exposição faremos referencia, repetindo aqui algumas das suas passagens, expondo algumas das suas affirmações.

Necessariamente, no trabalho que nos propozemos, teremos de decalcar e natural é que assim succeda por quanto, sobre factos estabelecidos, e alguns d'elles o são hoje indubitavelmente, não podemos fazer innovações ou modificações, cingindo-se por isso o nosso papel á simples apresentação de actualidades conhecidas.

Julgámos e parece-nos que bem que, para a exposição do motivo da nossa these, eram necessarias referencias ás theorias da immundade, de que as osoninas são um capitulo, para assim fazermos um estudo methodico do assumpto do nosso trabalho. Essas referencias não podem deixar de ser breves como

já dissemos, e por essa razão, começaremos por fazer uma leve exposição da theoria cellular ou phagocytaria da immuidade, passando depois á theoria humoral e por ultimo ao estado actual da questão.

A) Theoria cellular.

a) Immuidade anti-bacteriana : Metchnikoff, fundador da theoria phagocytaria, começou por fazer os seus estudos relativamente á investigação da origem dos órgãos digestivos na serie animal e foi no decorrer d'este trabalho de zoologo que elle averiguou que, certos elementos dos organismos inferiores, cuja transparencia permittia o exame em vida, eram capazes de apprehender corpos extranhos; constatou tambem que, na massa d'esses seres vivos, existia uma multidão de cellulas vivas, munidas de prolongamentos moveis, as quaes possuíam a faculdade de, com seus movimentos, se arrastarem para se accumularem nos pontos do corpo do animal onde incidira um estímulo exterior.

Foi sobretudo nas larvas das estrellas do mar que esta observação se tornou sobremaneira frizante e, Metchnikoff, para a pôr em evidencia, introduzia pequenos espinhos no corpo do animal, verificando que as cellulas mencionadas se accumulavam, de maneira consideravel, em torno d'esses corpos extranhos.

Foi o primeiro passo para a theoria da phagocytose.

O phenomeno das larvas comparou-o Metchnikoff com o que se passava com os individuos superiores, quando um espinho incidia em qualquer ponto do seu corpo, produzindo uma maior ou menor situação inflammatoria, no ponto de incidencia.

A diapedese seguida da accumulção de cellulas em torno do corpo extranho, é o primeiro phenomeno do processo inflammatorio, primeira phase comparavel com o que se passava no corpo da larva ferida, pon-

do de parte a interferencia de vasos e nervos, necessaria nos organismos superiores mas que se não dá nas larvas da estrella do mar por estas os não possuirem.

O phenomeno da larva foi assim o ponto de partida para o estabelecimento da theoria phagocytaria. Metchnikoff comparou o corpo extranho espinho, ao corpo extranho microbio, concluindo que a doença, nos organismos vivos, era o resultado da lucta entre as cellulas moveis do organismo e o agente morbido; a cura representava a victoria cellular e a immunidade seria a manifestação resultante da actividade d'estas cellulas.

Para estender a affirmação da defeza cellular aos organismos superiores, tornava se necessario ensaiar com animaes de constituição mais differenciada, o que levou Metchnikoff a experimentar com as Daphnias (pulgas d'agua), muito espalhadas nas aguas dos pantanos e sugeitas a variadas doenças; uma das doenças de que esse animal é susceptivel é determinada por um microbio, que possui a propriedade de produzir sporos em forma de agulhas. Estes sporos absorvidos pela Daphnia, atravessam a parede do intestino penetrando na cavidade do corpo e, uma vez ahi, são immediatamente cercados por uma multião de cellulas moveis. Umaz vezes os sporos são absorvidos pelas cellulas mas outras vezes acontece que elles, germinando, vão dar logar á producção de uma massa de microbios que possuem a faculdade de elaborar e segregar substancias capazes de dissolver as cellulas produzindo assim a sua destruição.

Esta nova observação do que se passava com as Daphnias era já um começo da generalização do phenomeno de defeza cellular, phenomeno que, deixando o campo restricto das larvas da estrella do mar, se

estendia já a organismos mais diferenciados como são as Daphnias. A conjugação das duas observações foi sufficiente para Metchnikoff emittir a sua affirmação quanto ao processo de defeza dos organismos quando em face de corpos estranhos que, por o serem, representam elementos irritantes para os mesmos organismos.

Para a admissão definitiva da theoria tornava-se necessaria a sua confirmação perante os vertebrados superiores, mostrar que nos seres superiores, altamente diferenciados, as coisas se passavam de maneira analogá ás que se produziam nas larvas e nas Daphnias.

A constatação directa era porém impossivel, porquanto os vertebrados superiores, pela sua contextura não permittiam a verificação experimental, possível n'aquelles animaes inferiores, mercê da transparencia do seu corpo.

N'esta altura a intervenção de Metchnikoff fez-se, aproveitando este experimentador o processo de deducção e assim pelo raciocinio suppriu a falta da constatação directa, acabando por provar que, nos organismos superiores, incluindo o homem, tambem existiam cellulas capazes de incorporarem corpos extranhos.

As deducções de Metchnikoff, não assentaram em hypotheses vagas, abstractas, antes tiveram por fundamento as observações relatadas por experimentadores anatomo-pathologistas. Foram os phenomenos da inflammação, referidos por Conheim, que sugeriram a Methchnikoff a generalização da sua theoria cellular estendendo-a aos organismos superiores.

Conheim descrevia o processo inflammatorio considerando-o repartido por varias phases, a primeira das quaes consistia na sahida para fora dos vasos sanguineos de numerosas cellulas moveis, que começavam

por cercar o corpo extranho causador da inflamação.

Era a diapedese globular e foi esta observação que, impressionando vivamente Metchnikoff, lhe recordou o que elle observára nas suas experiencias com as Daphnias. O estudo comparativo do phenomeno inflammatorio nos organismos simples e nos vertebrados superiores, foi o alicerce definitivo para o estabelecimento da theoria cellular ou phagocytaria de Metchnikoff, tão viva e profundamente atacada mas que victoriosamente resistiu aos embates dos adversarios.

A sahida dos leucocytyos representava para o author da theoria cellular, uma étape da defeza do organismo contra os agentes irritantes e esta affirmação, relativa ao papel dos leucocytyos, era o derrubar das ideias que então imperavam quanto a esse papel, pois a esse tempo os globulos brancos do sangue eram considerados como elementos nocivos. O fundamento d'esta ultima maneira de vêr estava no facto de elles abundarem nos exshudados inflammatorios, nas colleções purulentas e ainda na observação de elles terem, algumas vezes, incorporadas bacterias na sua intimidade. Por estas razões os leucocytyos eram reputados nocivos e accusados mesmo de causadores da disseminação do processo morbido por serem os vehiculos da substancia prejudicial.

Este modo de vêr era a antithese do que, sobre elles, affirmou Metchnikoff que contrapoz a acção benéfica do leucocytyo á nocividade que lhe attribuiam, estendendo ainda a acção protectora a outras cellulas que como os leucocytyos eram capazes de absorver corpos extranhos.

A este conjuncto cellular, capaz de absorver corpos extranhos, chamou-lhes phagocytyos e ao phenomeno deu Metchnikoff o nome de phagocytose constituindo

assim a theoria cellular ou phagocytaria da immuni-
dade.

A bacteria nociva quando penetra em um organis-
mo começa por determinar uma convergencia de phag-
ocytos no ponto de invasão e d'ahi em diante as
coisas passam-se por forma varia, consoante as varias
condições do organismo e da bacteria; se o organis-
mo está em boas condições de resistencia e se tiver
sido immunisado, a diapedese é intensa e os phago-
cytos, incorporando as bacterias, acabam por as des-
truir, mercê de phenomenos que se passam na intimi-
dade da propria bacteria. O organismo reage, a bac-
teria é vencida, incorporada e destruida e a cura vem
como consequencia d'estes actos multiplos. Se pelo
contrario a invasão se faz em um organismo enfra-
quecido, não immunisado natural ou provocadamente
e a bacteria possui uma regular virulencia, a defeza
estabelece-se ainda, mas n'este caso a diapedese é
fraca, a phagocytose escassa e o individuo atacado
acaba por succumbir aos golpes da bacteria invasora
determinante da infecção.

N'esta lucta contra os agentes infecciosos não ha
uma interferencia indifferente dos elementos cellu-
lares phagocytarios macrophagos e microphagos. São
estes ultimos que teem a seu cargo a defeza anti-bac-
teriana, e a immuniidade apresenta-se como uma re-
sultante, em que uma das principaes componentes é
representada pelo concurso dos leucocytos polymor-
phos, ou microphagos na designação de Metchnikoff.
Effectivamente os polymorphos são poderosos defen-
sores do organismo humano perante as bacterias e
activamente concorrem para a immuniidade São elles
que incorporando as bacterias, as destroem, annullan-
do assim a sua acção nociva immediata, parecendo que
a acção do polymorpho se estende sobre todas as ba-

cterias susceptiveis de penetrarem no organismo.

O proprio microbio do cholera das gallinhas, que parecia fazer excepção a esta lei geral de inclusão bacteriana realizada pelos phagocytos, esse mesmo microorganismo está hoje averiguado que obedece á regra geral e que fôra falta de observação, consequencia da extrema pequenez d'essa bacteria, o que levára Weil a sustentar que os casos de immuidade perante aquelle microbio, eram a consequencia de phenomenos completamente alheios á acção phagocytaria dos leucocytos. A immuidade, perante a bacteria do cholera das gallinhas, é ainda, n'este caso, a resultante da interferencia dos phagocytos, o que demonstra não só a importancia como a estensão do processo phagocytario, sem comtudo provar o seu exclusivismo,

É de notar que a acção do phagocyto se exerce sobre a bacteria viva e não, como pretenderam alguns adversarios da theoria phagocytaria, sobre o microorganismo previamente morto pela acção bactericida dos humores organicos, como o plasma sanguineo e as partes liquidas dos exshudados. A experiencia confirmou esta noção, mas o progresso d'estes estudos levou-nos tambem á conclusão de que, se effectivamente a phagocytose se realizava independentemente da morte da bacteria, pela acção de substancias humoraes, verdade era tambem que n'esses liquidos existiam substancias que auxiliavam a acção do phagocyto, sensibilizando a bacteria.

A immuidade anti-bacteriana, segundo a theoria cellular phagocytaria de Metchnikoff, resulta pois da incorporação e consequente aniquilamento dos agentes morbidos no interior dos phagocytos.

E' um phenomeno a cargo dos microphagos ou seja dos leucocytos polymorphos. Os macrophagos, cel-

lulas fixas do tecido conjunctivo, medulla ossea, baço, ganglios lymphaticos, etc., são tambem phagocytos, mas a sua acção incorporadora não se exerce sobre as bacterias e sobre ellas se não exerce tambem a sua acção lytica. Os macrophagos são elementos cytolyticos e só os microphagos, ou sejam os leucocytos de nucleo polymorpho, é que exercem uma acção lytica sobre as bacterias, só estes ultimos são bacteriolyticos.

Explicada a immuidade anti-bacteriana, segundo a theoria de Metchnikoff, vamos agora fazer a sua applicação ao phenomeno da immuidade antitoxica, para depois fazermos, em breve esboço, a exposição de noções succintas sobre a influencia dos humores na acquisição da immuidade ou seja uma breve descripção da theoria humoral.

b) Immuidade antitoxica: Quando uma bacteria virulenta invade um organismo, este defende-se directamente contra o agente nocivo por intermedio dos seus phagocytos microphagos, podendo subjugal-o n'esta lucta, e tornal-o, assim improprio para o exercicio da sua acção nociva. Se porém a defeza do organismo é fraca, e o ataque dos phagocytos se não faz promptamente, e desde o inicio da invasão, de modo a subjugar o invasor e a annullar, por consequencia, os seus effeitos destruidores, este instala-se no organismo invadido e começa a exercer a sua acção nociva por intermedio das substancias toxicas que elabora e que disseminados pelo individuo atacado o intoxicam, podendo esta intoxicação conduzir á propria morte.

Ainda n'este caso se estabelecê defeza por parte do organismo invadido, o qual contrapõe ás toxinas microbianas, substancias que elle elabora e que exercem o papel de antidotos dos venenos segregados pelas bacterias. Estas substancias, creadas pelo organis-

mo na lucta contra as bacterias virulentas, são designadas com o nome de antitoxinas, e annullando as toxinas microbianas, conduzem á immundade antitoxica.

D'esta maneira os organismos invadidos por bacterias virulentas, combatem contra ellas por meio das suas cellulas e ainda elaborando substancias, antitoxinas, destinadas a annullar os venenos microbianos. A immundade consequente, a victoria contra os organismos infectantes, resulta assim do concurso de dois factores representados, pelas cellulas e pelas auttoxinas.

A victoria do organismo invadido será pois a resultante não só da immundade anti-bacteriana, mas tambem da immundade anti-toxica, não havendo, porém, em todos os casos de invasão microbiana, a interferencia dos dois factores. Assim é que, na immundade natural, segundo affirma Metchnikoff, apenas o primeiro processo entra em acção pois a phagocytose é sufficiente para impedir que as bacterias tenham tempo de elaborar os seus productos toxicos e disseminá-los pelo organismo; antes que esse trabalho se possa realizar, a bacteria é apprehendida pelo phagocyto, incorporada e dissolvida.

Mais tarde, no decorrer d'este trabalho, veremos que a immundade natural não é hoje explicada pela acção exclusiva do phagocyto, como o pretende Metchnikoff.

Na immundade adquirida por intermedio de uma doença anterior, ha uma phase em que se deu certamente a interferencia dos dois processos. O ataque de uma doença anterior confere, em certos casos, immundade para essa doença, mas durante o ataque, que foi longo, o organismo reagiu, não só destruindo bacterias mas ainda creando antitoxinas para oppôr ás toxinas que a bacteria pode elaborar.

As antitoxinas são pois outros elementos com os quaes se deve entrar em linha de conta, e cujo papel necessariamente deve ter importancia no phenomeno da immundidade.

Para evidenciar a sua importancia basta lembrar os magnificos trabalhos que, sobre antitoxinas, foram elaborados por Behring, e a constituição de um capitulo de therapeutica — a serotherapie — a que ellas deram origem.

D'este capitulo são já paragraphos brilhantes a serotherapie antidiphtherica e a serotherapie antitetanica.

A immundidade antitoxica, se bem que importante no ponto de vista da defeza do organismo, não o é porém mais, do que a immundidade antibacterica, e a affirmação é comprehensivel, por quanto, obtida a immundidade antibacterica, implicitamente se obtem a impossibilidade da permanencia da bacteria no organismo invadido e impossibilitada fica, portanto, esta, de elaborar as suas toxinas.

Os organismos permanecem sensiveis á acção dos productos toxicos bacterianos mas estes é que se não podem produzir por isso que, uma vez dada a invasão, a bacteria é promptamente apprehendida pelo phagocyto que a annula, destruindo-a.

Manifestamente ha-de haver circumstancias, mesmo em animaes immunisados, em que a reacção do organismo se faça pela conjugação dos dois processos; pelos phagocytos serão destruidas as bacterias, e pelas antitoxinas elaboradas pelo organismo, serão annulladas as toxinas microbianas. Serão os casos de animaes fracamente immunisados e ainda outros.

Nós accetamos que a falta de intoxicação seja, em alguns casos, a consequencia da acção phagocytaria, em outros, ella será determinada por productos, as

antitoxinas, que o organismo fabrica como reacção ao estímulo representado pelas toxinas microbianas.

Para Metchnikoff a acção dominante, na defeza do organismo, está no phagocyto, mas admite tambem que, em alguns casos, as antitoxinas contribuem, com a sua quota parte, para a defeza anti-bacteriana.

Houve experimentadores que attribuiram ás antitoxinas, um papel verdadeiramente dominante no phenomeno da immuidade; levaram as suas affirmações ao ponto de dizerem que os organismos, quando invadidos por bacterias, começavam por pôr em acção as suas antitoxinas, as quaes, destruindo as toxinas microbianas, tornavam as bacterias virulentas em sa prophytas inoffensivos que n'essa nova situação eram facilmente phagocytados.

Esta maneira de vêr está posta de parte de uma maneira absoluta e, para justificar a sua falta de razão, basta citar o que se passa com os sporos da bacteridia carbunculosa, os quaes podem permanecer dentro dos phagocytos durante bastante tempo, para no fim d'esse tempo ainda germinarem, se alguma circumstancia vem produzir modificação na vitalidade da cellula phagocytaria. O que succede com o sporo da bacteridia carbunculosa póde ser observado da mesma forma com a propria bacteria e ainda com outros microorganismos.

A immuidade anti-bacterica póde ser adquirida independentemente da immuidade contra as toxinas e é ella, a que por via de regra, se estabelece primeiro quando os organismos reagem á invasão microbiana. E' ainda ella aquella que com mais facilidade pode ser attingida e, a attestar a affirmação está a maior estensão quanto á applicação do processo que hoje tende a generalizar-se.

Para terminarmos com estas breves referencias á

immunidade antitoxica, resta-nos justificar a razão porque a incluímos na theoria da immunidade cellular quando as antitoxinas são substancias dos humores, devendo por isso fazer parte das theorias humoraes. A razão de ser do nosso procedimento está nas affirmações de Metchnikoff relativas ás analogias entre antitoxinas e os anticorpos amboceptores.

A especificidade da antitoxina sustentada e evidenciada por Behring, a sua resistencia ao aquecimento que a torna thermoestavel, a sua dispersão nos humores do organismo, são propriedades em tudo analogas aos amboceptores e perante estes pontos de contacto, inclina-se Metchnikoff a pensar n'uma origem commum ; para elle são anticorpos com a mesma origem. Metchnikoff acceita a sua origem leucocytaria como verosimil, não fazendo porém uma affirmação cathorica por falta de factos absolutamente concludentes que lhe permittam uma confirmação plena da hypothese.

Foi justamente por acharmos verosimil e mesmo provavel que as antitoxinas tivessem uma origem leucocytaria, que nós incluímos a immunidade antitoxica na theoria cellular da immunidade. Esta, para nós ficaria representada pela forma seguinte, que consubstancia o resumo final do que até aqui temos dito :

O organismo uma vez atacado por uma bacteria, inicia a sua defeza, que incide não só na bacteria como tambem nos productos toxicos que ella elabora.

* Com os seus phagocytos microphagos apprehende, incorpora e destroe o agente virulento e com as antitoxinas elaboradas prejudica, inutilisa, a acção da toxina microbiana.

No caso da immunidade natural ha predominio do phagocyto na defeza anti-microbiana, e na immunida-

de adquirida ha a interferencia de substancias que auxiliam a acção phagocytaria.

B) Theoria humoral.

Em opposição á theoria bactericida dos phagocytos, constituiu-se a theoria bactericida dos humores, na qual os organismos dotados de immundade, natural ou adquirida, possuam a faculdade de destruir bacterias mercê do concurso de substancias, sem qualquer intervenção por minima que fosse, das cellulas phagocytarias.

O fundamento da theoria está no facto da possibilidade de destruição de bacterias, por meio do sangue e do sôro sanguineo tirados do organismo, sendo a immundade a consequencia da acção bactericida por elles exercida. O ponto de partida da nova theoria immunitaria foi o phenomeno de Pfeiffer que passamos e expor.

Phenomeno de Pfeiffer : Quando se injecta uma cultura de vibrião cholericico no peritoneo de uma cobaia nova, produz-se uma peritonite que a breve trecho, conduz o animal á morte.

Examinando a serosidade peritoneal, da cobaia injectada, poucos minutos depois da injeção, verifica-se, no liquido examinado, a existencia de uma enorme quantidade de vibriões cholericos, extremamente moveis.

Se porém, tivermos préviamente vaccinado o animal contra o cholera, seja por meio de injeções de vibriões de virulencia attenuada pelo calor, seja por meio de injeção preventiva, intra-peritoneal, de sôrô anti-cholericico, o phenomeno apresenta então uma modalidade bem differente. Assim, tirando uma gotta de serosidade peritoneal do animal tratado pelo segundo processo e examinando-a eu: gotta pendente, constata-se que os vibriões não se multiplicaram, que perde-

ram a sua grande mobilidade e que modificaram a sua forma, perdendo a configuração alongada para se apresentarem com o aspecto de esferas.

Esta experiencia de Pfeiffer, que tão facilmente pôde ser observada in vivo, pôde com a mesma facilidade ser constatada in vitro; para isso dilue-se, em sôro de uma cobaia nova, uma emulsão de vibrião cholericico e tanto basta para vermos que os vibriões continuam a viver e a multiplicar-se como em um caldo de cultura. Se porém diluirmos a emulsão em sôro de animal immunisado contra o cholera, os vibriões agglutinam se, immobilizam-se, são transformados em esferas e por ultimo destruidos.

No sôro da cobaia immunisada existem pois substancias nocivas para o vibrião cholericico, substancias que o matam e destroem; é a acção bactericida do sôro, base da theoria humoral para a immunidade anti-bacteriana. E' ainda para notar que esta acção bactericida dos humores se exerce sobre outras bacterias alem do vibrião cholericico, tornando-se assim um phenomeno de ordem geral. Exemplifica-se esta acção destruidora com o bacillo d'Eberth verificando-se, como na experiencia de Pfeiffer, que a injecção intraperitoneal, em cobaia nova, de cultura viva eberthiana, é a determinante de peritonite mortal, evitavel se a cobaia tiver sido previamente vaccinnada contra o bacillo d'Eberth.

Quando uma cultura é misturada com sôro de animal não immunisado, ella multiplica-se, prolifera, vive, mas se a mistura fôr feita com sôro de animal immunisado para aquella bacteria, os microorganismos não se multiplicam, agglutinam-se e morrem.

O phenomeno de Pfeiffer estendendo-se ainda aos pneumococcus, (Bezançon), imprime um caracter de generalidade ao processo, o que levou os humocristas á

afirmação de uma inquestionavel interferencia dos humores organicos, no phenomeno da immundade. Segundo este modo de vêr, a immundade de um organismo perante um agente infeccioso, é o resultado do desenvolvimento, nos seus humores, de substancias que pela sua acção impedem a multiplicação d'esse agente, toda a vez que se realize nova invasão. A infecção primitiva cria um estado de immundade activa perante o agente invasor.

Erlich interpreta o phenomeno que vimos de descrever, segundo a theoria das cadeias lateraes, explicando-o pela forma seguinte: os microbios quando inoculados em dose não mortal combinam os seus receptores com os receptores cellulares, inutilizando estes, para a funcção nutritiva da cellula.

Este facto determina um estimulo ao qual, o elemento cellular responde por uma hyperactividade formadora de receptores, muitos dos quaes se despreendem do nucleo a que pertenciam, caindo no meio ambiente, passando para o plasma. Estes receptores de origem cellular vivendo agora nos humores são os amboceptores de Erlich. Se acontece que o organismo é novamente invadido pelo agente que determinou a formação dos amboceptores, estes em presença dos novos agentes, combinam-se com os receptores microbianos sem produzirem modificação na vida da bacteria.

Ora seja no sôro normal, seja no immuno-sôro existe tambem uma substancia, o complemento, capaz de actuar sob a bacteria quando em presença do amboceptor especifico, mas incapaz de o fazer isoladamente. No nosso caso a nova invasão microbiana tem um resultado innocente, porque os amboceptores especificos que existiam nos humores do animal, sensibilizando as bacterias, dispoem-n'as á acção destruidora dos complementos.

D'este modo a theoria humoral explica a immuni-
dade adquirida para os agentes infecciosos.

O complemento e amboceptor, existentes no sôro
immunizado, exerciam a sua acção bactericida sobre o
microorganismo, mercê do amboceptor produzido pela
cellula em defeza contra um primeiro ataque de ba-
cteria virulenta.

Em mais serios embarços se encontram os patho-
logistas humoraes para explicarem, por intermedio da
theoria humoral, os factos da immuidade natural. Bu-
chner desenvolve uma teoria humoral da immuidade
natural, attribuindo-a á acção bactericida dos humores.
Segundo elle, a substancia protectora, de acção bacte-
ricida, era o complemento disseminado nos exshudados
e que mais tarde verificou ser identico ao complemento
do sôro. Buchner admittia a sua proveniencia leu-
cocyttaria, contrariamente ao modo de vêr de Pfeiffer,
fundando-se este, no facto de exshudados muito ricos
em leucocyttos, terem bastas vezes um poder bacterici-
da bastante inferior ao do sôro dos mesmos animaes.

Em harmonia com o modo de vêr de Buchner, a
immuidade natural, seria a consequencia da bacteri-
cidia, exercida pelo complemento que proviria da se-
creção leucocyttaria; a defeza natural do organismo
seria feita pelos leucocyttos á custa de substancias so-
luveis que elles segregavam. Erlich pensa como Bu-
chner na acção bactericida do complemento humoral,
mas faz intervir um outro elemento sem o qual essa
acção se não poderia exercer, o amboceptor. N'estas
circumstancias os phenomenos da immuidade natural
resultariam, como o da adquirida, do concurso simul-
taneo das duas substancias, complemento e amhocep-
tor tornando-se porém necessario provar que nos
sôros de individuos normaes existia amboceptor. Bor-
det e Gengou ensaiam um sôro incapaz por si mesmo

de produzir a bactericidia dos vibrões cholericos ; a este sôro juntam um outro sôro aquecido a 55° constatao a espherolação do vibrião. O primeiro soro conteria o complemento e o segundo, desprovido d'este pelo aquecimento, forneceria o amboceptor.

Por este processo tornava-se facil o constatar se um dado sôro possuia ou não fixador e procedendo assim Bordet e Gengou chegaram á conclusão de que nos sôros novos não existe, por via de regra, amboceptor, ou se existe é sempre em quantidade verdadeiramente inapreciavel.

Os pathologistas humoraes soccorrem-se ainda, para explicarem os phenomenos da immuniidade natural, do concurso de outras substancias existentes nos humores do organismo, as agglutininas. Não só no sôro sanguinio mas ainda em outros liquidos, como os exsudados, secreções como o leite, as lagrimas, etc. se encontram essas substancias capazes de impedir o movimento das bacterias, reunindo-as em massas e inutilizando por esse motivo o seu effeito.

Essas substancias são as agglutininas que concorrem com a sua acção para o phenomeno da immuniidade.

Dispensamo-nos de novas referencias á immuniidade natural antitoxica porque ás antitoxinas nos referimos já na exposiçãõ da theoria cellular, relativa á immuniidade antitoxica. De tudo o que deixamos dito, conclue-se que a immuniidade natural é a resultante do concurso de substancias antitoxicas, bacterio-agglutinantes e bactericidas, existentes nos humores do organismo.

Escusado é dizer que o mechanismo intimo pelo qual se executa a immuniidade, na theoria dos humores, é um capitulo cheio de difficuldades, de controversias, de incertezas, e que tambem na theoria cel-

lular, a intimidade do phenomeno não é de uma clareza e nitidez tão accentuadas que se imponham de maneira a varrer todas as duvidas do nosso espirito.

Terminada a exposição resumida que nos propozemos fazer das theorias cellular e humoral da immunnidade ante-bacteriana e antitoxica, vamos agora, para terminar com este capitulo de noções breves sobre immunnidade, apresentar as ideias que actualmentemente dominam relativas ao phenomeno, ou seja o estado actual da questão.

C) Estado actual da questão de immunnidade.

É hoje noção corrente que os organismos possuem elementos com a faculdade de absorverem corpos extranhos que accidentalmente n'elle penetrem, ou se formem ; é tambem noção assente que, mercê de substancias fabricadas por esses elementos, o organismo tem a faculdade de se desembaraçar d'esses corpos extranhos pela destruição que sobre elles exercem essas substancias especiaes. Não é só sobre as bacterias que tal acção se exerce, o mechanismo da destruição não é reservado exclusivamente aos microbios, antes se exerce tambem quando elementos organicos de natureza differente penetram no organismo.

Assim o phenomeno toma um caracter de generalidade que nos leva a crêr em uma lei de biologia geral reguladora d'estas acções. E' da observação do phenomeno, relativamente a corpos differentes das bacterias, que nós vamos tirar conclusões para a interpretação do mechanismo intimo da immunnidade, tal como elle é hoje admittido.

Serão os phenomenos da hemolyse os alicerces para a theoria hoje dominante da bacteriolyse e começaremos por seguir Bordet a quem se devem os mais bellos trabalhos sobre o assumpto.

Bordet verificou que doses macissas de globulos ver-



melhos, injectados em animaes, arrastavam estes á morte, evidenciando assim a sua toxicidade; se em vez d'essas doses se fizerem successivas injeções intra-peritoneaes de doses fracas de hematias de especie diferente, em vez da morte do animal, obtinha-se n'elle um sôro capaz de dissolver os globulos vermelhos do segundo animal. Injectando globulos de coelho no peritoneo de cobaia, obtem-se um sôro de cobaia capaz de dissolver as hematias do coelho, dissolução que se verifica pela dispersão da hemoglobina no meio em que se faz a experiencia. Este é o phenomeno da hemolyse, base de tão interessantes descobertas.

Bordet desde o inicio do seu trabalho admite o desenvolvimento de uma substancia particular hemotoxica ou hemolytica, analoga nos seus effeitos á substancia bacteriotoxica que se desenvolve no sôro dos animaes tratados com injeções de bacterias.

E' de notar que a hemolyse póde ser artificialmente produzida, toda a vez que se colloquem as hematias em um meio hypotonico mas já se não dá o mesmo se a concentraçào do meio fôr isotonica, o que se explica pelos phenomenos de osmose que se realizam no primeiro caso. D'esta maneira se as hematias forem conservadas em meio isotonico e se houver um sôro que n'essas circumstancias é capaz de produzir a hemolyse, é porque necessariamente n'esse sôro ha substancias que vão produzir o phenomeno que então não pode ser determinado pela osmose. Effectivamente o poder hemolytico adquirido por um sôro é a consequencia da acção combinada de duas substancias distinctas, separaveis pela acção do calor. Bordet prepara um sôro hemolytico de coelho para os globulos de carneiro e uma vez obtido esse sôro, aquece-o a 55° durante meia hora; collocando esse sôro aquecido, em presença de globulos de carneiro, para os quaes elle

tinha primitivamente propriedades dissolventes, verifica que essas propriedades desapareceram após o aquecimento, mas a hemolyse produzir-se-ha, se á mistura, juntarmos um pouco de sôro de coelho novo, não aquecido. Ora o sôro novo, não preparado, não possui por esse motivo propriedade hemolytica, e se a sua junção á mistura de sôro de coelho inactivado e hematias de carneiro, vae provocar a hemolyse, é porque necessariamente o sôro novo veio trazer substancias capazes de reactivarem a hemolysina que existia no sôro aquecido. O sôro preparado do coelho, sôro que primeiro tinhamos empregado, era capaz de produzir a hemolyse porque possuia para isso substancia propria, capaz de destruir as hematias; com o aquecimento inactivámos essa hemolysina, e não a destruimos porque o soro novo, que depois juntamos, não tem hemolysina, pois não é um sôro preparado, e apesar d'isso a hemolyse dá-se, após a junção. Este sôro novo vem trazer o complemento necessario para a hemolyse se produzir.

Para tornarmos mais clara esta noção exporemos o phenomeno pela forma seguinte: o sôro de coelho preparado perde o poder hemolytico pela acção do calor porque este destroe o complemento e a substancia hemolytica fixa-se nos globulos, sensibilizando-os como diz Bordet ; o sôro fresco vem trazer o complemento necessario para a hemolyse se produzir. D'esta maneira o phenomeno resulta da conjugação de duas substancias, uma destructivel pelo calor e outra que por essa acção se fixa nos globulos, sensibilizando-os. A primeira é o complemento, alexina ou cytase ; a segunda é o amboceptor, sensibilizadora ou fixador. Distinctas pelas suas propriedades, distinctas pela sua acção, são de uma enorme importancia na interpretação actual dos phenomenos de hemolyse e bacteriolysse.

I Amboceptor — o amboceptor ou sensibilizadora ou ainda fixador, é um producto de immunisação, substancia especifica e thermoestavel. E' um producto de immunisação pois só se encontra nos sôros preparados, augmentando successivamente com as injeccões immunisantes até a um maximo difficil de ultrapassar. E' especifica por só actuar sobre os globulos com que foi preparado o animal que fornece o sôro e, por ultimo, é thermoestavel por não ser destruida a 55.^o como succede á alexina, estendendo-se a sua resistencia até 70^o.

II Complemento — o complemento ou alexina não é producto de immunisação, não é especifica e é themolabil. Não é producto de immunisação porque se encontra tanto nos sôros immunes como nos soros normaes; não é especifica porque perante globulos sensibilizados, qualquer sôro normal, coelho, cobaia, carneiro, etc., produz a hemolyse, ainda mesmo quando os globulos pertençam aos animaes mais diversos; é themolabil porque não resiste á temperatura de 55^o como succede ao amboceptor, sendo esta propriedade um dos mais importantes caracteres para se estabelecer a differenciação das duas substancias.

Uma ultima propriedade da alexina, de grande importancia, sob o ponto de vista pratico, por sobre ella ser baseado o methodo de desvio do complemento, é a que diz respeito á sua fixação sobre os globulos, que só se faz tendo por intermedio uma sensibilizadora.

Collocando globulos sensibilizados em presença de sôro novo, produz-se o phenomeno da hemolyse mas, se tornamos a applicar este mesmo sôro a globulos egualmente sensibilizados, já se não dá a hemolyse porque a alexina foi exgotada no primeiro ensaio. É a fixação ou desvio do complemento,

Por outro lado, collocando em presença de um sôro novo, globulos de especie differente, não sensibilizados, não se produz hemolyse mas se empregarmos o mesmo sôro com globulos sensibilizados a lyse produz-se. E' ainda a fixação ou desvio do complemento.

O mechanismo da hemolyse, com os sôros preparados, traduz-se pois pela acção conjugada de duas substancias : uma especifica e a outra não, a alexina e o amboceptor. O mechanismo do phenomeno apresentado, facilita a interpretação dos phenomenos que se passam entre os organismos e as bacterias, estabelecendo-se entre hemolyse e bacteriolyse uma analogia tão accentuada que, com as mesmas substancias, se interpretam os mechanismos dos dois phenomenos.

Os animaes immunizados contra o vibrião cholericco por qualquer dos processos de immunisação, possuem um sôro com propriedades lyticas para essa bacteria ; um animal a que se injectam globulos vermelhos de especie differente fabrica um sôro com propriedade lytica para os globulos do segundo animal.

Se nós aquecermos o sôro hemolytico, e o juntarmos depois aos globulos vermelhos, a hemolyse já se não dá ; da mesma forma aquecendo o sôro bacteriolytico e juntando-o ao vibrião cholericco, a bacteriolyse é impossivel. Se n'este segundo caso addicionarmos sôro novo, quer ao hemolytico, quer ao bacteriolytico, as lyses manifestam-se de novo. Ainda para mais accentuadamente estabelecermos a analogia de um com outro processo, resta-nos dizer que, com bactérias sensibilizadas, podemos fazer fixação ou desvio do complemento, da mesma maneira como o podemos fazer com hematias sensibilizadas. Por ultimo bacterias sensibilizadas podem desviar o complemento de um sôro hemolytico, da mesma maneira que globulos sen-

sibilizados podem desviar o complemento de um sôro bacteriolytico.

Os sôros hemolyticos são rigorosamente especificos e a mesma especificidade se observa com os sôros bacteriolyticos; o sôro hemolytico aquecido a 70° não pôde ser reactivado ainda que se lhe junte grande quantidade de sôro fresco, e precisamente o mesmo succede com o sôro bacteriolytico.

De toda esta exposição nós podemos affirmar, que ha uma analogia perfeita entre hemolyse e bacteriolyse, e que a sensibilizadora bacteriolytica é como a hemolytica, um producto resultante da immunisação, rigorosamente especifica e thermoestavel e que serve de cadeia entre bacterias, ou globulos, e complemento. Este, por seu turno, é o mesmo, quer na hemolyse quer na bacteriolyse, como o prova o facto de podermos despojar um sôro novo da sua alexina, seja por meio de globulos vermelhos sensibilizados, seja por meio de bacterias sensibilizadas.

Do que deixamos dito tiramos a conclusão, de que o organismo uma vez invadido por hematias, ou por bacterias, responde a essa invasão, creando substancias antagonicas das injectadas capazes de as destruir. O phenomeno não se restringe porém só aos dois elementos, hematias e bacterias, antes possui a faculdade d'aquella criação quando mesmo em presença de outras substancias. A injectão de toxinas microbianas, de venenos vegetaes como a ricinina, de substancias organicas de origem cellular, dão ensejo, como as hematias e bacterias, a que o organismo quando por ellas injectado, responda formando anti-substancias capazes de as destruir.

E' assim que temos:

Globulos vermelhos	}	Hemolysinas
		Hemoagglutininas
Bacterias	}	Bacteriolysinas
		Bacterioagglutininas
Cellulas	}	Cytocoagulinas
		Cytolysinas
Toxinas		Antitoxinas

Aos elementos capazes de determinarem um organismo a crear estas substancias que vimos de enunciar, dá-se o nome de *antigeneos* e ás substancias formadas o de *anticorpos*.

Os anticorpos são pois substancias thermoestaveis que se produzem na immunisação, pela acção do antigeno e rigorosamente especificas para esse antigeno.

A mistura de antigeno e anticorpo absorve sempre a alexina.

Nicolle apresentou uma hypothese, que expômos pelo que ella tem de interessante, relativa á natureza dos anticorpos. Segundo elle, um organismo preparado produziria duas especies de anticorpos — as coagulinas, ou aglutininas, capazes de actuarem por si sós e — as lysinas — que carecem da acção complementar da alexina. Teriamos assim cytoagglutininas e cytolysinas, bacterioagglutininas e bacteriolysinas toxino-agglutininas e toxinolysinas, albumino coagulinas e abuminolysinas.

A verdade porém é que nós não conhecemos ainda a natureza dos anticorpos e apenas os podemos caracterisar pelas suas propriedades e effeitos, não passando de meras hypotheses as ideias de Victor Henri sobre a natureza colloidal d'estas substancias. Pretende este auctor que anticorpos e antigeneos constituem complexos colloidaes, agglutinantes ou descoa-

gulantes, segundo a sua carga electrolytica. Sensibilizadora e alexina, segundo elle, eram estados differentes dos colloidaes do sôro, produzidos pelo aquecimento. Este modo de vêr era fundado nas experiencias de André Mayer, que constatou ao ultra-microscopio, que o aquecimento a 56° provoca o agrupamento dos granulos colloidaes do sôro.

Embora a nossa impressão seja a de que a natureza intima das substancias, que concorrem para a immunidad, se deve procurar no dominio da chimica biologica, não podemos contestar as affirmações physicas de Victor Henri, por não possuirmos argumentos scientificos para tal, como tambem os não possuímos em pró da nossa impressão, razão esta que nos leva a fallarmos apenas em impressão, quanto á natureza de taes substancias.

Expostas estas noções succintas quanto ás ideias que hoje dominam, relativamente ao phenomeno da immunidad, resta-nos applicar a theoria aos cazos da immunidad adquirida e da immunidad natural. A primeira seria a consequencia d'uma dupla acção, representada, primeiro, pela formação dos anticorpos pelo estimulo dos antigeneos, anticorpos que, com a sua acção lytica e agglutinante, inutilizariam a acção das bacterias; segundo, pela phagocytose onde os phenomenos lyticos se continuariam.

A immunidad natural seria a consequencia de uma serie de invasões e infecções passadas na cadeia ancestral e evolução individual, o que levaria á armazenagem de uma quantidade consideravel de anticorpos aptos a inutilizarem os differentes agentes nocivos, sommada ainda com a phagocytose.

A importancia do phenomeno da phagocytose, sobretudo da microphagocytose tal como a imagina Metchnikoff, é decisiva na immunidad.

A prova está na apprehensão que os phagocytos exercem sobre as bacterias, tanto mais activa, tanto mais intensa, quanto melhores são as condições de resistencia que o organismo possui; isto é já razão sufficiente para tornar interdicta a pretensão de collocar de parte tão importante phenomeno. E' facto que ninguém pensa em tal e que a theoria phagocytaria, hoje comprovada experimentalmente, entra correntemente no capitulo da immuidade. Esta possibilidade de confirmação experimental é o mais seguro alicerce da theoria.

A phagocytose é uma realidade incontestavel e nós possuímos meios para a sua verificação, mas embora incontestavel não é uma acção que se exerça em todos os casos, independentemente de qualquer interferencia de substancias auxiliadoras. Não é de uma autonomia absoluta antes ha substancias que n'ella interveem no sentido de a tornar efficaz. Esta affirmacão não destroe a realidade da phagocytose exponentanea, pois certo é que phagocytos e bacterias são dois elementos que, conjugando-se, chegam á phagocytose, dependendo apenas do factor tempo, mas certo é tambem que se fizermos entrar sôro no conjuncto da bacteria e phagocyto, a phagocytose torna-se bem mais accentuada.

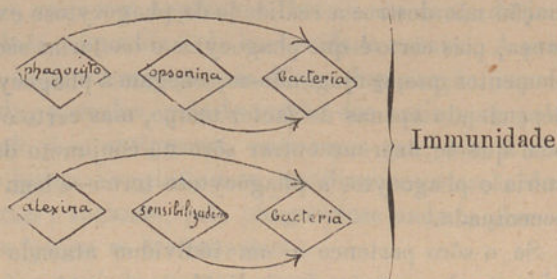
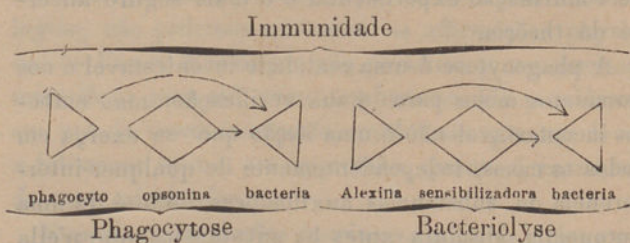
Se o sôro pertence a um individuo atacado pela bacteria da experiencia, individuo que está reagindo vantajosamente contra a invasão, e se no conjuncto fizermos entrar agora esse sôro, a phagocytose, n'este ultimo caso, é ainda mais intensa do que nos dois primeiros casos que considerámos.

A addição de sôro normal ou doente, tornando mais efficaz a phagocytose, prova a interferencia de qualquer substancia que auxiliou de qualquer modo a producção do phenomeno em estudo. Effectivamente

essas substancias existem, foram individualizadas por Wright com o nome de *opsoninas* e por Neufeld com o de bacteriotropinas.

Phagocytose e bacteriolyse são os dois grandes phenomenos de que o organismo se serve na lucta contra os agentes infecciosos e são a base fundamental da immundade contra esses agentes.

Em schema podemos representar o phenomeno d'esta maneira.



CAPITULO II

Opsoninas

Historia — Opsoninas são substancias soluveis, que se encontram nos sôros normaes e nos immuno-sôros, intermediarias, entre phagocytos e bacterias, e que accentuam consideravelmente o phenomeno da phagocytose, quando n'elle teem interferencia.

Um dos processos importantes de que o organismo se serve para obter a immuidade, quando em lucta com os organismos pathogenicos, é o da phagocytose. Os leucocytos polymorphos, independentemente da acção de substancias extranhas, pôdem incorporar bacterias, realizando por este processo a phagocytose expontanea. Esta, além de demorada na sua realização, é excassa quanto ao numero de microorganismos phagocytados, mas já o mesmo se não dá quando no phenomeno ha interferencia do sôro que, com as suas substancias especiaes, consideravelmente abrevia o tempo do phenomeno, e augmenta a incorporação das bacterias. São estas substancias especiaes do sôro que Wright individualisou com o nome de opsoninas.

Que existem no sôro substancias que directamente interveem no phenomeno da phagocytose, é hoje um

facto de acceitação universal, mas não é em Wright que primeiro encontramos noções sobre a existencia d'essas substancias. Wright teve a gloria de as pôr nitidamente em evidencia, de estudar o seu modo de acção, e emfim, de com ellas construir um novo processo de therapeutica das doenças infecciosas, processo que nos poderá conduzir ainda bem longe, a resultados mesmo imprevistos. Porém, já antes de Wright, outros experimentadores tinham fallado em substancias com acção favorecedora da phagocytose. O brilhante descobridor do mais importante processo de defeza do organismo, Metchnikoff, aventou a hypothese da existencia, no sôro, de substancias que activamente favoreciam a phagocytose e que para o sôro eram lançadas pelos leucocytos.

Para Metchnikoff, essas substancias eram productos da actividade dos leucocytos, productos da sua elaboração e chamando-lhes, *estimulinas*, traduzia a acção estimulante, que ellas exerciam na phagocytose.

Sawtchenko em 1901 pensou n'uma substancia — *philocytase*—que, segundo, elle interferia na phagocytose, exercendo uma acção estimulante sobre o leucocyto e sobre a bacteria. Nada nos disse porém sobre a sua origem, natureza etc.

Denys e Leclef affirmaram, em 1895 (*La cellule*, vol. II, pag. 177), a influencia do sôro sobre a phagocytose, *in vitro*, sem porém nos mostrar a fórma como se exercia essa influencia. Emfim, innumerous experimentadores admittiam que no sôro qualquer coisa havia que determinava uma acção auxiliadora do phenomeno da inclusão bacteriana. Era o dominio da hypothese, o predominio da theoria. E assim foi, até que em 1902 Wright e Douglass, aproveitando o engenhoso processo experimental de Leishmann, vieram com as suas opsoninas individualisar as substancias

que theoreticamente existiam no sôro, e com o seu trabalho assentar na existencia de um novo elemento da mais alta importancia para o estudo da immuni-
dade, creando um novo processo de therapeutica das
doenças infecciosas.

b) Origem das opsoninas — No caminho que antecipadamente nos propozemos percorrer, ao pensar no estudo escabroso e delicado das opsoninas, ao sub-capitulo da historia, segue-se naturalmente o sub-capitulo da origem d'essas substancias.

Manifestamente não possuímos pratica nem engenho sufficientes, para aventarmos uma hypothese quanto á origem das opsoninas, e arrojio é já da nossa parte, o permittirmo-nos a inclinação para uma dada conclusão quanto a essa origem, conclusão que a seu tempo exporemos.

Seja dito a titulo de exordio, que ainda hoje é mais ou menos vago, tudo quanto com a origem das opsoninas se relaciona. E a mesma penumbra, o mesmo mysterio, envolve a origem de muitas outras substancias que concorrem para a immuni-
dade.

Que os anticorpos bacteriolyticos teem a sua origem exclusivamente nos orgãos leucopoïeticos, baço, medulla ossea, ganglios lymphaticos, etc., resta pròvalo, embora seja certo que estes orgãos teem uma intervenção activa na fabricação d'esses anticorpos. Mas serão elles a séde unica, exclusiva da sua formação? Não temos resposta para a pergunta enunciada.

Se formos estudar as precipitinas e as agglutininas, encontramos-nos com Levaditi e outros que primeiro nos affirmaram a possibilidade de uma origem cellu-
lar universal para as precipitinas, mas que hoje nos dizem que tanto estas, como as agglutininas teem, naturalmente, a sua séde de formação, nos en-

dothelios vasculares. As alexinas proveem dos leucocytos, e especialmente dos polymorphos ; as aggresinas são um producto da bacteria etc. Isto são outras tantas affirmações que carecem ainda de uma confirmação bem evidente.

Se mais substancias procurarmos, mais se nos arreiga no espirito a convieção em que estamos de que ha ainda muito de vago, de confuso, no dominio da origem das substancias a cargo das quaes está a defeza dos organismos.

Muito se tem avançado, numerosas descobertas e optimas applicações se teem feito n'estes ultimos tempos, mas tudo isso pouco é, comparado com o que ignoramos. Esta affirmação é um logar commum que se justifica, e as difficuldades que ainda restam vencer, attestam bem a difficuldade do assumpto.

A origem das opsoninas está ainda no campo das hypotheses, mas no mesmo campo se encontram as origens de muitas outras substancias ha muito mais tempo conhecidas. Se as opsoninas são corpos que existem no sôro, pelo menos em mais consideravel abundancia, occorre primeiro pensar, que ellas sejam formadas por elementos que mais directamente se relacionem com o sangue, os leucocytos. Levaditi affirma a sua proveniencia leucocytaria, por só ter encontrado opsoninas em exshudados com predominio de leucocytos.

A mesma fórma de vêr tem Metchnikoff, para o qual, o poder opsonico do sôro, é a consequencia immediata da phagolyse, determinada pela coagulação, sendo n'esse momento que as opsoninas se desprendem dos leucocytos para passarem ao sôro.

São dois experimentadores, cujas opiniões calam fundo em todos os espiritos, a affirmarem a origem leucocytaria das opsoninas.

Beattie de Scheffield pensa que as opsoninas são substancias formadas pelos leucocyto, e que passam ao sôro não só no momento da phagolyse, mas tambem como um producto de secreção do leucocyto. E' portanto outra opinião a favor da origem leucocytaria das opsoninas, e como esta, muitas outras existem a pretenderem demonstrar que é no leucocyto, e só n'elle, que devemos procurar o ponto de formação das opsoninas.

No reverso da medalha deparamos com as opiniões antagonicas, e á frente Wright a negar a interferencia do leucocyto na formação das opsoninas. Com Wright outros negam essa intervenção.

D'estes antagonismos, sustentados por tão pesados alicerces, resulta nitidamente a escabrosidade do assumpto.

E' altura, n'este ponto, de fazermos referencia á bem conduzida série de experiencias estabelecidas por Milhit e de estudarmos as suas conclusões.

Milhit propoz-se estudar o poder inclusor dos diferentes liquidos do organismo, para d'ahi avaliar a sua riqueza em opsoninas. Verificou n'estes ensaios que liquidos organicos como a urina, leite, lagrimas, liquido da camara anterior do olho, não possuíam poder inclusor, ainda mesmo que em alguns existissem leucocyto, como tantas vezes acontece nas urinas. Que, n'este ultimó caso, não existisse inclusão, comprehende-se, porque o leucocyto, que normalmente existe na urina, é o globulo de pus que por estar assim modificado, póde não possuir substancia opsonica. Milhit não faz esta referencia que julgamos importante.

Experimentando com liquidos cephalo-rachidianos dos quaes uns continham leucocyto, outros não, verificou, que ao passo que o poder inclusor do sôro va-

riu entre 1,09 e 2,80, o poder incluser do liquido variou entre 0,15 e 0,23.

E' bom frizar que quando existiam leucocytoz eram apenas alguns polymorphos.

Em uma pleurisia o liquido pleurítico apresentou um poder opsonico 4,30, e o sôro do doente um poder 4,50. O derrame era muito rico em polymorphos. D'estas experiencias Milhit conclue que liquidos contendo leucocytoz (urina, liquido cephalo-rachidiano), podem não conter opsoninas, e que outros com extrema abundancia d'essas cellulas, (liquido pleurítico) não teem um poder incluser correspondente á quantidade de leucocytoz que encerram.

Que na urina não haja opsonina, embora existam leucocytoz, comprehende-se como já dissemos, attendendo ao estado especial em que ahi se encontram os leucocytoz, e que no liquido cephalo-rachidiano com leucocytoz, a inclusão não tenha sido apreciavel, tambem se comprehende, pois é mesmo Milhit que affirma existirem apenas alguns leucocytoz, insufficientes, por isso mesmo, para darem uma inclusão apreciavel.

Quanto aos liquidos com abundancia de leucocytoz e inclusão desproporcionada, como era o caso do derrame pleurítico, tambem se comprehende. Em primeiro logar um poder incluser que se representa pelo numero 4,3 já é importante, e depois os leucocytoz não se encontram ahi em circumstancias nada normaes, e natural se torna, por isso mesmo, a falta de correspondencia entre a quantidade de leucocytoz e o poder opsonico do liquido em que elles se encontram.

D'esta serie de experiencias conclue Milhit que se não pôde assegurar uma proveniencia exclusivamente leucocytaria, á substancia opsonica.

Da critica exposta, tambem nós não podemos concluir que a opsonina provenha das cellulas sanguineas

e só d'ellas, mas por essa critica tambem não podemos chegar á conclusão da existencia de outro fóco onde possamos encontrar a sua origem.

A nossa conclusão, com estas experiencias, é que Milhit não demonstra a impossibilidade da origem exclusivamente leucocytaria da opsonina.

Os defensores da origem não leucocytaria das opsoninas procuram, n'uma outra ordem de ideias, provar que não é no leucocyto que está localisada a sua sede de formação, affirmando que se effectivamente fossem os leucocytoz os formadores d'essas substancias, necessariamente devia haver relação intima entre as variações da leucocytose e as variações da opsonina.

E assim hyperleucocytose e leucopénia deviam ser acompanhadas de excesso da substancia opsonica no primeiro caso, e excaszez no segundo. Milhit refere um caso de leucemia lymphatica representada pelo numero consideravel, embora não extraordinario, de 80:000 globulos brancos por mm^3 , e dois outros de leucémias noyelogenicas, não observando em nenhum d'elles accrescimo sensivel de substancia opsonica.

Este accrescimo encontrou-o elle em casos de febre typhoide com accentuada leucopénia, acompanhada porém de um augmento consideravel de substancia opsonica.

Estas observações não nos podem de maneira nenhuma conduzir á negação da origem leucocytaria.

No caso da leucémia lymphatica, era de prever a falta do accrescimo de substancia opsonica, pois não é no lymphocyto que ella se forma, conclusão a que somos levados pela excaszez de opsonina nas macerações de ganglios lymphaticos.

Quanto ás leucémias myelogenicas, era mesmo natural que existisse essa falta, pois esses globulos não são cellulas normaes, são leucocytoz doentes, e a fal-

ta do seu funcionamento é a determinante da escassez opsonica.

A physiologia pathologica de uma cellula não pode ser como a physiologia normal da mesma, e em uma cellula tão delicada e complexa como o leucocyto, a verdade da affirmação traduz-se por perturbações certamente mais profundas do que em qualquer outra cellula. Se em uma leucémia myelogenica ha doença dos globulos brancos, não tem justificação a exigencia de um augmento de substancia opsonica, a corresponder ao augmento do numero de globulos. Essa doença é razão sufficiente, e necessaria mesmo, para que se dê um entrave á producção das substancias que o leucocyto normalmente prepara.

Metchnikoff verifica nos mixomycetas, massas vivas que se encontrem em alguns cogumellos, a existencia dos vacuolos com substancia acida, dispersos em meio completamente alcalino. Ganulações de tornezol são apprehendidas e incorporadas por esses phagocytos dos mixomycetas, tomando a côr vermelha. Pois basta uma pressão ligeira na massa viva para vermos terminar esse phagocytismo dos vacuolos e a sua invasão pela substancia alcalina do meio.

Se esses phagocytos, bem menos complexos que os phagocytos humanos, mudam por completo a sua physiologia pela acção de uma determinante minima, porque razão os phagocytos humanos, cellulas tão delicadas e complexas, não hão de modificar a sua physiologia quando são presa de doença?

O absurdo seria precisamente que elles conservassem o seu funcionamento, como nas circumstancias normaes.

Assim se justifica a falta de opsonina nas leucémias.

Em casos de febre typhoide a leucopénia era acompanhada de augmento do poder opsonico. Ora na fe-

bre typhoide ha um intenso microphagismo que incide sobremaneira nos leucocytyos polymorphos, e d'este microphagismo decorrem duas consequencias que bem explicam a observação, leucocytyos diminuidos no seu numero, e sôro com o seu poder opsonico augmentado. A leucopénia é a primeira consequencia e o augmento do poder opsonico é a segunda. Este poder augmenta porque augmenta a quantidade de substancia opsonica, e esta cresce como resultado da destruição dos globulos brancos. De maneira que a intensa destruição de leucocytyos, na febre typhoide, arrasta ao estabelecimento da leucopénia e ao augmento do poder opsonico.

Ainda, por esta nova ordem de ideias, nós não podemos affirmar com segurança que não sejam os leucocytyos os formadores da substancia de Wright. A nossa conclusão é a de que os factos apontados, não provam a impossibilidade da origem lucoyctaria da opsonina. Onde procurar pois essa origem? Nos leucocytyos, nas cellulas do organismo, em orgãos especificaes, em algumas cellulas d'esses orgãos?

A primeira indicação está naturalmente em ir fazer essa pesquisa aos orgãos hematopoieticos, baço, ganglios lymphaticos, medulla ossea.

Milhit injecta coelhos e cães com bacillo d'Eberth e depois com sôro anti-typhico de Chantemesse. Constatada n'estas experiencias, o augmento do poder opsonico, concomittantemente com hypertrophia consideravel do baço, hyperactividade da medulla ossea e leucocytyose, e d'ahi conclue sobre a interferencia incontestavel dos orgãos hematopoieticos, na producção das opsoninas.

Ao mesmo tempo prepara macerações com musculos, figado, rins, capsulas supra-renaes thymus, corpo thyrideo, ovario, mucosa intestinal e observa que

estas macerações teem um poder inductor nullo. Macerações de baço, ganglios, medula ossea são tambem negativas.

D'este conjuncto de experiencias resulta, a falta de opsoninas nas macerações de orgãos, incluindo os hematopoieticos, e a hypertrophia d'estes, coincidindo com augmento do poder phagocytario. Poderemos concluir do simples factu d'essa hypertrophia, sobre o papel productor de opsoninas desempenhado por esses orgãos? A conclusão affigura-se-nos forçada.

Se effectivamente os orgãos hematopoieticos fossem os productores das opsoninas, as macerações d'esses orgãos deviam produzir inclusões apreciaveis, o que se não observa.

A hypertrophia do baço é o resultado da propria infecção, a hyperactividade da medulla ossea é a resposta do organismo á acção do agente infectante, e a leucocytose é a preparação para a phagocytose futura. As affirmações que vimos de fazer, e cuja responsabilidade nos pertence, parecem-nos mais conformes com a realidade, do que a hypothese de querer vêr n'esses centros, os pontos de formação da opsonina. Concluir da hypertrophia do baço que elle tem interferencia necessaria n'essa producção, é mais phantastica, do que admittir que ella se realisa, determinada pela propria infecção, com o fim provavel de originar uma leucocytose que colloque o organismo nas melhores circumstancias de defeza.

Uma ultima ordem de experiencias, é, n'esta altura estabelecida por Milhit, com o intuito de verificar se ha ou não interferencia dos orgãos hematopoieticos na producção da opsonina.

Em animaes inculados e tratados pelo sôro Chantemesse, é colhido o sangue da arteria splenica e medido o poder inductor do seu sôro.

Repete-se a mesma medição para o sangue da veia splênica, e sacrificando o animal, depois d'este ensaio, fazem-se macerações com o seu baço. N'esta serie de experiencias, verifica-se um poder inclutor do sangue da veia, superior ao da arteria, e nullo para as macerações. D'aqui conclue Milhit que o baço tem effectivamente intervenção no phenomeno da criação da opsonina, que desempenha um determinado papel, ainda não averiguado, mas essa acção só se póde realizar quando em correlação directa com o sangue, como o prova a falta de opsoninas na maceração do orgão.

O sangue da arteria, carregado com os productos infecciosos, seria o vehiculo da excitação do baço, ou dos centros do baço creadores da substancia opsonica. Chegado esse sangue ao baço, este responderia á excitação, creando opsoninas que iriamos encontrar no sangue da veia. E' possivel que as coisas se passem assim, mas possivel é tambem que se passem por fórma bem diversa.

Sendo o baço um importante orgão hematopoietico, sendo a defeza do organismo uma função essencialmente leucocytaria, natural é que o organismo infectado responda á infecção pela leucocytose, como por via de regra succede. Os productos vehiculados pela arteria splênica serão os determinantes da leucocytose, e esta será a causa do accrescimo de opsonina.

Qual das hypotheses será mais razoavel, é assumpto que o futuro melhor deslindará. Nós, com Levaditi e Metchnikoff, acreditando na origem leucocytaria da opsonina, damos naturalmente preferencia á segunda hypothese que enunciámos.

De todos os seus trabalhos conclue Milhit que não podemos admittir uma origem exclusivamente leucocytaria para as opsoninas, e que somos levados a crêr na interferencia dos orgãos hematopoieticos n'esse

phenomeno, attendendo á reacção constante de que elles são séde, nos animaes inoculados e tratados pelo sôro anti-typhico de Chantemesse.

N'esta altura propomo-nos a emittir a nossa impressão sobre a origem das opsoninas. Estas proveem dos leucocyts, Quer sejam a reunião de complemento e amboceptor, como diz Metchnikoff, quer sejam productos que já definidos saem dos leucocyts, é n'estes que nos parece dever procurar-se a sua origem.

Cellula de immensa complexidade e de extraordinaria actividade, cellula com uma physiologia tão especial e com um papel tão predominante no organismo humano, porque não ha-de ser ella que produz a substancia que vae preparar a bacteria para uma acção directa? E' razoavel admitti-lo. De resto é no sangue, *habitat* normal do leucocyto, que vamos encontrar a opsonina; é no sangue que vive essa cellula extraordinaria, e natural é que, para o sangue ella lance os productos da sua elaboração, da sua actividade. Nos órgãos e tecidos da economia não se encontra substancia opsonica, nos proprios órgãos hematopoiéticos se não póde provar, de uma maneira evidente a sua existencia, e da conjugação de todos estes factos, a nossa razão diz-nos que a sua origem deve estar no leucocyto, que ella deve ser o producto da actividade do leucocyto polymorpho. Será um producto de secreção leucocytaria, será um producto que se desprende na phagolyse, será um producto resultante d'esta dupla acção exercendo-se simultaneamente, em qualquer dos casos lá está o leucocyto a indicar-nos a sua origem.

Concluindo, de tudo o que até agora se tem feito, para se descortinar a origem da opsonina, a séde, o local da sua formação, nada até hoje, por sua decisiva evidencia, nos tem levado á convicção de que

não seja no leucocyto que ella se encontra, como nada até hoje, por sua decisiva evidencia, nos tem acarretado a crença firme, de que no organismo existam orgãos ou tecidos, onde claramente vamos encontrar a séde da sua producção. Sendo assim parece-nos concluir bem, acceitando a provavel origem leucocyteria da substancia opsonica.

c) *Especificidade das opsoninas.*— A especificidade da opsonina é traduzida pela electividade que ella possui, para uma determinada bacteria. Dizer que uma opsonina é especifica para uma certa bacteria, é indicar que a inclusão provocada por ella, é bastante mais consideravel do que a inclusão que essa mesma opsonina póde provocar, exercendo a sua acção sobre uma bacteria differente. A opsonina formada pela inoculação do bacillo d'Eberth, exerce sobre este uma acção muito mais intensa do que sobre o coli-bacillo, traduzindo-se essa maior intensidade por uma incorporação mais activa de bacillos d'Eberth do que de coli-bacillos.

Admittir a especificidade das opsoninas é admittir a sua pluralidade, é acreditar em que o organismo, o leucocyto, fabrica para cada bacteria uma substancia electiva quando se vê atacado pelos microorganismos.

Compreende-se bem o grande valor da affirmacão, se ella fôr verdadeira, pois, da creação da especificidade opsonica, resulta, immediatamente, uma nova applicação d'este novo e interessante estudo, que é a do diagnostico opsonico.

Se effectivamente um organismo invadido por uma bacteria reage, creando uma substancia que electivamente incorpora essa bacteria, basta ensaiar o sôro do individuo e observar qual o microorganismo para

que elle tem mais intenso poder opsonico. Esse será o agente productor da doença.

A granulia, meningite, pneumonia, são entidades morbidas que muitas vezes teem uma evolução perfeitamente typhica e que clinicamente pódem levar á confusão. Estabelecida a especificidade opsonica, basta n'esses casos estudar a inclusão determinada pelo sôro do doente, para obter um elemento da mais alta importancia para o diagnostico differencial.

Infelizmente não possuímos ainda uma bagagem experimental sufficiente, para podermos tirar conclusões sobre a especificidade opsonica, mas dos nossos poucos ensaios, sob este ponto de vista, pareceu-nos resultar que, contrariamente ás affirmações de Wright, Douglass e Bulloch, não existe uma especificidade absolutamente assente da substancia opsonica, havendo porém uma evidente electividade. A um doente da enfermaria de S. Carlos, portador de uma febre typhoide classica, e que classicamente evoluciona, colhemos sangue, quando já em franca convalescença, e com o sôro obtido fizemos inclusões de bacillos d'Eberth, coli bacillo e staphylococcus, tentando o mais possivel, empregar as mesmas quantidades de cultura na preparação das emulsões respectivas.

Os valores que encontrámos para o poder opsonico, do sôro empregado, perante as trez bacterias ensaiadas foram respectivamente :

Bacillo d'Eberth — 5,44.

Coli-bacillo — 3,50.

Staphylococcus — 2,54.

Com o sôro normal obtivemos :

Bacillo d'Eberth — 1,32.

Coli-bacillo — 1,36.

Staphylococcus — 1,94.

O soro typhico mostra claramente a electividade

para a inclusão do bacillo de Eberth. Com um pneumonico observámos a mesma electividade para o pneumococcus quando empregámos tambem staphylococcus. Ao tempo d'estas experiencias nada tinhamos lido ainda sobre a especificidade opsonica, mas já então nos feriram a attenção os resultados que encontramos.

Não é porém das nossas experiencias que iremos tirar conclusões sobre a natureza especifica das opsoninas pois, como já dissemos, são ellas bem excassas no seu numero e foram rudemente conduzidas para um fim tão delicado.

Ainda n'este capitulo faremos essencialmente referencia ás experiencias de Milhit e Bulloch, Chantemesse e Charles Simon e estudaremos as suas conclusões.

Milhit inocula dois coelhos com o mesmo peso, um com staphylococcus, outro com o bacillo d'Eberth tendo previamente determinado o poder opsonico de cada um d'elles para o bacillo d'Eberth. Nos dias seguintes á inoculação observa as variações do poder opsonico de cada coelho para o bacillo typhico, e verifica variações minimas com o sôro do coelho inoculado com staphylococcus, e variações consideraveis para o coelho inoculado com bacillo d'Eberth, traduzidas estas ultimas, por accrescimo do poder inclusor. A conclusão d'esta experiencia é a de que a inoculação de typhico foi determinar a formação de opsonina typhica, especifica portanto, como o demonstrou o accrescimo de inclusão com o sôro do coelho inoculado com Eberth.

Bulloch injecta tuberculina em um animal tuberculoso e verifica o augmento do poder opsonico do sôro d'esse animal para o bacillo de Koch.

Chantemesse injecta o seu sôro anti-typhico em in-

dividuos typhosos e observa augmento do poder opsonico do sôro d'esse individuo para o bacillo d'Eberth. Nem Bulloch nem Chantemesse verificam um accrescimento correspondente para as outras bacterias.

A tuberculina e o soro de Chantemesse deram lugar, respectivamente, á creação de opsonica tuberculosa e opsonina typhica, em uma palavra, de opsonina especifica.

Bulloch emprega sôro e emulsões de staphylococcus e bacillo de Koch, mistura o sôro com uma d'estas bacterias, colloca a mistura na estufa e depois centrifuga. Com o sôro centrifugado, procede a inclusões e verifica então que o sôro já não tem poder inclusor para a bacteria, com a qual foi primeiro misturado, conservando-o entretanto para a outra. D'esta experiencia resultaria que as opsoninas staphylococcicas do sôro, se tinham fixado completamente ao staphylococcus, isto na hypothese de termos feito a mistura com este agente, ao passo que as opsoninas do bacillo de Koch teriam ficado livres, e aptas por isso mesmo a fazerem uma inclusão d'essa bacteria. Esta experiencia de Bulloch seria a confirmação da especificidade absoluta das opsoninas, mas os resultados obtidos por muitos outros experimentadores não são, na maior parte, concordantes com os resultados obtidos por Bulloch.

Charles Simon mede o poder opsonico de um sôro para o coli-bacillo e staphylococcus, depois mistura o sôro com staphylococcus e colloca a mistura na estufa durante 15 minutos, centrifuga e experimenta novamente o poder inclusor do soro para o coli-bacillo e para o staphylococcus, verificando a sua completa extincção, tanto para um, como para o outro dos agentes empregados. E' um facto negativo que tira o valor á experiencia de Bulloch.

Milhit ensaia o poder opsonico de um sôro normal, e

de um sôro typhico, com uma emulsão de staphylococcus e outra de bacillos d'Eberth. Encontra assim os seguintes valores :

Soro normal	}	b. Eberth — 1,16
		staphylococcus — 3,60
Sôro typhico	}	b. d'Eberth — 5,40
		staphylococcus — 5,40

Depois, emulsiona o sôro normal com uma ansa de cultura de staphylococcus e mede os poderes inclusores para os dois agentes. Emulsiona em seguida o sôro normal com uma ansa d'Eberth e faz nova medição. Repete por ultimo os mesmos ensaios com o sôro typhico, e os resultados finais traduz-os pela fórmula seguinte :

Sôro normal	
b. typhico = 1,16	staphyloc. = 3,60
S. n. + staphyloc.	
b. typhico = 0,80	staphyloc. = 1,20
S. n. + b. d'Eberth	
b. typhico = 0,80	staphyloc. = 1,80
Sôro typhico	
b. typhico = 5,40	staphyloc. = 5,40
S. t. + staphyloc.	
b. typhico = 3,50	staphyloc. = 2,40
S. t. + b. d'Eberth	
b. typhico = 2,06	staphyloc. = 3,60

N'estas experiencias verifica-se que o abaixamento do poder inclusor caminha quasi parallelamente para uma e outra bacteria, qualquer que tenha sido o microorganismo emulsionado. Quando emulsionamos sôro typhico, com bacillo typhico, diminue o poder opsonico do sôro para o bacillo d'Eberth, porque as

opsoninas typhicas foram fixar-se nos bacillos da emulsão. Se a emulsão é feita com staphylococcus, é o poder inclusor do sôro para esta bacteria que diminue, pela mesma razão do caso anterior. Em ambos os casos, ha entretanto diminuição simultanea, quer dizer quando diminue o poder opsonico do sôro typhico, emulsionado com cultura typhica para o bacillo d'Eberth, ha concomitantemente abaixamento do poder inclusor do mesmo sôro, emulsionado com a mesma bacteria, para o staphylococcus.

Decrescem ambos os poderes opsonicos, mas o decrescimento ó mais accentuado para a bacteria com que se fez a emulsão. Resultados identicos obtem Milhit quando faz as emulsões com pesos determinados de cultura, em vez de ansas das mesmas. Milhit fundando-se, com razão, nas variações da quantidade de bacterias que são arrastadas com uma ansa de platina, variações de que resultariam diferenças apreciaveis do poder inclusor, emprega quatidades de cultura de peso conhecido ($0^{\text{gr}}\text{,}005$ — $0^{\text{gr}}\text{,}010$ — $0^{\text{gr}}\text{,}015$). Os resultados obtidos, com esta variante de technica, são os mesmos que os indicados no quadro acima e do qual podemos concluir sobre a existencia de uma especificidade relativa, e falta de uma especificidade absoluta, completa.

De todos os factos apontados decorre a conclusão da existencia de uma especificidade relativa, e da existencia d'esta especificidade, resulta o valor relativo do methodo opsonico no estabelecimento do diagnostico das doenças infecciosas, valor com o qual concordamos, fazendo porém algumas restricções, como faz Milhit, cujas conclusões expomos nos paragraphos que seguem.

I — Doente suspeito de febre typhoide, sem sero-reacção e no qual se encontra para o b. d'Eberth um

índice de 1,70, índice que se conserva n'este numero ou augmenta, é um doente que arrasta uma febre typhoide.

II — Doente clinicamente typhoso mas que apresenta para o bacillo d'Eberth um índice 1,20 ou inferior, mas de valor constante, não é, muito provavelmente, um typhoso.

III — Doente clinicamente typhoso, com um índice opsonico muito elevado, póde não ser realmente um typhoso, se na sua historia progressa se constatar uma febre typhoide.

IV — A constatação d'um índice de valor 1,0 a 1,6 não nos permite afirmar uma febre typhoide. E' necessario fazer avaliações diarias do índice do doente, pois na hypothese de dothienenteria, em breves dias, o índice sobe a 2 e mais.

Para terminar com este subcapitulo, diremos algumas palavras ainda sobre o valor do índice opsonico no prognostico das doenças infecciosas, embora, talvez, não devesse ser esta a altura de tratar d'este assumpto.

Na verdade, diagnostico e prognostico derivado do índice opsonico, deviam constituir um capitulo especial, mas tambem é certo que, perante as ligações intimas entre especificidade e diagnostico, nós não podiamos deixar de fazer referencia a este, no capitulo da especificidade. Assim o fizemos, e por o termos feito, tambem nos parece necessaria, n'esta altura, a referencia ao prognostico, attendendo a que um e outro andam sempre mais ou menos ligados. De resto, sobre o valor do índice opsonico, no prognostico de doenças infecciosas, pouco diremos, tanto mais que pouco se póde dizer sobre tal assumpto, attendendo ás excassas conclusões que se podem tirar.

Quando iniciámos os nossos trabalhos de inclusões

com sôros humanos, de doentes em phases diversas da sua doença, pensámos no valor que essas inclusões poderiam ter no prognostico da doença. O estudo das variações do indice opsonico do doente da enfermaria de S. Carlos, chegaram a provocar-nos enthusiasmo, pelas bellas conclusões que pensavamos poder tirar d'aquella observação.

Hoje é bem mais pequeno o nosso enthusiasmo apóz a verificação de que aquelles valores que obtinhamos não representavam uma determinante fatal na cura do doente.

Á medida que o doente melhorava, o indice opsonico crescia no seu valor, e facto que concomittantemente observámos, crescia tambem o poder agglutinante d'aquelle sôro. Nas proprias preparações, a par de bacillos incluídos em grande quantidade, havia massas de bacillos agglutinados. A repetição do facto foi o primeiro golpe no nosso enthusiasmo, pois nos levou a pensar que não era só a opsonina que influa na cura d'aquelle doente.

A opsonina é fundamental na reacção d'um organismo, por ella ser um poderoso estimulo da phagocytose e n'estas condições, quanto mais opsonina crear o leucocyto, tanto mais efficaz será a defeza do organismo.

Infelizmente uma bacteria não é nociva só por si, as toxinas que ella fabrica, as endotoxinas que d'ella se apartam no momento da bacteriolyse phagocytaria, e que invadindo o organismo o vão damnificando a ponto de o poder matar, as aggressinas que a bacteria fabrica, e que até certo ponto parecem impedir a acção benefica da opsonina, são outros tantos factores que poderosamente influem na evolução da doença e no seu prognostico.

Vê-se bem claramente que na invasão do organis-

mo por bacterias, de uma determinada especie, a victoria d'esse organismo depende d'outros factores, alem das opsoninas. Póde assim acontecer que o organismo invadido crie uma quantidade de substancia opsonica sufficiente para uma inclusão consideravel, mas que não reaga com egual intensidade contra os outros meios d'ataque que possuem as bacterias. Sendo assim, o indice opsonico póde ter um valor muito grande, e o organismo estar na imminencia de uma derrota completa. A phagocytose póde ser intensa mas egualmente intensa póde ser a intoxicação do organismo pelas toxinas segregadas pelas bacterias, e tão intensa que o organismo tenha de succumbir. Isto porém só excepcionalmente se observa.

O indice opsonico tem sob o ponto de vista do prognostico um valor relativo, porque nos patenteia a situação de um dos mais importantes meios de que o organismo se serve para a sua defeza. Uicamente sob este ponto de vista lhe podemos dar valor.

Para ajuizar do prognostico da doença só serve como um auxiliar.

d) *Natureza das opsonicas.*—Outro capitulo de delicada interpretação é o que se relaciona com a natureza das opsoninas. Aqui, reina ainda accentuada confusão, a ponto de tornar difficil o fazer uma exposição methodica e racional do que os outros pensam sobre o assumpto. A confusão é a consequencia forçada da ignorancia em que ainda hoje estamos quanto aos phenomenos biologicos, considerados nas suas minucias intimas, na intimidade da sua produção.

Que conjuncto, que serie de reacções se formam, quaes os tramites percorridos pelos elementos que entram n'essas reacções, d'onde resultam as substan-

cias que levam á immuniidade, são outras tantas incognitas ainda a deslindar !

O que são as opsoninas na sua constituição intima, qual é a sua natureza, defini-las com evidencia, mostrar os seus componentes, na hypothese de substancias compostas, são problemas em que o vago é completo. Outras substancias que desempenham na immuniidade papeis consideraveis, productos da elaboração intima da cellula e do micro-organismo, estão para nós, do mesmo modo que as opsoninas, no conjuncto de substancias de natureza intima desconhecida.

Serão todas ellas emanações de um mesmo nucleo proteico e possuirão evidenciação diversa, como consequencia de differentes arranjos atomicos, conservando porém sempre a sua caracteristica de albuminoides ? E' uma hypothese. Serão substancias chemicas definidas, e por reacções chemicas se traduzirá o seu modo de acção, mas a intimidade d'esses agglomerados chemicos e a natureza d'essas reacções, constituem a incognita do nosso problema. Que os arranjos atomicos differentes, conduzam á diversidade da natureza, avaliada pela diversidade do phenomeno que as substancias produzem, é possível, pois tambem no dominio da chimica encontramos corpos com a mesma formula de constituição e formados pelos mesmos elementos unidos nas mesmas proporções. mas com propriedades differentes, os corpos isomericos.

Mas o que são esses atomos ? Como é feito o arranjo atomico ? São elementos chemicos definidos ?

Embrenhar por este caminho é, manifestamente, entrar no campo das divagações absolutamente desculpaveis, necessarias mesmo porque, evidentemente opsoninas, agglutininas, precipitinas, antiphaginas e tantissimas outras substancias que entram em jogo no campo da immuniidade, devem ter uma constituição,

devem ser formadas de qualquer coisa que por emquanto nos escapa.

Se os processos pelos quaes se estuda a chimica da vida ainda não são sufficientes para podermos pesquisar a natureza intima das substancias de que tratamos, a cellula nervosa é um agente que deve intervir, procurando resolver pelo raciocinio aquillo que meios materiaes não podem ainda explicar.

Abandonando este campo, que o futuro esclarecerá, e renovando a affirmação do nosso desconhecimento, quanto á natureza intima das opsoninas, vamos como os outros teem feito, procurar no sôro substancias com as quaes as opsoninas tenham ligação.

Levaditi esforça-se por identificar as opsoninas com o complemento e amboceptor. Para este fim considera duas opsoninas differentes, a opsonina do sôro normal, e a do immuno-sôro; a primeira seria o complemento, a segunda o amboceptor.

Sendo assim, as substancias em que tanto se fallava como auxiliadoras da phagocytose e que Wright individualisou, não seriam substancias novas; complemento e amboceptor eram já conhecidos. Seria apenas uma nova forma de intervenção de um e outro no phenomeno da immundade. Amboceptor e complemento, alem do papel que desempenham na bacteriolyse, possuiriam agora a faculdade de intervenção na phagocytose. E' uma generalisação da sua acção, é uma dupla funcção das mesmas substancias. Para demonstrar que se não trata realmente de uma substancia nova, compara Levaditi as propriedades do complemento com as propriedades da opsonina do sôro normal, procedendo da mesma forma para com o amboceptor e opsonina do immuno-sôro, deduzindo da analogia das suas propriedades a identidade da sua constituição. A cytase de Metchnikoff é thermolabil da mesma forma

que a opsonina do sôro normal ; primeira analogia de propriedades. Com a opsonina podem realizar-se todas as pesquisas da fixação, do mesmo modo que com o complemento ; quando para fixar o complemento se empregam hematias sensibilizadas ou bacterias sensibilizadas, averigua-se que a opsonina tambem é fixada ; se se tratam sôros frescos com leveduras, com corpos bacterianos, constata-se que estes corpos, ao mesmo tempo que absorvem o complemento, absorvem tambem a opsonina ; a injeção em animaes de sôro fresco ou aquecido, de animaes de especie diferente, forma uma anti-opsonina que se não differença do anti-complemento que se forma nas mesmas condições. D'estas propriedades analogas, e da falta de differenças entre opsonina do sôro normal e complemento, deduz Levaditi a sua identidade, e assim o complemento pelas suas qualidades diastasicas, excita o amboceptor bacteriolitico ou hemolytico, determinando a bacteriolysé ou a hemolysé, e pelas suas qualidades opsonisantes, o mesmo complemento, intervem na phagocytose, fixando-se nas bacterias de modo a torna-las aptas para a incorporação. E', como já dissemos, uma dupla função da mesma substancia. Quanto ás propriedades do amboceptor e da opsonina do immuno-sôro, ainda ha analogias que podem conduzir á sua identidade ; o amboceptor é thermo-estavel, a opsonina do sôro immunizado é relativamente thermo-estavel ; o amboceptor é estreitamente especifico, a opsonina é-o relativamente ; é possivel activar um immuno-sôro, inactivado pelo calor, juntando-lhe sôro diluido, amboceptor e faculdade opsonisante reaparecem n'este caso.

D'estas analogias, conclue Levaditi a identidade entre a opsonina, do immuno-sôro e o amboceptor, mas como vimos á thermo estabilidade perfeita do amboceptor e á sua especificidade definida, correspondem pro-

priedades analogas da opsonina mas de evidenciação relativa; a analogia não é completa e portanto só forçadamente podemos aceitar a sua identidade. E' o dominio da duvida, é a incerteza imperando n'este capitulo da biologia, e que leva a hesitação ao nosso espirito. Na verdade a ideia de Levaditi é tentadora e tem a justifica-la grandes analogias de propriedades, mas as pequenas differenças entre a opsonina do immuno-sôro e o amboceptor são por si sós sufficientes para crear a duvida, a incerteza expostas.

Metchnikoff affirma que nos casos de microorganismos frageis, como são por exemplo os vibrões cholericos, é a acção combinada do complemento e amboceptor, a determinante effectiva da bacteriolyse, mas que a grande maioria, dos agentes pathogenicos, resiste victoriosamente á acção combinada do complemento e amboceptor, não se realizando por esse motivo a bacteriolyse.

Comtudo os agentes ficam impregnados d'aquellas substancias, que, sendo impotentes para a sua destruição, não deixam por isso de exercer uma acção benéfica; os microbios impregnados de complemento e amboceptor, tornam-se por esse mesmo motivo, facil presa dos phagocytos. E' a dupla funcção em que já fallámos. Esta mistura de complemento e amboceptor é a opsonina de Wright, a bacteriotropina de Neufeld. Para Levaditi a opsonina do sôro normal e a opsonina do immuno-sôro, são respectivamente o complemento e o amboceptor; para Metchnikoff, as opsoninas são uma mistura de complemento e amboceptor. Qualquer d'elles, como se vê, não acredita que se trate de uma substancia nova, differente das até hoje encontradas no sôro; apenas se trata de uma nova funcção de substancias já conhecidas.

Wright e Douglass, teem uma forma de vêr com-

pletamente differente, considerando as opsoninas como substancias perfeitamente definidas e totalmente independentes das substancias existentes no sôro; nem são complemento, nem amboceptor, nem mistura de um com outro. São opsoninas, traduzindo a palavra que elles pensam ser um elemento novo, entre os já existentes, e de cujo concurso depende a immundade, em parte. Sobre a natureza chimico-physics d'essa nova entidade nada nos sabem dizer, como de resto era de calcular.

Dean considera a acção opsonisante, como a consequencia do concurso de dois corpos, um thermo-estavel, inactivo por si mesmo, o amboceptor; o outro thermolabil, complemento livre. Para elle a opsonisação só se realiza quando existem os dois corpos e quando simultaneamente conjugam a sua acção, resultando d'ahi a phagocytose. E' a forma de vêr de Levaditi.

As opiniões estão, como se vê, ainda hesitantes quanto á natureza das opsoninas; para uns são entidades autonomas, com a sua constituição propria e as suas propriedades definidas; para outros, são corpos formados por elementos já existentes no organismo e com a sua função especial, auxilio da phagocytose.

Se nos fosse permittido uma conclusão, nós diriamos com Levaditi que ha uma certa analogia entre complemento e amboceptor por um lado, e opsonina de sôro normal e do immuno sôro por outro, admitindo porém algumas modificações pelo lado do complemento e do amboceptor. Assim, para nós a opsonina do sôro normal seria um complemento modificado, como modificado seria o amboceptor representante da opsonina do sôro immunisado. A união dos dois daria a opsonina Wright, com propriedades do amboceptor e do complemento modificados, e que não se-

ria um contrasenso considerar como uma substancia especial.

Em ultima analyse, as opsoninas serão substancias soluveis, associadas ás albuminas do sôro, e constituídas pela união do complemento e amboceptor modificados.

Dizemos associadas ás albuminas do sôro porque effectivamente é ligada a essas albuminas que ellas se encontram; para prova-lo basta juntar a 50 c. c. de sôro uma solução saturada de sulfato d'ammonio, filtrar e procurar no filtrado as opsoninas. Feita a precipitação das albuminas pelo sulfato d'ammonio, as opsoninas são precipitadas, o que se verifica pela sua falta no liquido filtrado. Não se póde attribuir o seu desaparecimento á destruição feita pelo SO_4 (Az H_4)² porque este não as destroe, mesmo quando em solução concentrada. De resto, no phenomeno observado não ha destruição, ha apenas precipitação.

N'esta altura, depois de esboçada a natureza provavel das opsoninas, é occasião de fazermos referencia a outras substancias existentes no sôro, estudando as suas propriedades, comparando-as com as das opsoninas, e tirando d'ahi a conclusão da sua dependencia ou da sua individualidade autonoma.

Muitos auctores contestaram e contestam a existencia das opsoninas, consideradas como substancias especiaes, completamente independentes, especificas e com acção propria. Para elles as opsoninas não são mais do que modificações de substancias preexistentes no sôro, ás quaes ellas vão buscar as suas propriedades, a sua origem e é fazendo o estudo d'estas considerações, fazendo a sua relação, para assacarmos as suas diferenças, que nós tentaremos chegar á individualidade da opsonina.

I. *Agglutininas*: Parece-nos absolutamente desti-

tuida de fundamento a affirmação de serem as opsoninas agglutininas modificadas, ou então a admittirmos esta hypothese, temos de admittir tambem que a modificação foi de tal maneira completa e profunda que se creou uma substancia inteiramente differente. A affirmação da origem agglutinica da opsonina, decorreu naturalmente da constituição de cada uma d'estas substancias, da analogia da sua formação; o facto de ambas serem constituidas por um complemento e um amboceptor — heniagglutinina e agglutinophoro para as agglutininas — leva á suspeita, por esta analogia, da origem agglutinica da opsonina.

Ainda que assim fosse, o facto é que as duas substancias possuem propriedades totalmente differentes e conservam uma independencia manifestamente accentuada.

Aquecendo um sôro a 65° a opsonisação é já impossivel com esse sôro, mas não o é a agglutinação; é que a opsonina foi destruida pela acção do calor e a agglutinina não o foi.

Fazendo diluições successivas com o mesmo sôro, este consegue ainda agglutinar n'uma diluição de 1:400, situação em que já não é realizavel a phagocytose.

Ha sôros que determinam phagocytose consideravel mas que teem um poder agglutinante nullo, e inversamente, outros ha que produzem agglutinação consideravel e nulla ou insignificante phagocytose. Estes factos que nós confirmámos, nas nossas observações, traduzem bem a independencia e differença de propriedades entre agglutininas e opsoninas.

Tivemos preparações feitas com sôro de typhosos, em convalescença, em que observámos as cambiantes mencionadas, mas tambem tivemos outras em que a intensidade da opsonisação, corria paralella com a agglutina-

ção ; a par de phagocytose accentuada havia intensa agglutinação, traduzida por massas de bacillos dispersas na preparação. N'estes casos, seriam dois processos independentes, concorrendo para o mesmo fim, a victoria do organismo infectado.

Os factos apresentados, parecem-nos confirmar sobrejamente a independencia relativa entre opsonina e agglutinina, e dizemos relativa porque nos parece lei de physiologia geral que se não ha subordinação completa entre as multiplas funcções de um organismo, tambem entre ellas não ha uma independencia absoluta e a nossa ultima referencia ás nossas preparações parece confirmar a affirmação.

II. *Aggressinas*—Por este termo são designadas substancias que possuem a propriedade de impedir a acção de um sôro bactericida, de maneira a impossibilitar a acção immunisadora d'esse sôro. E' um producto averigualmente bacteriano, sendo o termo *aggressina*, creado por Bail em 1905.

Pelo seu papel destruidor da bactericidia, teria uma acção antagonica das opsoninas mas o certo é que em ultima analyse, os seus fins se identificam, concorrendo tambem as *aggressinas* para a immunidade. A immunidade *aggressinica* provem d'uma acção indirecta, traduzida pela excitação da actividade phagocytaria, consequencia da defeza do organismo, o qual vendo-se em presença d'uma substancia prejudicial, reage por hyperphagocytismo. Embora conducentes ao mesmo fim, as duas substancias, opsoninas e *aggressinas*, são, não só independentes uma da outra, como tambem essencialmente differentes. Basta a sua origem em elementos antagonicos, para calcularmos a differença da sua natureza ; para as opsoninas temos os leucocytos, ou mais especialmente os phagocytos ; para as *aggressinas* temos as bacterias que são clara-

mente os seus productores, e tão claramente que com bacterias podemos nós preparar aggressinas. Sobre as aggressinas temos pois, a sua necessaria differença das opsoninas e a sua independencia. A aggressina não é uma antiopsonina em absoluto, mas tambem não é opsonina.

III. *Antiphaginas*—São substancias elaboradas pelas bacterias, do mesmo modo que as aggressinas, cujo papel é o do impedimento da phagocytose. Quando um exshudado aggressinico impede a phagocytose é porque n'elle existe o nucleo antiphaginicico. Entre as aggressinas e as antiphaginas não ha correlação de fins, pois as primeiras incidem sobre os sôros e as segundas sobre os phagocytos; a mesma falta de correlação se nota entre antiphaginas e opsoninas havendo mesmo entre estas um certo antagonismo. Em primeiro logar, as antiphaginas são de origem bacteriana e as opsoninas, como sabemos, teem a sua origem provavel nos leucocytos; depois, as antiphaginas destruindo os phagocytos, destrôem as opsoninas podendo por isso considerar-se como anti-opsonina.

IV. *Precipitinas*—Estas substancias teem, perante as opsoninas, um papel prejudicial porquanto ao formar-se o precipitado, resultante do contacto entre precipitogeneo e sôro precipitante, n'esse precipitado vão tambem incluídas as opsoninas. A consequencia é uma diminuição do poder phagocytario do sôro em experiencia e a conclusão sobre a natureza de, precipitinas e opsoninas, é que ellas devem ter, naturalmente, uma constituição differente.

Citar mais substancias que possam existir no sôro e que concorrem, por uma ou outra forma, para a immunidadade dos organismos, procurar definir a sua constituição, a sua independencia, é embrenhar por um dedalo de confusões.

Lysinas, hemolysinas, immunisinas e outras, são substancias que possuem mais ou menos relações com as opsoninas, mas em que tudo, é ainda hoje, vago e confuso. Todas estas substancias que se completam uma ás outras, que se destroem mutuamente, podem talvez assentar a sua constituição n'um mesmo nucleó primordial, sendo as diferenças de acção a resultante de integrações de nucleos secundarios lateraes. Seja como fôr, a componente ultima, será representada pelo esforço do organismo para a manutenção da sua harmonia, do seu admiravel equilibrio. A decifração do problema sobre a natureza das tão numerosas substancia que concorrem para a immunidade, da sua constituição intima, é uma das mais complicadas aspirações d'aquelles que estudam a immunidade, e este campo immenso, onde dia a dia se faz mais luz, é ainda hoje um campo muito cheio de sombras.

A natureza das opsoninas é uma nova complicação, um novo problema, cujo resultado é bastante vago.

e) *Modo d'acção das opsoninas.* As opsoninas são, como já vimos, substancias que excitam a phagocytose tornando-a mais accentuada; executam esta acção preparando as bacterias, de maneira a torna-las aptas para a incorporação, facilitando assim o papel inclussor do phagocyto.

Wright foi buscar o termo á lingua grega, significando elle um processo de preparação. A opsonina do sôro quando se encontra perante leucocytos e bacterias, é sobre estas que exerce a sua acção, preparando-as para serem phagocytadas, não sendo ainda conhecido o processo pelo qual ella exerce essa acção; não é porém exagero, ou phantasia, pensar que ella se traduza por alguma combinação chimica en-

tre opsonina e substancia bacteriana. Que as opsoninas teem um accentuado poder de fixação sobre corpos extranhos, é um facto que a experiencia confirma e que essa fixação se faz sobre as bacterias quando no meio experimental entram as trez substancias, opsonina, globulos brancos e bacterias, é tambem um facto verificado pela experiencia. Assim determinando o poder opsonino de um sôro e juntando-lhe depois corpos extranhos como grãos de carmim, carvão vegetal, farinha, verifica se, passado algum tempo, que o poder opsonino do sôro baixou, de forma bem sensivel. Quando nós, para provarmos que a opsonina se encontra ligada ás albuminas do sôro, a precipitamos pela solução saturada de $\text{SO}^4(\text{Az H}^4)^2$, vemos que o liquido filtrado não contem a mesma quantidade de opsonina, o que é a consequencia de parte d'ella se fixar no filtro. Estas experiencias demonstram bem a tendencia fixadora d'essa substancia e outras experiencias, bem mais numerosas, provam tambem que é sobre as bacterias, e não sobre os phagocytos, que se faz a fixação quando ella se encontra em face d'esses dois elementos ; ao mesmo tempo que provam esta asserção, demonstram que o seu papel é bem differente do attribuido por Metchnikoff ás suas estimulinas que para o auctor se resumia em estimulo levado aos phagocytos.

As experiencias de Wright são concludentes sob este ponto de vista. Primeiro aquece sôro a 60° durante algum tempo e colloca-o em contacto com leucocytos e bacterias, depois de aquecido ; verifica que não ha hyperphagocytismo ; é que a opsonina foi destruida. Depois repete a experiencia, mas antes de aquecer o sôro, põe-o em contacto só com as bacterias, precipita estas pela centrifugação, aquece então o sôro e verifica que, após a junção de leucocytos, ha hyperactividade phagocytaria.

Parecem-nos bem concludentes estas experiencias, sobretudo a segunda, em que se vê o mais claramente possível a impossibilidade de acção sobre o phagocyto, pois quando se junta este, o sôro já estava inactivado pelo aquecimento ; a bacteria é que tinha sido sensibilizada, preparada pela opsonina quando elle estabeleceu o contacto entre sôro e bacterias.

Relatamos ainda uma experiencia de Neufeld egualmente concludente e não faremos mais referencias por as julgarmos dispensaveis.

Neufeld junta leucocyto frescos a um sôro vaccinico anti-streptococcico averiguadamente efficaz, aquece a mistura durante 20 minutos a uma temperatura de 55°, isola os leucocyto por centrifugação e junta-lhe sôro normal e streptococcus virulentos ; a phagocytose é ligeira.

Neufeld modifica a experiencia collocando primeiro os streptococcus em contacto com o sôro vaccinico efficaz, depois isola-os por centrifugação, lava-os com soluto de Cl Na e acaba por os collocar em face de leucocyto frescos em sôro normal ; a phagocytose é activa.

Se a acção da opsonina se exercesse sobre os leucocyto, deveriamos ter na primeira experiencia de Neufeld, uma activa phagocytose, porque tinhamos um sôro poderoso a sensibilizar as cellulas. Tal se não deu na primeira mas deu-se na segunda, porque n'esta o contacto, do sôro poderoso, fez-se com a bacteria que foi então preparada para a intensa phagocytose que se observou e que de maneira nenhuma poderá ser attribuida á opsonina do sôro normal. Sobejamente provada fica a affirmação de Wright de que a acção da opsonina incide sobre a bacteria e não sobre o phagocyto e tão evidente é essa affirmação que o proprio Levaditi, que segue as ideias exclusivistas de

Metchnikoff, a admitiu, afirmando que era um argumento importante contra a ideia das estimulinas serem os factores determinantes do accrescimo da phagocytose, consideradas como elles as consideravam, isto é, como productos leucocytarios e exercendo a sua acção sobre os leucocytos.

Fica assim demonstrado o modo de acção da opsonina mas fica no escuro o mechanismo intimo d'essa acção.

Wright, por essas substancias prepararem as bacterias, chamou-lhes *opsoninas* e Neufeld, por ellas exercerem a sua acção sobre os microorganismos, chamou-lhes *bacteriotropinas*.

CAPITULO III

Technica opsonica — Phagocytose experimental

O poder phagocytario d'um sôro é medido pelo numero de bacterias que são incluídas nos leucocytos polymorphos, pela acção d'esse sôro. Feita a inclusão bacteriana por meio da acção de um sôro, conta-se um determinado unmero de phagocytos e o numero total de bacterias que elles phagocytaram, divide-se depois o numero de bacterias pelo dos leucocytos e o numero obtido representa o poder phagocytario relativo do sôro empregado. Procedendo de forma identica çom um sôro de individuo normal, nós obtemos numeros que, comparados, nos levam a conclusões importantes, entre as quaes é a mais importante, a da determinação do indice opsonico, que afinal não é mais do que a relação entre os dois numeros obtidos, quando empregamos sôro de individuo normal e sôro de individuo doente.

Não é o poder phagocytario dos leucocytos que nós determinamos mas sim o poder inclusor do sôro com que experimentamos. Contar o numero de bacterias que foram phagocytadas pela acção de um sôro doente e as incluídas por um sôro normal, affigura-se-nos ser, o avaliar da intensidade com que se exerceu a acção

do sôro empregado, medir o poder incluser d'esse sôro, tanto mais que os leucocyts em ambos os casos são sempre os mesmos, variando apenas os sôros empregados. A afirmação que vimos de fazer conduz-nos a um facto de interpretação delicada, como é o de saber se as opsoninás actuam sobre o leucocyto ou sobre a bacteria, questão de que já tratámos. Ainda hoje as opiniões estão divididas mas Wright, e com elle muitos auctores, affirma ser sobre a bacteria que a acção se exerce, e sendo realmente assim, mais fortemente se justifica a nossa afirmação de que é poder incluser do sôro que se mede na phagocytose experimental e não do leucocyto.

Seja porém como fôr, para a inclusão experimental nós carecemos do instrumental seguinte :

- I. Globulos brancos lavados.
- II. Emulsão bacteriana.
- III. Sôro sanguineo de individuo normal ou doente.

a) *Corpusculos lavados* — Obtido o sangue por picada da face lateral do dedo, na altura da phalangeta, região onde a sensibilidade é menor, é elle recebido em um tubo de centífuga pequeno, cheio até dois terços com uma solução de citrato de sodio em sôro physiologico a 0,85% que evita a coagulação. A expressão do dedo deve ser delicadamente feita e do mesmo modo a mistura do sangue e solução anti-coagulante, para se evitar a desagregação dos leucocyts, pois são cellulas que com muita facilidade se destroem. Por esse motivo a agitação do tubo de centrifuga nunca deve ser brusca mas sim realizar-se por movimentos lentos de inclinação.

No manejo do instrumental para o estudo da inclusão bacteriana não é superfluo o conselho d'um exagero de cuidado pois a technica da inclusão é de

uma grande delicadeza, carecendo por isso mesmo de uma grande attenção nos seus detalhes os mais insignificantes.

Bem misturado o sangue e soluto de citrato de sodio, procede-se á sua centrifugação em qualquer centrífuga, sendo preferivel a de agua. Esta primeira centrifugação dura 10' a 15'. Os elementos solidos do sangue depositam-se no fundo do tubo e a camada liquida formada de sôro e solução de citrato de sodio é aspirada por um chupeta Pasteur, á qual se adapta, na sua extremida larga, uma tetina de cautchu. Esvaziado o liquido, o mais completamente possivel, por essa aspiração, é elle substituido por soluto de ClNa a 0,85 % e o sangue novamente agitado com toda a doçura.

Nova centrifugação de 15 minutos, nova aspiração do liquido resultante e sua substituição pelo soluto de ClNa e, depois de uma última centrifugação, nós temos os leucocyts preparados e aptos a serem empregados. Para esse fim colloca-se o tubo em um plano inclinado onde fica em repouso durante meia hora, depois de termos aspirado todo o liquido que no tubo havia.

E' bem distincto o aspecto da camada mais superficial do tubo, é n'ella que se encontram os leucocyts em bastante quantidade. E' uma camada com um aspeto cremoso onde ha leucocyts misturados com algumas hematias.

Wright propõe destruir essas hematias com algumas gottas de acido trichloroacetico mas nós nunca o fizemos pois não observámos nenhuma vantagem em assim proceder, antes as hematias nos ajudam posteriormente á focagem microscopica, além de que o acido poderia influir nos leucocyts preparados. Ainda ha quem proponha o aspirar de toda a camada cremosa

do tubo, e o deposita-la em um vidro de relogio para o emprego ulterior. Fizemos sempre a aspiração directa do tubo, e o transporte dos leucocytyos para o vidro do relogio affigura-se-nos ser mais uma desnecessaria complicação d'esta, não facil, technica.

Uma quantidade relativamente grande de sangue (30 gottas), uma centrifugação demorada do liquido, uma aspiração completa do que foi empregado na ultima lavagem e o repouso do tubo em plano inclinado durante meia hora, são condições que levam á formação de uma apreciavel camada cremosa onde abundam os leucocytyos que, com facilidade, são d'alli aspirados.

Com estes leucocytyos, trabalhámos nós, quasi sempre, immediatamente depois da sua preparação, mas, dizem Wright, Doulgas, Milhit e outros que podem conservar-se durante horas n'esta situação sem que se manifeste influencia na inclusão que ulteriormente se faça. Vinte e quatro horas não parece ser ainda tempo sufficiente para uma apreciavel modificação n'essa inclusão.

b) *Emulsão bacteriana* — Quando nós pretendemos medir o poder opsonico d'um sôro, temos, para esse fim de empregar uma emulsão de bacterias que deve satisfazer a um certo numero de condições. A emulsão deve ser preparada com bacterias d'uma mesma cultura, bacterias com o mesmo tempo de cultura e cultura feita no mesmo meio. A idade da bacteria tem importancia grande, podendo estabelecer-se que para os coccus que não tomam o Gram e todas as bacterias coliformes, a cultura não deve ter mais de 4 a 6 horas; para todos os outros microorganismos a duração deve ser de 24 horas.

Quando trabalhámos com culturas puras de coli-

bacillo, empregámos primeiro bacterias com 24 horas e obtivemos não só inclusões excassas mas encontramos sobretudo grandes variações na morphologia das bacterias. Umás espheroladas, outras curtas e extremamente grossas, outras compridas, demasiadamente compridas, a par de uma phagocytose pouco consideravel, foram as observações que fizemos quando o tempo da cultura foi apenas de 5 a 6 horas. Estas mesmas conclusões se estendem ao bacillo d'Eberth e aos coccus que não tomam o Gram.

A concentração da emulsão não deve ser exagerada para não dificultar posteriormente a contagem das bacterias incluídas e por não haver a mais pequena vantagem em concentrar demasiadamente a emulsão.

Bem sabemos que o poder opsonico de um sôro é uma função da concentração do liquido bacteriano empregado e n'estas condições quanto mais bacterias existirem no liquido, tanto mais intensa é a phagocytose, tanto maior é o numero de bacterias incluídas. Mas que importa isso ?

Evidentemente nós não vamos estudar um sôro isolado, para medir o seu poder opsonico, fazemo-lo sempre em comparação com a intensidade inclusora de um sôro dado, do sôro normal, e a relação entre as duas medições é que para nós tem valor. N'estas circumstancias que nos importa o grau de concentração ?

Só importa pela facilidade ou dificuldade da contagem que depende da fraca ou forte concentração bacteriana. Querendo medir o poder opsonico do sôro de um typhoso, nós fazemos uma emulsão de bacillo typhico com uma concentração casual e provocamos a phagocytose com esse sôro. Contamos as bacterias incluídas em um certo numero de phagocytos, e dividindo os dois numeros, temos a media de bacterias por

leucocytes, phagocytadas pela acção do sôro typhoso. E' um valor, é um termo que isoladamente nada significa. Procedendo da mesma forma, com a mesma cultura mas com um sôro normal, obtemos um outro numero e da comparação dos dois tiramos então conclusões. Se o sôro de um typhoso A inclue 3 bacterias, se o de um outro B inclue 5 e se um sôro normal inclue 1, eu tenho conclusões não só sobre os dois sôros typhosos considerados entre si, como tambem, considerados em relação ao sôro normal. A concentração da emulsão é n'este caso um factor commum e por isso absolutamente secundario, pois se o sôro normal inclue 1 e o do typhoso B, 5, para dada concentração para uma concentração mais forte, o normal incluirá por exemplo 3 e n'este caso a inclusão do typhoso B será 15. Os nmeros differem mas a relação é que nos importa e essa relação que não varia é o indice opsonico, independente como se vê de na emulsão haver 7000, 10000 ou 20000 milhões de bacterias por centimetro cubico. Ainda para o caso do estudo, demorado de um doente, para o qual tenhamos de fazer numerosas e espaçadas inclusões, ainda n'este caso, o grau de concentração nada influe porque é sempre a relação que nós apreciamos e não o valor isolado de cada um dos sôros.

De resto, com a technica que habitualmente empregamos e que é a mais geralmente seguida, as emulsões empregadas não apresentam variações muito extensas relativamente á sua concentração. Uma vez obtida a cultura recente da bacteria, tiramos com uma ansa de platina um fragmento de cultura que emulsionamos na parede de um tubo d'ensaio, no qual se deitam precisamente cinco centimetros cubicos de soluto de Cl Na a 0,85%.

Uma pequena quantidade de coccus é sufficiente

para tornar o liquido opalescente em poucos instantes e é pelo grau d'esta opalescência que avaliamos o grau de concentração. N'uma boa emulsão de coccus a turvação deve ser ligeira e quando assim succeda, podemos affoitamente empregar essa cultura. O mesmo se dá com as emulsões bacillares que não opalescem o liquido e apenas o turvam. E' fundamental o evitar a formação de grumos, o que se obtem fazendo com cuidado a emulsão, na parede do tubo.

O bacillo de Koch, é sob o ponto de vista da emulsão, aquelle que mais difficuldade apresenta para uma relativamente perfeita homogeneisação e esta difficuldade resulta da grande tendencia que elle tem para formar grumos.

Nas nossas experiencias empregámos culturas homogeneas de tuberculose aviaria, bovina e humana que nos foram enviadas pelo Instituto Pasteur de Paris, mas nem sempre é facil obter essas culturas, e no mercado, o que vulgarmente encontramos são os bacillos incorporados em massas solidas que depois temos de preparar para fazermos a emulsão. De resto mesmo com as culturas homogeneas é difficil evitar a formação de grumos e só com muito cuidado e paciencia os evitaremos.

Quando temos de trabalhar com massas solidas, começamos por destacar de bloco um fragmento pequeno que é repetidas vezes lavado com agua distillada e secco com papel de filtro. Esse fragmento lavado e secco é então triturado, em um pequeno almofariz de agata, por um espaço de tempo nunca inferior a duas horas. A trituração é feita a secco, no seu inicio, acabando por se lhe juntar, gotta a gotta, uma solução de Cl Na a 1,5 % que é o titulo da solução em que tem de ser feita a emulsão.

Com esta technica obtem-se uma pasta, um creme

e por ultimo uma emulsão grossa que se deita em um tubo de ensaio afilado em uma das extremidades, e com a outra fechada á lampada. Agita-se bem o tubo durante um certo tempo e depois inverte-se de modo a que alguns grumos que se tenham formado caiam na parte afilada do tubo que mais tarde se quebra com o fim de eliminar esses grumos.

A emulsão assim obtida, ainda não está apta para ser empregada e para o poder ser, centrifuga-se uma pequena quantidade d'ella até que as camadas superiores fiquem levemente turvas. Aspiram-se estas camadas com uma chupeta, misturam-se intimamente e assim obtemos uma emulsão sem grumos e sem uma concentração exagerada. Para avaliarmos se realmente a emulsão preparada está em boas condições, é sempre conveniente, antes do seu emprego, fazermos uma preparação em lamina que se cõra pelo methodo ordinario.

Mac Farland de Philadelphia imaginou um instrumento para avaliar da riqueza d'uma emulsão bacteriana — nephelometro.

Consta de dois tubos, um tubo testemunha, com uma emulsão de $So^4 Ba$, e o outro com a emulsão microbiana, cuja concentração se augmenta ou diminue até os dois tubos apresentarem o mesmo aspecto. E' um instrumento absolutamente dispensavel. A simples inspecção do aspecto da emulsão é sufficiente para avaliarmos a sua riqueza microbiana. Para terminarmos com o capitulo das emulsões bacterianas, seja-nos permittido um conselho áquelles que iniciam os seus trabalhos sobre inclusões microbianas. Tal conselho é o de trabalharem com *staphylococcus aureus* que não só permittem uma grande facilidade de emulsão, como tambem dão inclusões muito perfeitas e bonitas.

Temos algumas preparações n'estas condições e al-

gumas vezes nos aconteceu, ao contarmos os staphylococcus englobados, o contarmos como staphylococcus uma pequena granulação com o mesmo aspecto da bacteria mas que mais tarde vimos ser um fragmento do nucleo, preso a um dos restantes fragmentos por um filamento extremamente tenue. Não sabemos se esse fragmento de nucleo tem alguma significação particular e feriu-nos a sua existencia, por nunca o termos observado (que nos lembre pelo menos) nos muitos milhares de leucocytos polymorphos que pelos nossos olhos teem passado, nas preparações de sangue secco quando determinamos formulas leucocytarias. Observámos o facto e por essa razão mencionamo-l'õ.

Resta-nos agora, para terminarmos com a descripção dos elementos que são necessarios na technica da opsonisação, o referirmo-nos ao sôro inclusor.

c) *Sôro normal ou pathologico* — Wright para obter o sôro procede da fórma seguinte: com uma chupeta especial—capsula de Wright—faz uma picada na phalangeta de um dedo e com essa chupeta aspira o sangue que escorre da ferida e cuja quantidade podemos fazer variar á nossa vontade, tendo para isso o cuidado de previamente passar uma atadura na raiz do dedo e de fazer movimentos de circumducção com o membro que se feriu. Procedendo assim, podemos, com a simples picada da capsula de Wright, ou com qualquer lanceta de sangue, obter uma quantidade d'este que póde medir-se por alguns centimetros cubicos.

Para o caso do sôro uma pequena quantidade chega mas já não é o mesmo para o caso dos globulos brancos em que então precisamos de uma porção mais consideravel de sangue.

A capsula de Wright prepara-se com extrema fa-

cilidade e é extremamente commoda. Um tubo de vidro com o diametro de 4 a 5^{mm} é afilado finamente n'uma das suas extremidades e fechado n'esse ponto. A outra extremidade é egualmente afilada mas no momento em que se afila começa-se por lhe dar uma incurvação de modo a o ramo afilado ficar paralelo ao ramo grosso. Obtida esta incurvação e emquanto o tubo está ainda quente e malleavel puxa-se o ramo afilado para fóra, fecha-se esta extremidade e temos constituída a capsula de Wright.

Para obter o sôro pica-se o dedo com uma das extremidades afiladas, de preferencia a recta que previamente se tem quebrado para tornar mais facil a penetração e a outra extremidade afilada e curva adapta-se á gotta de sangue que aflora na ferida. Este ramo curvo enche-se rapidamente e o sangue começa a entrar na parte larga do tubo.

A capillaridade e a acção da gravidade, fazem com que o sangue seja aspirado na capsula de Wright.

Um centimetro, ou meio centimetro cubico de sangue, basta para nos dar uma quantidade de sôro sufficiente para algumas inclusões.

Entrado o sangue dentro da capsula, aquece-se cuidadosamente o ar que enche a parte larga e o filamento recto, de modo a expulsa-lo e fecha-se de novo esta extremidade á lampada. O ar aquecido ao arrefecer retrahese e o sangue é aspirado do filamento curvo deixando este ramo livre, cuja extremidade é por seu turno fechada á lampada. N'estas condições deixa-se em repouso a capsula, para se dar a separação do sôro, ou facilita se essa separação mettendo a capsula na estufa de 37°.

E' indifferente obter sangue por picada da pelle ou directamente d'uma veia, o sôro tem o mesmo poder opsonisante mas já apresenta variações nas differen-

tes horas do dia, razão que nos levou a colher o nosso proprio sangue sensivelmente á mesma hora com o fim de obtermos o sôro normal. Foi quasi sempre em relação á opsonisação determinada pelo nosso sôro que medimos o poder opsonico dos sôros de individuos doentes e que estabelecemos indices opsonicos.

Comprehende-se que a escolha de um sôro normal tenha importancia grande na determinação do indice opsonico quando pretendemos fazer therapeutica, em harmonia com as indicações dadas por essa determinação. Ao estudarmos o indice opsonico de um individuo doente, vamos procurar o poder opsonico do seu sôro e compara-lo com o poder opsonico do sôro de um individuo normal, com um sôro normal. D'essa comparação sae o indice opsonico.

Mas, se o individuo que reputamos normal o não fôr, ainda que oxtensivamente o não manifeste, a nossa determinação resulta, evidentemente, errada, pois um dos membros da relação estabelecida era um factor errado. Esta affirmativa é tanto mais certa, quanta certa é a possibilidade de um individuo poder ser o portador de uma doença, sem apresentar o mais ligeiro symptoma da sua existencia. Innumeras vezes isto succede na tuberculose e sendo assim, bem claramente se comprehende quão viavel póde ser a hypothese de um erro, na determinação de um indice opsonico, em que tenha entrado como factor o sôro de um individuo n'estas condições.

A importancia d'este erro affigura-se-nos ser grande, sobretudo quando estabelecemos indices com fins therapeuticos. O mesmo se não dá quando nos cingimos a simples trabalhos de laboratorio, pois n'esta hypothese o erro commettido não influe poderosamente na conclusão a tirar.

A escolha de um sôro normal é pois um problema,

um factor importante na technica opsonica e por assim ser, é que se tem pretendido affastar do caminho, a hypothese do emprego de um sôro de individuo doente, clinicamente julgado normal, empregando para esse fim um dos dois processos seguintes :

I. Procura-se obter sôro de dois, trez ou mais individuos clinicamente reputados normaes. Determina-se o poder inclusor de cada um dos sôros, para a bacteria que temos em estudo. Assim obtemos dois, trez ou mais numeros que representam o poder opsonico de cada um dos sôros ; a media dos numeros obtidos representará o poder inclusor médio e é esse numero que empregamos como o normal. A quantidade de ensaios que este proceder requer, parece-nos sufficiente para pôr o processo de parte.

II. Outro processo para obter o numero representativo do poder opsonico do sôro normal, consiste em obter sôro de 4, 5 ou mais individuos clinicamente normaes, misturar esses sôros e ensaiar a inclusão com a mistura obtida. A termos de empregar algum dos dois processos para obter o chamado pool-sera, sôro contrôle, sôro padrão, preferiríamos o segundo mas só no caso de pretendermos fazer therapeutica opsonica. Para os ensaios sobre inclusões bacterianas, feitas em laboratorios, pareceu-nos sufficiente-mente normal o nosso sôro e bastas vezes o empregámos.

Obtido o sôro normal ou pathologico pelo processo de Wright, ou por qualquer outro, nós ficamos possuindo os trez elementos indispensaveis para a inclusão bacteriana, sôro, emulsão de bacterias e corpusculos lavados.

d) *Inclusão das bacterias-phagocytose experimental*
— N'esta altura entramos n'um delicado capitulo de

technica e se em todo o caminhar d'este trabalho experimental, se tornam necessarios o maior cuidado e attenção, n'esta altura, esse cuidado tem de augmentar, pois d'este tramite depende consideravelmente o bom ou mau exito de uma inclusão microbiana.

Bom é frizar ainda que nos ensaios sobre technica opsónica devemos empregar material esterilizado, sempre que isso nos seja possivel.

A uma chupeta de Pasteur que preparámos antecipadamente e que antecipadamente esterilizámos, adaptamos uma tetina de cautchu, na extremidade mais larga, e com uma lima, cortamos a extremidade da porção delgada.

N'esta porção afilada marcamos, com um lapis de escrever em vidro, um ponto, collocado á distancia approximada de 2^{mm} a partir da extremidade afilada da chupeta. E' até esse ponto que temos de aspirar successivamente leucocytes lavados, emulsão microbiana e sôo a estudar. Para fazermos essa aspiração começamos por comprimir a tetina o mais possivel com o pollegar e indicador esquerdos e adaptamos a outra extremidade á camada cremosa do tubo de centrifuga, que contém os corpusculos lavados, tendo cuidado de não penetrar na camada em que se encontram as hematias. Aliviando ligeira e gradualmente a pressão dos nossos dedos, deixamos entrar para o tubo corpusculos lavados até que a columna tenha attingido o ponto marcado a lapis. Retiramos então a chupeta e continuando a diminuir a pressão dos nossos dedos, deixamos entrar uma columna d'ar precisamente igual á columna de corpusculos lavados, o que se obtem quando a extremidade inferior d'esta ultima, chega ao nivel do ponto. N'esta altura adaptamos a extremidade da chupeta á emulsão deixando subir o liquido até ao ponto. Fica-nos assim a massa de cor-

pusculos e a emulsão bacteriana separadas por uma bolha d'ar. Deixamos então subir a emulsão, para entrar na chupeta nova columna d'ar, de volume igual á primeira e acabamos por aspirar o sôro em estudo e ainda d'esta vez a ascensão do liquido pára logo que este tenha attingido o ponto inicialmente marcado. Aliviando ainda um pouco a pressão dos nossos dedos, as trez columnas vão subindo no ramo estreito da chupeta até a um ponto em que contactam e se misturam. Paramos então com a aspiração e um augmento de pressão na tetina determina a descida da columna unica que é assim expulsa para dentro de um godé de porcellana. Repetimos assim umas trez ou quatro vezes a aspiração e expulsão, para obtermos uma mistura bem intima de globulos, bacterias e sôro, e n'uma ultima aspiração logo que nos fique livre a extremidade da chupeta, fechamo-la na chamma do bico de Bunzen e collocamo-la horizontal na estufa de 37°.

Wright imaginou uma pequena estufa especial (opsosner) com muitos orificios n'uma das paredes, em cada um dos quaes entra uma chupeta convenientemente preparada.

A estufa de Wright é util quando se preparam muitas chupetas, trabalhando com poucas qualquer estufa de 37°, constantes, póde servir.

O bom exito de uma inclusão depende em grande parte d'este tempo da technica. Se fizermos variações bruscas de pressão na tetina, vamos produzir ascensões e descensões excessivamente rapidas das columnas obtidas e d'ahi a desagregação dos phagocytos e uma má inclusão. Os movimentos empregados devem ser feitos brandamente.

Se a mistura não for bem intima, obteremos más preparações, massas de bacillos para um lado, leuco-

cytos amontoados para outro, uma distribuição irregular e conseqüentemente uma má inclusão.

Quando se aspira a columna final deve haver cuidado em que não fiquem interpostas numerosas bolhas d'ar que difficultando os contactos, egualmente difficultam uma boa inclusão.

Quando as tres gottas chegam ao contacto e se fundem, deve haver o cuidado de não deixar subir a massa consideravelmente para que não fique grande quantidade de preparação adherente á porção larga da chupeta. Emfim é necessario um grande cuidado n'este tempo da technica.

Uma das principaes difficultades n'esta altura é a da gradação da pressão feita com os nossos dedos. A falta de um plano resistente, de encontro ao qual possamos graduar a pressão, faz com que se manifestem oscillações nas columnas dos liquidos e ar, difficultando assim o fim que temos em vista, tal o de obter volumes precisamente eguaes de cada substancia empregada.

Um pequeno truc de technica, obvia completamente a esse inconveniente. Não o temos visto mencionado, mas é natural que os outros o empreguem, pois nos parece totalmente impossivel alcançar um resultado satisfatorio sem o seu emprego.

Consiste este truc em graduarmos a pressão de encontro ao tubo da chupeta apanhando, para esse fim, o tubo com metade dos nossos dedos e a tetina com a outra metade. Procedendo assim conseguimos aspirar sómente o volume de liquido que pretendemos e não temos oscillações que difficultem esse resultado.

Preparadas as nossas chupetas e collocadas na estufa a 37°, permanecem ahi durante um tempo que para nós foi variado. Quando trabalhámos com staphylococcus e bacterias coliformes empregamos 10' de

estufa. Para o bacillo de Koch o tempo de permanencia na estufa foi de 15'. Este tempo é sufficiente para a realização da phagocytose experimental mas no caso do bacillo de Koch podemos estender a 20' a permanencia, sem prejuizo da inclusão, antes com vantagem. Para o coli-bacillo e bacillo d'Ebert não devemos dispensar mais de 15 minutos se quizermos evitar a espherolação das bacterias.

Passados os 10 a 15' de estufa, tiramos as chuquetas, adaptamos de novo a tetina e expulsamos o conteúdo para um godé, de onde o aspiramos novamente, repetindo duas ou trez vezes a operação de modo a obtermos uma mistura bem intima.

e) *Preparações microscopicas* — Procedemos então ás preparações em laminas bem lavadas em agua, alcool e ether e bem seccas. Depois de deixarmos cair uma gotta na lamina, perto de uma das extremidades, prendemol-a com uma lamella, estendendo a depois á maneira de uma gotta de sangue. A gotta caminha arrastada pela lamella, atraz e por debaixo d'esta. A inclinação da lamella deve ser tal que obtenhamos uma camada de preparação com uma espessura regular para com mais facilidade encontrarmos leucocytos.

Feita a preparação, secca-se esta rapidamente, fixa-se e cora-se. Na seccagem, fixação e coloração póde seguir-se sempre o mesmo processo para todas as bacterias á excepção do bacillo de Koch; a fixação e coloração é feita n'este caso por processo differente que em breve descreveremos.

Nos nossos ensaios empregámos para a coloração differentes anilinas azues que habitualmente empregamos, na coloração do sangue e adoptamos o mesmo processo como para o sangue. Esses azues são o azul

de Leishman, azul de Jenner e azul de Reuter. Todos elles dão colorações muito bonitas mas se nos fosse permitida uma preferencia dal-a-hiamos ao azul de Reuter. A preparação d'estas tintas é muito facil e teem ellas ainda a vantagem de dispensarem a fixação, pois esta é feita pelo dissolvente. A sua composição é a seguinte :

Azul de Leishman	}	Pó de Leishman 0 ^{gr.} ,5
		Alcool methylico 100 ^{gr.}
Azul de Jenner	}	Pó de Jenner 0 ^{gr.} ,5
		Alcool methylico 100 ^{gr.}
Azul de Reuter	}	Pó de Reuter 0 ^{gr.} ,15
		Alcool methylico 100 ^{gr.}

A coloração póde ainda ser feita com thionina phenicada (thionina 0,25 %, acido phenico 1,0 %), azul de toluidina, etc. Quando se emprega qualquer d'estas ultimas anilinas é necessaria a fixação que póde ser feita com alcool-ether (50 % de cada) ou com soluto saturado de bicholoreto de Hg, ou ainda pelo calor, etc.

Nós damos a preferencia a qualquer dos azues citados que dando esplendidas colorações dispensam a fixação preliminar.

Sobre a preparação secca deitam-se 15 a 20 gottas de azul de Reuter que se deixa actuar durante um minuto. Passado este tempo juntam-se 30 ou 40 gottas de agua distillada, dobro do numero de gottas de tinta empregada. Mistura-se a agua com a tinta soprando a preparação com um tubo de vidro afilado e deixa-se em repouso durante 5 minutos. Lava-se com agua distillada corrente e mergulha-se a preparação em uma tina com o mesmo liquido, onde repousa

um minuto. Secca-se depois com um papel de filtro e calor brando e monta-se. A preparação deve ficar com uma côr rosada, não muito carregada, para que se possa com facilidade observar os phagocytos e as bacterias incluídas.

Para o bacillo da tuberculose os tramites para a coloração são um pouco differentes do processo que acabamos de descrever. Em primeiro logar a fixação é feita cobrindo completamente a preparação com um soluto saturado de bichloreto de mercurio que se deixa em contacto durante 3'. Depois lava-se a preparação com agua distillada e cora-se com a fuchsina de Ziel Neelsen :

Fuchsina (rubrina)	10 gr.
Alcool 96°	100 gr.
Agua phenica a 5 %	1000 gr.

Esta coloração é feita como nos exames das expectorações em que se pretende a pesquisa do b. de Koch. Assim coberta a preparação com fuchsina leva-se a lamina para uma estufa secca aquecida, e deixa-se permanecer ahi até que comece o apparecimento de vapores. Deve haver cuidado em não deixar evaporar a tinta completamente para não estragar a preparação e não deixa de ser conveniente a permanencia na estufa, algum tempo ainda depois do apparecimento dos primeiros vapores. Coráda com a fuchsina é lavada com agua corrente e descorada com SO^4H^2 a 2,5 %.

N'esta altura aconselham, Wright e outros, o fazermos a destruição da hematias pelo acido acetico a 4 %. Poucas vezes o fizemos e não encontramos vantagem n'essa forma de proceder. Descórada a preparação com SO^4H^2 recóra-se com azul de methyla, secca-se e monta se.

e) *Contagem das bacterias e phagocytos* — Montada a preparação e focada com lente de imersão, começamos a pesquisa dos phagocytos. E' nas orlas das preparações que elles se encontram em maior abundancia, não sendo porém boa a preparação onde elles estejam amontoados.

Succede algumas vezes os leucocytos estalarem, desagregarem-se, o que é naturalmente consequencia de uma technica pouco cuidada, e no meio dos fragmentos observarem-se bacterias as quaes nós ficamos sem saber se foram ou não phagocytadas. A boa technica n'estes casos é não contarmos esses polymorphos e essas bacterias. Outras vezes abundam polymorphos com a sua morphologia conservada mas com o protoplasma vacuoloso embora a technica tenha sido exemplar. N'estes vacuolos, grandes ampliações, permitem ás vezes constatar a presença de bacterias degeneradas. N'estes casos é melhor não contar estes phagocytos ou contando-os deve mencionar-se o estado especial do seu protoplasma que póde ser causa de erro. Ainda na contagem das bacterias, deve haver cuidado em não incluir senão as que estão dentro dos phagocytos, pois succede encostarem-se a elles e não estarem incluídas.

Em muitas das preparações que fizemos observámos na periphèria do leucocyto, em um ponto do seu contorno uma proeminencia extremamente tenue, pallidamente corada de azul e tendo algumas vezes bacterias incluídas. Nas primeiras observações não ligámos importancia ao caso mas a constancia da sua repetição feriu a nossa attenção e levou-n'os a relatar o facto. Hoje, depois que observámos os movimentos dos phagocytos vivos e a fórma de progressão, ao ultra-microscopio, pensamos que possa haver alguma relação entre a protuberancia observada, manifesta

mente protoplasmatica, e essa progressão. No ultra-microscopio a observação de sangue fresco mostra-nos os polymorphos em movimento. No seio da cellula phagocytaria as granulações, intensamente illuminadas, estão animadas de movimentos muito rapidos. N'um dado momento na periferia da cellula fórma-se uma proeminencia, com aspecto mamillar, e cheia das mesmas granulações. Talvez que esta protuberancia do leucocyto seja primeiro protoplasmatica e que para ella se desloquem posteriormente as granulações e que tenha sido no primeiro estado que as tenhamos apanhado ao seccar as nossas preparações. A constatação do facto é simples mas a sua significação, se alguma tem, é que não conhecemos sendo comprehensivel a nossa ignorancia perante uma cellula que certamente é das mais importantes e complexas do organismo.

Percorrendo a preparação junto das orlas encontramos ahi em maior quantidade os leucocytos polymorphos, cujo numero vamos notando no nosso caderno ao mesmo tempo que mencionamos as bacterias incluídas. E' de boa regra fazermos pelo menos duas laminas com a mesma preparação e contarmos 50 phagocytos em cada lamina. Isto porém não é absolutamente indispensavel e a contagem de 50 polymorphos é sufficiente na maioria dos casos.

Quando succeda encontrarmos leucocytos com os quaes se não deu phagocytose a nossa conducta deve ser a de contar esse phagocyto (phag. 1, bact. 0) mas a nossa contagem deve então ser maior porque a ausencia de bacterias n'esses leucocytos está a indicar que a mistura não ficou perfeita, o que bem facil é acontecer. Algumas vezes manifesta-se uma grande desigualdade na repartição das bacterias e assim ao passo que encontramos globulos com inclu-

sões consideráveis de bacterias, observamos outros em que a inclusão é representada por uma quantidade minima, 1 e 2 bacterias a par de 12, 13 e mais. N'este caso a contagem deve ser feita em trez laminas, 50 phagocytos em cada.

D'esta forma, sem accrescimo de difficuldade, obtemos um resultado mais proximo da verdade.

Na contagem das bacterias não se encontra, por via de regra, difficuldade; a unica que encontrámos foi a da espherolação quando faziamos contagem de bacillos, e essa foi por vezes bastante grande, insuperavel mesmo. Os phagocytos depois de incorporadas as bacterias modificam a morphologia d'ellas, acabando por as reduzir a granulações, constituindo este facto o phenomeno da espherolação. Quer a espherolação seja consequencia d'uma acção directa do leucocyto sobre a bacteria, quer ella seja o resultado de uma falta de adaptação do microorganismo no meio novo em que se encontra arrastando essa falta a modificação da morphologia bacteriana, o facto é que, sobretudo após um contacto prolongado de bacteria e phagocyto, aquella tomando a forma espherica manifestamente vem complicar a contagem. Esta complicação é grande e póde mesmo ser causa de erro quando trabalhamos com formas bacilares porque pensando em imperfeições da preparação, em borrões de tinta, em fragmentos de nucleo, podemos não contar a bacteria e portanto errar. A' parte esta difficuldade, e outra nos não ocorre relativa á contagem de bacterias, faz-se esta em regra com relativa facilidade.

As phagocytoses muito consideráveis difficultam a numeração mas esta difficuldade é facilmente removida empregando o mesmo sôro mas diluido em solução de ClNa a 0,5 %.

Feita a contagem de 50 polymorphos e das bacterias incluidas pela acção do sôro normal, contam-se outros cincoenta polymorphos e as bacterias incluidas pela acção do sôro doente.

Se no primeiro caso contarmos n bacterias, e no segundo n' teremos no primeiro caso o poder phagocytario do sôro normal e no segundo o poder phag. do sôro doente e a relação

$$\frac{n'}{n} = \frac{\text{poder phag. sôro doente}}{\text{poder phag. sôro normal}} = \text{indice opsonico.}$$

c) *Considerações geraes*—Algumas criticas se teem levantado contra a technica de Wright, mas não teem conseguido abalar o seu valor nem destruir a importancia que este novo processo tem no capitulo da therapeutica. Resumiremos as objecções feitas ao methodo opsonico, procedendo mesmo á maneira de Milhit que no seu magnifico trabalho sobre opsoninas resume em um capitulo todas as objecções, discutindo a sua importancia. A algumas já nós fizemos referencia no decorrer d'este trabalho, sobre essas pouco insistiremos. Assim o estado vacuoloso dos leucocytes tem servido de pretexto para condemnar o processo, mas relativamente a este estado já nós dissemos qual deve ser a nossa conducta que se resume ou a recommençar a experiencia, por ter havido pouco cuidado na technica empregada, ou então a mencionar esse estado particular dos leucocytes, apresentando-o como causa de erro. Este facto de maneira nenhuma pôde ser causa sufficiente para a condemnação do processo opsonico.

Nas mesmas circumstancias nos encontramos quando nas nossas preparações abundam os phagocytos estalados, o que com facilidade pôde acontecer co-

...o consequencia de uma má technica. Condemnar o processo por causa da facilidade com que podemos obter preparações imperfeitas parece-nos absurdo, corrija-se, affine-se a technica e as preparações apparecer-nos-hão boas.

A interferencia do coefficiente pessoal na avaliação dos resultados obtidos, é um argumento um pouco mais importante. Essa influencia é clara. Ha sempre um certo grau de paixão da parte d'aquelles que defendem o processo e o entusiasmo d'essa defeza póde influir na isenção com que deve ser feito o exame das inclusões bacterianas. Este mesmo coefficiente de pessoalidade se encontra em todos os outros processos laboratoriaes e difficil será encontrar alguém que d'elle não use, sem que com isso, esses processos sejam arredados, antes se aproveitam d'elles os seus bons resultados. Assim o coefficiente pessoal não é sufficiente para derrubar o novo processo.

Pretendeu-se que, em linha de conta, eram tomadas muitas bacterias que não estavam incluídas mas simplesmente sobrepostas. O caso é possível, embora não frequente mas só em casos muito especiaes se poderá dar o erro. Se a bacteria está sobreposta no phagocyto, a observação dos planos da preparação é sufficiente para a destrição, pois na inclusão, bacterias e granulações dos polymorphos, estão no mesmo plano o que se não dá na sobreposição em que se torna necessario focar as granulações, e depois focar as bacterias. A objecção das bacterias sobrepostas a falsarem o resultado das incluídas, é de somenos importancia.

A phagocytose expontanea, embora certa, não influe no resultado final, em primeiro logar porque carece de um espaço de tempo grande para poder dar uma inclusão apreciavel, sendo ainda assim minima, e depois porque representa um factor constante em ambos

os termos da nossa relação que é a parte que nos interessa. A phagocytose espontanea dá-se, não só quando empregamos o sôro normal, como quando empregamos o sôro doente. Em ambos os casos ha uma parte da inclusão que poderá ser attribuida á phagocytose espontanea, e como esta parte é a mesma, não ha variação na relação estabelecida entre a inclusão pelo sôro normal e pelo sôro doente. Sendo assim, nenhuma influencia tem no resultado final da inclusão, a phagocytose espontanea.

Outros elementos apresentados para derrubarem a technica opsonica tem excasso valor para attingir tal fim. Duração do contacto, degenerescencia dos leucocytos, attenuação do poder opsonico do sôro, são outras tantas objecções contra o processo de que estamos tratando mas nenhuma d'ellas é sufficiente para a sua condemnação.

Uma objecção que á primeira vista seria decisiva para a condemnação do processo, é a que resulta de o poder phagocytario de um sôro ser função do grau da concentração da emulsão bacteriana. A ella já fizemos referencia, ao estudarmos n'este capitulo o processo de preparação das emulsões bacterianas. Effectivamente com um mesmo sôro e emulsão de concentração variada, nós podemos obter variados valores para o poder opsonico d'esse sôro. Com o sôro do mesmo individuo, obtido em tempos differentes e com a mesma emulsão, ensaiada tambem em tempos differentes, obteremos valores diversos para o poder inclusor do sôro e isto repetir-se-ha com o sôro normal e com o sôro doente e assim, perante resultados tão variados, as nossas conclusões perderiam todo o seu valor. Quando nós queremos obter resultados comparaveis, o que estudamos não é o poder inclusor do sôro isoladamente considerado, mas sim as relações dos poderes

includores dos dois sôros, isto é, os indices opsonicos, que já não são funcções do grau de concentraçã das emulsões bacterianas, como já dissemos.

Um sôro normal pôde em um dado momento incluir 2,4 bacterias por leucocyto e algum tempo depois, como consequencia do augmento de concentraçã da emulsão, incluir 4,8 bacterias por leucocyto. Estes resultados são bastante differentes como se vê. Emquanto isto se dá com o sôro normal, o sôro doente tambem apresenta variações no valor da inclusão perante a mesma emulsão. Supponhamos que no primeiro tempo achámos 4,8 e no segundo 8,16 bacterias por leucocyto.

Teremos assim :

$$1.^{\circ} \text{ tempo} \left\{ \begin{array}{l} \text{sôro normal} = 2,4 \\ \text{sôro doente} = 4,8 \end{array} \right. \quad \text{indice opsonico} = \frac{4,8}{2,4} = 2,0$$

$$2.^{\circ} \text{ tempo} \left\{ \begin{array}{l} \text{sôro normal} = 4,8 \\ \text{sôro doente} = 8,16 \end{array} \right. \quad \text{indice opsonico} = \frac{8,16}{4,8} = 2,0$$

Os indices opsonicos não soffreram variaçã. A conclusã é a de que quando queremos comparar resultados em serie, essa comparaçã deve ser feita entre os indices opsonicos, e as emulsões empregadas para os sôros normaes devem ser as mesmas quando ensaiamos os sôros doentes.

CAPITULO IV

Influencia de varios factores no phenomeno da opsonisação

No capitulo anterior fizemos o estudo da technica da opsonisação, tendo tido ensejo de verificar que essa technica, d'uma delicadeza grande, demanda por essa mesma razão, cuidados indispensaveis, porquanto são multiplas as circumstancias que podem entrar o resultado, conduzindo-nos ao insuccesso; a alguns d'esses cuidados fizemos referencia no decorrer da descripção da technica, mas outras circumstancias existem que podem influir no phenomeno, tornando-se necessaria a sua apresentação em capitulo separado, o que nos propomos fazer.

Começaremos pelo estudo da :

a) *Influencia da quantidade de sôro* — A opsonisação da bacteria, da qual depende a phagocytose, é uma funcção dependente do estimulo da opsonina existente no sôro; ora quanto maior fôr o volume de sôro considerado, tanto mais consideravel será a quantidade de opsonina que elle encerra e por isso mais extensa a sua acção, isto é, exercer-se-ha sobre um maio

numero de bacterias, augmentando a intensidade da phagocytose.

E' um facto de singela verificacão experimental e que se repete tanto com sôro normal, como com sôro de doente, mas com algumas differenças ; assim empregando os mesmos leucocyts e a mesma emulsão e variando os volumes de sôro empregado, obteem-se poderes opsonicos que crescem, sem que esse crescimento se faça proporcionalmente ao volume de sôro. Experimentando com sôro typhico e sôro normal e empregando successivamente 1, 2, 3 vol. de sôro, obtivemos os resultados seguintes :

	{	1 vol. — p. ops. = 2,62
s. t.	{	2 vol. — p. ops. = 4,90
	{	3 vol. — p. ops. = 5,07
	{	1 vol. — p. ops. = 0,97
s. n.	{	2 vol. — p. ops. = 1,26
	{	3 vol. — p. ops. = 1,60
		s. t. = sôro typhico
		s. n. = sôro normal
		p. = poder
		ops. = opsonico

A primeira consequencia que decorre d'estes ensaios é a de que o poder opsonico depende manifestamente da quantidade de sôro empregado ; a segunda é a de que o poder opsonico não cresce paralellamente com a quantidade de sôro empregado antes tende para um limite, tanto para o sôro normal como para o sôro typhico.

Fica assim evidenciada a influencia que pode ter no phenomeno da opsonisação, a quantidade de sôro empregado e assente que, quando nós queremos obter resultados comparaveis, temos de empregar a mesma

quantidade de sôro, desideratum que sensivelmente se alcança fazendo chupetas de Pasteur, d'um mesmo tubo que se afila por aquecimento da parte media e que depois é puxado, com equal esforço, pelas suas duas extremidades. O calibre fica sensivelmente o mesmo, sendo as diferenças tão pequenas que as diferenças consequentes se tornam desprezaveis. Ainda assim quanto mais rigor fôr empregado em cada detalhe do ensaio opsonico, tanto mais rigorosa sairá a conclusão.

b) *Influencia das diluições do sôro normal ou do immuno-sôro.*—Para se verificar a influencia que a diluição do sôro exerce no phenomeno da opsonisação, empregam-se sôros normal e doente, successivamente diluidos mas sempre em egualdade de diluição, para obtermos resultados comparaveis. Ensaizando com sôro typhico e sôro normal obteve Wright os seguintes valores :

	só	p. ops. = 1,10
s. n.	dil. 1:10 —	p. ops. = 0,50
	dil. 1:20 —	p. ops. = 0,27
	dil. 1:30 —	p. ops. = 0,20
	dil. 1:50 —	p. ops. = 0,15
. t.	só	p. ops. = 1,90
	dil. 1:10 —	p. ops. = 1,10
	dil. 1:20 —	p. ops. = 0,75
	dil. 1:30 —	p. ops. = 0,70
	dil. 1:50 —	p. ops. = 0,40

D'estas experiencias tirou Wright as conclusões seguintes : as opsoninas do immuno-sôro baixam rapidamente de valor no começo da diluição, constatando-se constantemente a sua presença mesmo em di-

luções grandes ; as opsoninas do sôro normal, umas vezes baixam rapidamente, outras conservam-se, mesmo em diluições grandes, embora diminuídas. Para estas ultimas falta o caracter de constancia das primeiras. A diluição não é acompanhada de uma diminuição progressiva das opsoninas, não ha proporcionalidade entre diluição e diminuição do poder opsonico, e é por esta razão que quando estamos em presença de um sôro extremamente rico em substancia opsonica, capaz por isso de determinar uma phagocytose demasiadamente extensa, quanto ao numero de bacterias incorporadas, devemos, em vez de diluir o sôro empregado, diminuir o grau de concentração da emulsão bacteriana. Esta é a melhor technica por evitar o erro que acarretaria a diluição do sôro.

c) *Influencia da mistura de varios sôros* — E' interessante este estudo da influencia da mistura e para evidenciar este interesse socorrer-nos-hemos das experiencias de Milhit mais completas do que as nossas, pois nós apenas empregámos misturas de sôros humanos doente e normal, em partes eguaes, verificando que o poder opsonico da mistura era inferior á somma dos poderes opsonicos de cada um dos sôros. Considerados isoladamente tinhamos respectivamente: sôro typhico = 2,80 — sôro normal 1,02 ; misturando os dois sôros e incluindo bacterias pela acção da mistura, obtivemos : s. n. + s. t. = 3,16 evidentemente inferior á somma dos dois valores primeiro obtidos, embora não haja uma differença accentuada isso que por $2,80 + 1,02 = 3,82$.

E' possivel que a differença venha de uma acção impeditiva sobre as opsoninas do sôro typhico. Os resultados obtidos por Milhit decorrem das experiencias que vamos reproduzir. Milhit experimentou primeiro com mistura de sôros de animaes e depois com sôros

humanos empregando como nós, sôros typhico e sôro normal mas seguindo outra technica. Primeiro experimentou com sôro de coelho inoculado, sôro de cobaia e sôro humano normal, determinando os indices para o bacillo de Eberth, achando os seguintes valores :

sôro de coelho inoculado	— 2,70
» » cobaia	— 1,50
» » humano. normal	— 1,05

Depois mistura os sôros nas proporções seguintes :

sôro de coelho inoculado	— 6 gottas
» cobaia	— 3 gottas
» humano normal. .	— 6 gottas

Determina o indice opsonico da mistura e encontra 6,80 superior á somma do indices encontrados nas determinações separadas de cada um dos sôros. Repete a experiencia muitas vezes mas não torna a encontrar resultados analogos e por esse motivo não tira conclusões, cingindo-se a aventar a hypothese de na, experiencia citada, ter havido interferencia reactivadora da parte do sôro de cobaia e do sôro humano normal, sobre as opsoninas do immuno-sôro do coelho.

Com soros humanos doente e normal fez as experiencias que vamos mencionar : empregou sôro typhico e sôro normal com os seguintes poderes opsonicos

s. n. — p. ops.	= 1,10
s. t. — p. ops.	= 3,20

Depois misturou sôro typhico e sôro normal em proporções variadas encontrando os resultados seguintes :

1.º	{	s. n. — 9 gottas	+	+	}	p. ops. = 1,90
		s. t. — 1 gotta				
2.º	{	s. n. — 8 gottas	+	+	}	p. ops. = 2,39
		s. t. — 2 gottas				
3.º	{	s. n. — 6 gottas	+	+	}	p. ops. = 2,76
		s. t. — 4 gottas				
4.º	{	s. n. — 2 gottas	+	+	}	p. ops. = 3,02
		s. t. — 8 gottas				

Conclusão : ha um augmento progressivo do poder opsonico, proporcional ás quantidades de sôro empregado. Nas nossas experiencias encontrámos para a mistura em partes eguaes de sôro normal e soro typhico, um valor inferior á somma dos valores correspondentes de cada um dos sôros, mas o valor obtido era superior ao do sôro normal ; nas experiencias citadas de Milhit verificamos que os valores vão crescendo á medida que o volume de sôro typhico cresce tambem e na 3.ª experiencia, em que os volumes se approximam, (s. n. 6 gottas, s. t. 4 gottas) encontramos um valor (2,76) que sendo inferior á somma dos valores correspondentes dos dois sôros (1,10 + 3,20 = 4,30) é porém superior, e bastante, ao valor correspondente do sôro normal.

Parece-nos, dos resultados expostos, que nos é permittido concluir que na mistura de dois sôros, um doente, outro normal, ha sempre predominio do sôro doente, o que é perfeitamente razoavel porque o doente é o que contem maior somma de opsonina.

d (Influencia da acidez ou alcalinidade do sôro.
— Hideyo Noguchi e Opie apresentam-nos ensaios conclusões sobre a influencia em estudo, affirmando

em primeiro lugar que as opsoninas apresentam o seu maximo de acção em meio neutro e depois que a sua acção é nulla quando a alcalinidade do meio é correspondente a 1^o.6 de uma solução, vigessi-normal de soda caustica e ainda nulla quando a acidez corresponde a 0^o.8 da solução vigessi-normal de SO^4H^2 . Concluem ainda que o indice opsonico encontrado n'um sôro, não é a expressão exacta das opsoninas que elle contem, pois só o seria se o sôro fosse um meio de reacção neutra, e ainda, que as opsoninas cuja actividade é impedida por uma reacção desfavoravel do meio, recuperam toda a sua actividade logo que a reacção se torna neutra, representando esta ultima conclusão a affirmação de sensibilidade, como qualidade da substancia opsonica.

Estas affirmações parecem-nos carecer de fundamento seguro, para d'ellas podermos tirar seguras conclusões; o que nós observámos é que o sôro não apresenta variações de acidez ou alcalinidade susceptiveis de explicarem as diversas variações observadas no poder opsonico e depois, tirar conclusões de um fundamento tão pouco assente como é a reacção do sangue, parece-nos de pouco rigor scientifico. Na verdade ainda hoje tanto se discute sobre a reacção acida ou alcalina do sangue, sobre a reacção chimica d'esse meio, que impossivel é buscar conclusões sobre a influencia que na opsonisação póde ter um meio tão discutido, e tão variavel, diremos ainda. Aceitamos a sensibilidade da opsonina, aceitamos ainda que a acidez excessiva ou excessiva alcalinidade do meio inibam a opsonina de sensibilizar a bacteria, mas não nos parece justificada a affirmação de uma influencia decisiva da acidez ou alcalinidade do sôro humano no phenomeno da opsonisação, e a nossa duvida provém da observação de sôros com alcalinida-

de minima (0,8—0,75,—0,70) determinarem inclusões consideráveis (1,90—4—5). De resto as variações da acidez ou alcalinidade do sangue são tão ligeiras que nos parecem insufficientes para explicarem as variações máximas que podem ser observadas no phenomeno da opsonisação.

E' um capitulo ainda vago, como vagos são muitos outros da nova theoria d'estas substancias immunisadoras.

e.) *Influencia da concentraçãõ da emulsão bacteriana*—Esta influencia já nós estudámos no capitulo antecedente, razão porque não insistimos sobre ella. Observámos ahi que essa influencia era decisiva quando estudávamos poderes opsonicos de sôros isoladamente, empregando emulsões de concentraçãõ variavel; n'estas condições quanto mais bacterias maior incluem são.

Ainda com o tempo se podem dar variações na concentraçãõ que influem da mesma forma na intensidade da incorporaçãõ bacteriana, mas se nós determinarmos os indices opsonicos do sôro doente e sôro normal, n'um dado momento e com uma dada concentraçãõ, e o fizermos de novo mais tarde com concentraçãõ differente, a influencia é nulla porque é o mesmo factor que entra em ambos os termos da relaçaõ. É por esta razão que quando quizermos resultados comparaveis no tempo, temos de determinar indices opsonicos e não poderes inclusôres isolados, como já dissemos.

f) *Influencia dos leucocytos* — Esta influencia dos leucocytos relaciona-se com a natureza, actividade e quantidade d'essas cellulas; a natureza tem uma influencia decisiva demonstrada pela verificaçãõ feita

sobre leucocytes de diferentes animaes e leucocytes humanos. E' tão accentuada a disparidade de resultados que quando queremos concluir sobre elementos humanos, avaliar por exemplo o poder de um sôro humano, não podemos de maneira nenhuma empregar cellulas sanguineas de animal diferente; a mesma disparidade se observa entre leucocytes de diferentes animaes. De resto os leucocytes humanos são mais facilmente impressionados do que os leucocytes dos outros animaes.

No que se relaciona á actividade da cellula, a influencia é poderosa sob este ponto de vista, pois ha situações morbidas do individuo em que o ataque á cellula sanguinea se faz tão intensamente que esta acaba por ser vencida, não exercendo por esta razão a sua acção phagocytaria e influindo assim no phenomeno da opsonisação; esta mesma insufficiencia de acção póde provir da doença do proprio leucocyto que como cellula que é, póde adoecer como qualquer outra, não desempenhando n'estas circumstancias o papel que em situação normal desempenharia. Por ultimo a influencia da quantidade de leucocytes no phenomeno da opsonisação é minima, como experimentalmente se verifica. O augmento da quantidade de leucocytes não influe sensivelmente na quantidade de opsonisação e a unica conclusão que se póde tirar d'esse augmento, é a de que representa um auxilio, por tornar mais rapida a leitura da preparação. Experimentando com sôro normal e sôro typhico achámos os seguintes valores com volumes variados de leucocytes:

s. n.	{	1 vol. — 1,30	s. t.	{	1 vol. — 4,10
		2 vol. — 1,20			2 vol. — 3,90
		3 vol. — 1,10			3 vol. — 3,84

D'aqui conclue-se que um augmento sensível de

leucocytoz determinam uma ligeira diminuição de valor do poder opsonico primitivo.

g) *Influencia do frio* — Esta influencia reveste um interesse grande pelos resultados obtidos serem concordantes. Experimentámos primeiro com staphylococcus e sôro osteomyelítico e depois com bacillo d'Eberth e sôro typhico e tanto em um, como em outro caso, verificámos que a opsonisação decresce com as temperaturas baixas, não se extinguindo porém completamente mesmo á temperatura de 0 graus.

Em ambos os casos, foi o sôro que sujeitámos á acção do frio e os resultados que obtivemos foram os seguintes :

1. ^o	}	Leucocytoz + estaphylococcus + sôro a 37° = 9,92
		α + α + sôro a 0° = 0,48
2. ^o	}	Leucocytoz + b. d'Eberth + sôro a 37° = 8,60
		α + α + sôro a 0° = 0,64

Em ambos os casos apesar de sujeitar o sôro á temperatura de 0°, ainda a essa temperatura havia inclusão, embora ligeira, e sendo conhecida a acção inhibitoria do frio, sobre a phagocytose, melhor será pensar que esta é que foi suspensa pela acção do frio e não que este tenha destruido a opsonina contida no sôro. Estas mesmas conclusões se tiram das experiencias de Milhit que vamos reproduzir :

1. ^o	}	Leucocytoz + b. Eberth + sôro typhico a 37° —
		15' = 11.
2. ^o	}	Leucocytoz + b. d'Eberth + sôro typhico a 0°
		— 15' = 4,16.
3. ^o	}	Leuc. + b. d'Eberth sujeitos ao frio + sôro a
		37° = 14,50.
4. ^o	}	Leuc. + b. d'Erth + sôro congelado e sujeito
		durante 15' á temp. de 37° = 10,50.

Do numero 2 conclue sobre a acção inhibitoria que o frio tem na phagocytose. Do numero 3, em que ha augmento do poder inclusor, conclue que o frio determinou uma attenuação das bacterias empregadas e o consequente augmento do poder opsonico.

Do numero 4, em que se fez a congelação do sôro que depois foi descongelado, conclue a não influencia do frio sobre a riqueza do sôro em opsoninas e nós concluimos ainda, em que o frio não produziu alteração sensivel na composição da opsonina, Das quatro experiencias enumeradas tira Milhit as deducções seguintes :

I. A phagocytose não se produz a 0° mas a essa temperatura ainda a opsonina se fixa sobre as bacterias.

II. A phagocytose produz-se electivamente nas proximidades de 38°.

III. A congelação attenua um pouco a virulencia das bacterias.

IV. A congelação não modifica a riqueza do sôro em opsonina.

h) Influencia do calor — E' a mais interessante das influencias que se podem exercer sobre a opsonisação.

Já de ha muito se vem estudando a influencia que o calor exerce sobre o sôro, e varias consequencias se tem tirado d'esse estudo; a perda de certas propriedades e conservação de outras, quando submettido o sôro á temperatura de 56°, levou á differenciação do complemento e amboceptor; quando se aquece um sôro a 56° a cytase é destruida mas a sensibilizadora persiste com as suas propriedades. D'aqui decorre o grande interesse theorico que resulta da acção do calor sobre as opsoninas, pois essa acção permittirá tal-

vez avaliar se ellas se comportam como alexina ou como fixador. Dizemos talvez porque ainda hoje não é uma noção completamente assente, a de se saber, se a opsonina é ou não destruida pelo aquecimento a 56°; parecia um problema de facil destrição mas a solução ainda permanece no campo da hypothese, sendo numerosas as opiniões sobre a maneira como o calor actua nas opsoninas.

As mais importantes d'essas opiniões vamos nós apresentar por fórma resumida,

Wright, Bulloch e outros affirmam, que as opsoninas são, sem duvida, destruidas pela acção do calor e que aquellas que podem resistir ao aquecimento, perdem essa propriedade de resistencia, se nós diluirmos o sôro e o aquecermos novamente. Com este segundo aquecimento poduz-se inevitavelmente a destruição da opsonina que resistira ao primeiro aquecimento.

Levaditi, Neufeld e outros, consideram duas categorias de opsoninas, as opsoninas do sôro normal, indubitavelmente destruidas pela acção do calor, e as opsoninas dos immuno-sôros, em que as coisas se passam de maneira diversa. Estas não seriam destruidas pelo aquecimento, sendo por isso thermoestaveis mas relativamente, como o affirma o proprio Levaditi e como nós já o repetimos no estudo da natureza das opsoninas. Wright e Dean affirmam que esta pretendida opsonina thermoestavel não é mais do que um residuo da opsonina total que escapou á acção do aquecimento, e para o provar diluem o sôro, proseguem o aquecimento e a estabilidade thermica da opsonina desaparece; a maior resistencia da opsonina dos immuno-sôros á acção do calor é, para estes auctores, a consequencia de uma maior abundancia de substancia opsonina n'aquelles sôros. Seria uma questão de dose, de quantidade e não de qualidade.

Dean recentemente (1907), conclue que as opsoninas são constituídas por dois grupos actuando conjunctamente, um thermocstavel, da natureza da sensibilizadora; o outro thermolabil, analogo á cytase e abundando no sôro normal. Dean abandona Wright e repelle assim as suas affirmacões anteriores.

Hektoen e Ruediger admittem que a opsonina é constituída por um grupo activo thermolabil, (grupo opsonophoro) e um grupo de fixação, thermocstavel. Estes auctores fazem experiencias com estreptococcus, deixando actuar sobre elles um sôro normal para depois d'esta acção, aquecerem a 58° os microorganismos empregados; constata assim que depois d'este aquecimento já se não dá incorporação leucocytaria das bacterias, mesmo depois da junção de sôro fresco. Interpretam esta observação admittindo a existencia, na opsonina, de dois agrupamentos: um, o agrupamento haptophoro, capaz de se fixar nos microorganismos e que resiste ao calor; outro, o agrupamento opsonophoro, destruido a uma temperatura de 56°-58°.

Bulloch e Atkin fizeram experiencias analogas com o estaphylococcus, demonstrando que se póde aquecer esta bacteria durante horas a uma temperatura de 60°, uma vez que ella tenha sido previamente sensibilizada com sôro normal, que a incorporação é sempre possivel. E' a contestação das experiencias de Ruediger, é a admissão da hypothese de uma substituição simples para a opsonina.

Loehlein apparece a affirmar que todas as avaliacões das experiencias precedentes, são erradas por asentarem em bases igualmente erradas; affirma que pelo aquecimento as bacterias, depois de influenciadas pelo sôro, perdem a propriedade de se corar com a mesma nitidez, como nas circumstancias normaes, e

d'ahi o erro na avaliação do numero de bacterias incorporadas e as erradas conclusões a que somos levados por esse facto. Esta affirmação é absolutamente verdadeira e facilmente confirmada, experimentando com o coli-bacillo, e por ser verdadeira, justifica a difficuldade, se não impossibilidade, de avaliar, por meio de preparações coradas, da intensidade da phagocytose. Como Ruediger, Loehlein considera a opsonina, como uma substancia formada de dois agrupamentos, um thermoestavel, aptophoro, outro thermolabil, opsonophoro.

Para outros auctores a acção do aquecimento, traduzir-se-hia por modificações complexas, incidentes sobre as propriedades dos colloides do sôro segundo uns, sobre a acidez ou alcalinidade do meio, segundo outros. E' assim que um simples phenomeno physico como é o aquecimento, leva a conjecturas que não resolvem o problema, antes accordam uma serie de interpretações que não só não satisfazem pela falta de fundamento, como brigam entre si, por serem contradictorias ; é vêr o que se passa com as interpretações de Ruediger de um lado e Bulloch na brecha opposta. O phenomeno da destruição, ou conservação da opsonina pelo aquecimento do sôro a 56° é, como acaba de ser visto, de uma interpretação extraordinariamente difficil, o que não é razão sufficiente para desistirmos da sua descripção. Para terminarmos com este estudo intrigante da influencia do calor sobre o phenomeno da opsonisação, vamos referir um ensaio feito por Milhit com sôros de typhosos e apresentar as suas conclusões. Milhit determina o poder opsonico do sôro de tres typhosos encontrando os seguintes valores :

- 1.^o — p. ops. = 5,20
 2.^o — p. ops. = 6,70
 3.^o — p. ops. = 3,40

Determinados estes valores, aquece o soro a 55° durante 20 minutos e ensaia novamente a inclusão encontrando :

- 1.^e — p. ops. = 0,49
 2.^o — p. ops. = 1,30
 2.^o — p. ops. = 0,80

A este soro aquecido a 55° acaba por lhe juntar uma pequena porção de soro normal, ensaia nova inclusão e acha :

- 1.^o — p. ops. = 0,91
 2.^o — p. ops. = 1,80
 3.^o — p. ops. = 1,10

Enquanto faz estas determinações, tem já ensaiado um soro normal e verifica que a opsonização que o soro normal determina, depois de aquecido, é nulla. Esta verificação leva a concluir que na verdade a opsonina do soro normal é accentuadamente thermolabil, é a conclusão de Levaditi e parece-nos inatacavel por assentar em verificação experimental.

Passando aos immuno-sôros, conclue Milhit que : 1.^o ha reactivação da opsonina do immuno-sôro depois de aquecido quando na experiencia entra o soro normal, partindo d'este o estimulo reactivador ; 2.^o, com Hektoen, Ruediger e Loehlein, admite que na opsonina do immuno-sôro ha dois agrupamentos, um mais importante, termolabil que desaparece no aquecimento, diminuindo por essa razão o poder opsonico do soro aquecido ; o outro, menos importante, thermoestavel que resistindo ao calor se vae depois fi-

xar na bacteria sensibilizando a, tornando-se assim o determinante da -excassa mas ainda observavel phagocytose.

Analysemos um dos doentes de Milhit e façamos a sua interpretação segundo a maneira de ver d'este experimentador que é afinal a de Levaditi, Loeblein e outros ; applicemos-lhe depois a interpretação de Wright, para o qual a quantidade de opsonina é tudo e estudemos os resultados.

Para esse fim serve bem o 2.º doente cujo sôro apresentou as variações opsonisantes já referidas e que repetimos:

Com sôro não aquecido *p. ops.* = 6,70
 » » aquecido 20' — a 55° — *p. ops.* = 1,30
 » » » e s. normal — *p. ops.* = 1,80

O primeiro sôro tem um poder opsonico consideravel, o que é consequencia de ser um immuno-sôro com opsoninas cheias de actividade, as quaes, segundo Milhit são formadas pelos dois agrupamentos thermo-labil e thermoestavel. Aquecido este sôro a 55° diz Milhit que o grupo labil da opsonina é destruido permanecendo o grupo estavel que por ser mais insignificante produz uma opsonisação menos activa. E' assim que o sôro que tinha um poder opsonico 6,70, passou a ter um outro mais diminuto — 1,30 — sendo este devido ao agrupamento thermoestavel da opsonina total. Depois junta-se sôro normal e o poder opsonico cresce, embora fracamente, era 1,30 passa a 1,80.

Ha manifestamente um augmento de poder inclusor e este augmento é attribuido por Milhit e outros auctores, a uma reactivação da opsonina estavel, produzida pelo sôro normal.

Se agora passamos á interpretação dada por Wright, verificamos que para este auctor, as variações de opsonisação, nas experiencias expostas, são a consequencia das variações da quantidade de opsonina contida no sôro. O immuno-sôro, extremamente rico em opsonina, tem um poder incluser 6,70 mas depois de aquecido passa a ter um valor menor -- 1,30 -- porque parte da opsonina foi destruida pela acção do calor, não se estendendo a destruição á totalidade da substancia opsonica do immuno-sôro primitivo; por fim a addição de sôro fresco, sôro normal, representa para Wright um accrescimento de opsonina, um augmento da quantidade que ficára no sôro depois do aquecimento e d'ahi o pequeno accrescimento de 1,30 para 1,80 que essa addição determina. Como se vê são duas interpretações completamente differentes, o que nos leva a perguntar em qual d'ellas estará a verdade.

Para o nosso espirito parece não haver contradição irreductivel entre as duas formas de vêr e affigura-se-nos que ambos os experimentadores teem razão nas suas affirmações, parecendo-nos ainda que é facil conciliar as conclusões; talvez que esta affirmacão seja a consequencia do horror que sempre tivemos aos exclusivismos e d'ahi a tendencia constante do nosso espirito em conciliar fórmas de ver, concatenalas, agrupa-las com o fim de procurar a explicação do phenomeno na conjugação dos multiplos factores expostos.

Para Wright a quantidade de opsonina é tudo no phenomeno descripto; para Milhit, Levaditi, etc., a qualidade é o caracter que essencialmente tem valor na interpretação da influencia em estudo; enfim, para nós, os dois factores quantidade de opsonina e qualidade da mesma, conjugam-se e explicam as differenças encontradas.

O poder opsonico d'um sôro é avaliado pelo numero de bacterias que são incluídas nos phagocytos pela acção da substancia opsonica que esse sôro encerra ; a unidade de avaliação é a bacteria e a determinante da inclusão é a opsonina. Pois bem, uma inclusão intensa, em egualdade de circumstancias de emulsão e leucocytos, é uma funcção da quantidade de opsonina, pois serão incluídas tantas mais bacterias quanto mais quantidade de substancia sensibilizadora existir. Poder-nos-hão responder que uma maior inclusão está tambem dependente d'uma maior actividade da opsonina e o argumento colhe porque essa actividade augmentada, traduzir-se-ha, não só por uma abreviação do phenomeno, mas tambem pela extensão d'elle.

N'estas circumstancias o immuno-sôro determina uma inclusão tal como 6,70, na experiencia citada, por ser rico em substancia opsonica ; depois vem o aquecimento e o poder inclusor baixa para 1,30. Esta baixa será a consequencia da destruição opsonica, diminuição da sua quantidade e a phagocytose n'este caso é ainda um factor dependente da quantidade.

Por fim a addição de sôro normal é o ajuntar de maior quantidade de opsonina, á que no sôro fica depois do aquecimento, mas como a opsonina do sôro normal é sempre excassa, resulta d'ahi que o accrescimento do poder inclusor é pequeno quando se faz a junção do sôro fresco.

No sôro doente citado era de 1,30 com o sôro aquecido e passou a 1,80 quando se ajuntou sôro normal. O augmento da quantidade de opsonina, feito por esta addição, é sufficiente para explicar o augmento do poder opsonico sem ser necessario estarmos a pensar em reactivações da opsonina existente, mas não repugna admitir que essa reactivação se dê, pois sempre é op-

sonina nova que se junta á opsonina em parte exhausta pelo aquecimento. E assim nos parecem conciliadas as afirmações de Wright e Levaditi relativamente á influencia que a quantidade de opsonina, ou a acção do grupo thermoestavel, podem exercer no phenomeno da opsonisação quando trabalhamos com sôros aquecidos.

i) *Influencia dos agentes chimicos* — A influencia de certas substancias chimicas, no phenomeno da opsonisação é nitida e traduzida por uma phagocytose menos intensa, não sendo porém sobre os leucocytos que essa influencia se exerce, mas sobre a substancia sensibilizadora das bacterias.

O citrato de sodio que empregamos para evitar a coagulação na occasião de preparar os globulos, pôde produzir diminuição da phagocytose se não houver sufficiente cuidado nas lavagens posteriores com solução physiologica, as quaes devem ser feitas repetidas vezes (3 a 4), com o fim de evitar a presença de citrato de sodio no phenomeno definitivo. Foi a observação de phagocytoses excassas quando trabalhavamos com immuno-sôros de convalescentes de febre typhoide que deveriam produzir uma intensa phagocytose, o que nos levou a pensar que qualquer causa extranha interviera no phenomeno, modificando-o no sentido da diminuição ; a captação do sangue fôra feita como em todas as outras vezes, na preparação do sôro nada houvera de anormal, emfim a technica fôra a que sempre tinhamos empregado mas lembravamo-nos de que só haviamos feito uma lavagem dos globulos, com solução physiologica e esta recôrdação levou-nos a repetir a experiencia empregando então maior numero de lavagens. Tanto bastou para uma inclusão nitida e poderosa e para pensarmos que fôra a existencia

de citrato de sodio, a determinante do nosso insuccesso.

Vimos depois, nos auctores, confirmada a influencia do citrato de sodio e simultaneamente a influencia que póde ser exercida por outras substancias chemicas como o Cl^2Cp , o $\text{C}^6\text{H}^5\text{O}^7\text{Na}^3$, o ClNa , FNa etc.

As soluções concentradas de ClNa diminuem o poder phagocytario, começando a notar-se a influencia, logo que se eleva o grau de concentração; diz Milhit que este facto talvez possa explicar as variações do poder opsonico no decurso de affecções febris em que ha retenção de chloretos.

As substancias chemicas exercem uma acção neutralisante da opsonina, dizendo alguns experimentadores que a neutralisação provem da precipitação dos saes de Ca do sôro, pois basta restituir ao sôro, tratado por uma substancia chimica, os saes de calcio, perdidos pela acção d'essa substancia empregada, para que elle recupere grande parte das suas propriedades opsonicas. Para ver a importancia que os saes de Ca tem no phenomeno da opsonisação, verificam ainda esses experimentadores, juntando saes de Ca ao sôro e notando que crescem as suas propriedades opsonicas.

E' isto mais um elemento com que devemos entrar em conta no estudo da opsonisação e mais um elemento a mostrar a complexidade do estudo opsonico; a riqueza d'um sôro em Cl,Na , a influencia dos saes de Ca , são novos elos d'esta cadeia regularmente intrincada e que nós devemos tomar em consideração.

Se as influencias physicas eram já de si intrigantes, as influencias chemicas ainda o são mais consideravelmente; para as primeiras ainda se aventam hypotheses mais ou menos admissiveis, para as segundas o mutismo, quanto a interpretação, é quasi completo e

natural é que assim seja porque o interpretar n'estas circumstancias, é o devassar dos phenomenos intimos da chimica biologica, os phenomenos d'esta microchimica tão mysteriosa ainda e que tão preponderante papel deve desempenhar nos metabolismos da vida. E' certamente o local onde se agglomeram as determinantes mais importantes dos multiplos phenomenos da vida e se na chimica biologica temos encontrado já a explicação de numerosos phenomenos, muitos outros ali devem ter a sua origem escapando-nos porém a natureza d'ella. N'es'a condições se encontram a acção neutralizante do excesso de ClNa e a acção estimuladora dos saes de Ca . São substancias chimicas que por reacções chimicas devem taaduzir a sua acção e é o mecanismo d'estes reacções o ponto vago e obscuro do problema que não tentamos resolver. O chimismo da cellula, o chimismo da bacteria, são incognitas para o nosso espirito mas a resolução ha-de vir, tem de ser conhecido o valor d'essas incognitas em tão complexa equação. Absurdo era pensar ha meia duzia de annos na radiographia, hoje é uma realidade brilhante e o mesmo tem de succeder relativamente a este ultra-microchimismo.

Deixando a interpretação do phenomeno ao futuro, vamos resumir este estudo indicando quaes as substancias chimicas que diminuem a opsonisação quando experimentalmente são associadas ao sôro inclusor. Temos assim :

- I. Solução saturada de Cl Na
- II. » Fl Na
- III. » de oxalato d'ammonio
- IV. » citrato de sodio
- V. chloroformio mesmo em diluição
- VI. C^2H^5OH
- VII. Solução de Cl^2 Hg
- IX. Collargol

Para terminar exporemos ainda uma opinião sobre o modo como estas substancias actuan: seria produzindo uma acção paralyzante sobre o leucocyto, isto para algumas substancias como o $CH\ Cl^3$; para outras, como C^2H^5OH , Cl^2 Hg, seria por um mechanismo mais complexo incidindo não só sobre o leucocyto mas tambem sobre a bacteria e talvez sobre a opsonina.

E' uma hypothese que não explica a natureza do phenomeno.

CAPITULO V

Conclusões

E' cedo ainda para podermos formar uma opinião definitiva sobre o valor do methodo opsonico.

E' certo que a technica que o methodo exige é de uma realização delicada, por vezes longa e sempre de uma relativa difficuldade mas isto não são certamente condicções sufficientes para o abandono do processo tanto mais que o seu fundamento é racional. De resto as difficuldades da technica suppreem se com a repetida pratica, conseguindo-se por esse meio adquirir um manejo experimental que leva rapidamente á realização do fim.

A influencia dos varios factores que apontámos, multiplos e variados, tambem não constitue um obice irreductivel, embora elles possam ser determinantes de variações ; a sua influencia seria decisiva se ao processo attribuissemos valor absoluto, mas dada a sua feição relativa e verificado que as variações apontadas são minimas, a maior parte das vezes, os factores a que nos referimos tornam-se insufficientes para nos evarem á exclusão do methodo opsonico.

E' um processo novo, em via de evolução, sujeito

ainda a estudo e como todos os processos experimentaes, sujeito tambem ás modificações que a pratica diaria constantemente acarreta para os processos de laboratorio, ainda os mais antigamente estabelecidos. E' possivel por esta razão que elle ainda tenha de soffrer as mais intensas e completas modificações, mas não acreditamos que elle seja votado ao ostracismo das coisas inuteis porque a sua utilidade é frizante. A substancia opsonica é uma realidade, o accrescimo da phagocytose pela sua acção não é uma phantasia, é um facto de existencia insophismavel e assente a relação intima entre opsonina e phagocytose, outro phenomeno que os nossos olhos podem vêr, assente tem de ficar no nosso espirito, a importancia da substancia opsonica e consequentemente do methodo opsonico, tal como elle hoje nos é apresentado ou com as modificações que o futuro lhe traga.

A confirmação da existencia de uma substancia capaz de augmentar com o seu estimulo, o phenomeno da phagocytose, actuando quer sobre o phagocyto, quer sobre a bacteria, ou ainda simultaneamente sobre phagocyto e bacteria, levou já a duas conclusões, qualquer d'ellas importante pelos seus resultados. A primeira foi a possibilidade da medição relativa do poder de reacção de um organismo em phases diversas da sua infecção, por meio do indice opsonico; a segunda foi o estabelecimento de um processo racional de therapeutica instituido por Wright, atacado por uns, defendido por outros mas ainda novo em demasia para se poder avaliar com segurança do seu valor, é a vaccinotherapia opsonica.

Para terminarmos com o estudo que nos propozemos fazer d'este novo capitulo da immuidade, e onde encontrámos difficuldades grandes, sendo a primeira a dispersão do assumpto e a segunda a technica, va-

mos fazer ligeira referencia ao indice opsonico e á vaccinothérapie, pensando completar d'esta maneira tudo o que se relaciona com opsoninas embora o nosso trabalho não passe de um esboço, de uma ligeira contribuição ao estudo da immunidade, o mais bello capitulo das sciencias medicas.

I. *Indicé opsonico* — O indice opsonico é a relação entre a media do numero de bacterias incluídas nos phagocytos pela acção de um sôro doente, e a media do numero de bacterias, da mesma especie, incluídas no mesmo numero de phagocytos, pela acção de um sôro normal. O indice opsonico resulta portanto da relação do poder phagocytario do sôro doente e do poder phagocytario do sôro normal. Em equação exprime-se o valor de indice opsonico pela formula seguinte :

$$\frac{\text{Poder phagocytario do sôro doente}}{\text{Poder phagocytario do sôro normal}} = \text{Indicé opsonico}$$

Na pratica, como já dissemos, começa-se por determinar o numero de bacterias incluídas em 50 leucocytos polymorphos, pela acção do sôro doente ; dividindo o numero de bacterias pelo de leucocytos obtem-se o poder inclusor ou phagocytario d'esse sôro. Depois contam-se outros 50 leucocytos polymorphos e o numero de bacterias n'elles incluídos pela acção do sôro d'um individuo normal ; dividindo bacterias pelos leucocytos obtem-se o poder inclusor ou phagocytario do sôro normal ; em seguida estabelece-se a relação dos dois numeros, sendo numerador da fracção o numero representativo do poder phagocytario do sôro doente. Exemplifiquemos:

Pela acção de um sôro typhico encontrámos, sup-

punhamos, 112 bacterias incluídas em 50 polymorphos, $\frac{112}{50}$ será o poder phagocytario do sôro typhico. Para simplificar a operação é habito multiplicar o numero de bacterias por 2 e dividir o producto por 100, o resultado é perfeitamente o mesmo, mas a operação é manifestamente mais facil.

Assim $\frac{112}{50} = \frac{112 \times 2}{50 \times 2} = 2,24$. Determinado este poder opsonico, repetimos a inclusão do bacillo typhico empregando agora sôro normal; suppunhamos ter contado 64 bacterias em 50 leucocytos, $\frac{64 \times 2}{100} = 1,28$ será o poder opsonico do sôro normal para a mesma emulsão bacteriana. Finalmente $\frac{2,24}{1,28} = \frac{1,12}{0,64} = 1,175$ será o indice opsonico que nós procuravamos.

E' este indice opsonico que nos serve de guia não só para o estudo do modo como o organismo reage perante o agente invasor como tambem para julgamento da vaccinotherapia e da oportunidade da sua applicação. Não é medindo apenas o poder phagocytario do sôro do nosso doente que nós podemos obter resultados comparaveis no tempo, pois como já vimos ha circumstancias que podem fazer variar esse poder, tornando-se assim necessario avaliar esses resultados pelo indice opsonico que satisfaz á condição de uma certa constancia, sem comtudo ter um valor absoluto e é d'elle que temos de lançar mão toda a vez que queiramos obter resultados comparaveis.

Quanto ás condições, que podem influir no valor do indice opsonico, dispensamo-nos de a ellas nos referirmos por já termos feito referencia nos capitulos da technica da opsoninação e do estudo da influencia

de varios factores no phenomeno opsonico. Essas condições que na opsouisação teem um valor accentuado, estendem ainda a sua influencia ao indice opsonico mas por uma fórma bastante mais apagada, sem contudo attingir um valor nullo.

II *Vaccinotherapie* — Não é uma ideia nova, ideia que tenha sido primeiro apresentada por Wright, a de tratar as doenças por meio de vaccinações, preparadas as vaccinas com culturas mortas de microorganismos pathogenicos. Pretendeu-se tratar o cholera asiatico, a febre typhoide e outras doenças infecciosas, pela *vaccinotherapie*, mas os insucessos levaram os variados experimentadores ao abandono do processo. Para Wright os insucessos devem ser attribuidos, não á inactividade das vaccinas empregadas, mas ao desconhecimento das circumstancias que favorecem o effeito therapeutico d'ellas, sobretudo á inoportunidade da applicação, desconhecimento, por falta de processo determinador, do momento apropriado, indeterminação da dose e falta de determinação da melhor preparação de materia a empregar.

O estudo do poder opsonico do sôro suppre a maior parte d'estas deficiencias, senão todas, e torna o methodo de Wright um methodo importante de tratamento das doenças infecciosas.

Para Levaditi a efficacia do processo está assegurada senão em todos os casos de doença pelo menos em um certo numero d'elles.

As vaccinas de Wright são, segundo elle as define, substancias que introduzidas no organismo, provocam a formação de substancias protectoras — as opsoninas.

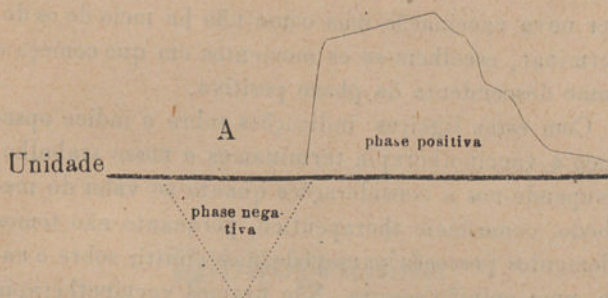
Obteem-se as vaccinas matando as bacterias pelo calor, (60° na estufa durante meia hora), sendo pre-

ferível que as bacterias empregadas sejam o producto da cultivação d'aquellas que invadem o individuo a vaccinar; a cultura é feita em gelose durante 24 horas, emulsionada em sôro physiologico e morta pela acção do calor. Assim fica preparada a vaccina cuja riqueza em bacterias deve ser medida de maneira que em cada centimetro cubico não haja quantidade excessiva ou desmesuradamente grande de bacterias. Na pratica as doses que mais frequentemente se empregam são: staphylococcus — 100, 200, 500 milhões de bacterias; pneumococcus, streptococcus e gonococcus 5 a 10 milhões.

Estas vaccinas tituladas podem ser adquiridas nos mercados onde se encontram aptas para serem empregadas, ou podem ser tituladas nos laboratorios.

Preparada ou obtida a vaccina e injectada no individuo doente assistimos ao primeiro phenomeno da vaccinação que é a diminuição do indice opsonico e só depois d'esta phase é que elle começa a subir, attinge o valor do indice prova — indice determinado antes de injectação — e depois ultrapassa-o. A descida da curva chama Wright intercorrença de uma phase negativa e é segundo elle a causa de muitos insuccessos da vaccinotheraphia o fazer-se a segunda injectação enquanto dura esta phase,

Após a descida o indice começa a subir, começa a dar-se a phase positiva reveladora de uma hyperprodução de substancia opsonica. O graphico A traduz a marcha do phenomeno.

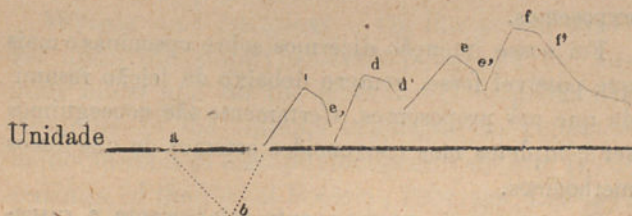


Ha circumstancias que podem fazer variar o graphico apresentado que é o da opsonisação normal. Entre ellas temos como mais importantes a dose e o momento da injeccão.

Uma dose muito fraca produz uma phase negativa curta e uma phase positiva insignificante.

Dose muito forte dá phase negativa accentuada e positiva quasi nulla.

O momento da applicação é tambem altamente importante por quanto se nós formos injectar durante a intercorrença de uma phase negativa, accumulamos os effeitos negativos o que acarreta insuccesso para a vaccinação produzida e determina effeitos nocivos para o doente.



Este graphico representa a curva opsonica regular determinada por uma serie de injeccões sufficientes. Os pontos c, d, e, f, seriam os optimos para se fa-

zer nova vacinação mas como não ha meio de os de terminar, escolhem-se os momentos em que começa o ramo descendente da phase positiva.

Com estas ligeiras indicações sobre o indice opsonico e vaccinotherapia terminamos o nosso trabalho, poupando-nos a considerações quanto ao valor do methodo, como meio therapeutico, porquanto não temos elementos pessoaes para podermos emittir sobre o caso, uma opinião segura. Não fizemos vaccinotherapia assim como não fizemos um estudo especial, em qualquer das doenças infecciosas, das variações do indice opsonico e não tendo feito vaccinotherapia, não nos podemos manifestar sobre o valor therapeutico do methodo. A esse trabalho nos propomos logo que as condições nos sejam favoraveis, escolhendo para nosso estudo o campo da tuberculose ; é nossa intenção fazer vaccinotherapia tuberculosa.

De resto não fizemos estudos especiaes sobre o indice opsonico em uma dada doença porque não demos ao nosso trabalho uma feição de especialidade, antes pretendemos dar-lhe uma feição de generalidade que o assumpto naturalmente requeria. Os trabalhos sobre as variações do indice opsonico em doenças determinadas, hão-de naturalmente seguir este que ora apresentamos. Serão feições especiaes do assumpto que exposemos.

Foi nossa intenção dizermos sobre opsoninas o mais que possivel fosse, sempre debaixo da feição resumida que nos proposemos. Certamente não conseguimos ser completos mas convencidos estamos de que fomos methodicos.

O assumpto é extremamente interessante e susceptivel de profundas especulações !

Com esta affirmação encerramos o nosso trabalho,

Bibliographia



Wright — Notes on the treatment of furunculosis, sycosis and acne by the inoculation of a staphylococcus vaccine and generally on the treatment of localized bacterial invasions by therapeutical inoculations of the corresponding bacterial vaccines (Lancet, London, 1902, vol. I, pag. 874).

Wright and Douglass — An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis (Proced. Royal Soc. London, 1903, vol. LXXII, pag. 357).

Wright and Douglass — Further observations on the role of the blood fluids in connection with phagocytosis (Proc. Roy. Soc. Lon. 1904, vol. LXXIII, pag. 128).

Wright and Douglass — On the action exerted upon the staphylococcus pyogenes by human blood and on the elaboration of protective elements in the human organism in response to inoculation of a staphylococcus vaccine. (Proceedings, of the Royal Society, 1904, vol. LXXIV, pag. 147).

Wright — A short treatise of antityphoid inoculation containing an exposition of the princi-

ples of the method and a summary of the results achieved by its application, (1904, Westminster.)

Wright — A lecture on therapeutic inoculation of bacterial vaccines and their practical exploitation in treatment of disease, (1903. British Med. Journal, 9 Mai.)

Wright — On the treatment of acne, furunculosis and sycosis by therapeutic inoculations of staphylococcus vaccine, (7 Mai, 1904, British Medical, Journal.)

Wright and Douglass — On the action exerted upon the tubercle bacillus by human blood fluids and on the elaboration of protective elements in response to inoculation of tubercle vaccine. (Proc. Royal Society, vol. LXXXIX, pag. 159, and Lancet, 22, Ocl, 1904.)

Wright — The opsonic theory and the rapentie inoculation with bacterial vaccines. (Canada Lancet, 1906, 7 vol. XL, pag. 193.)

Wright — On the general principles of the therapeutic inoculation of bacterial vaccines as applied to the treatment of tuberculosis infection. (Transactions of the R. M. C. Society, vol. LXXXIX, 1906.)

Wright and Reid. — On spontaneous phagocytosis which is obtained with the heated serum of patients who have responded to tubercular infection, or, as the case may be, to the inoculation or as tubercle vaccine. (Proc. Roy. Soc. London, 1905, 6 LXXVII, pag. 211, 225.)

Wright — Lecture on the principles of vaccinotherapy, (17 and, 24 Aug, Lancet.)

Wright — Observations on the opsonic index and the antipneumococcus power of the blood

in pneumonie, (Journal, inf. diseases 1906, pag. 773.)

Allen — The opsonic method of treatment, (London, 1907.)

Baldwin — The mechanism of resistance to tuberculosis. (Poceedings of the Pathol. Soc. of Philadelphia, 1907, vol. IX, pag. 163, 178.)

Chapin and Cowie — The separation of opsonic ambocepteur and complement in the cold. (Journal, of. Med. Res. t. XVII, f. 2, pag. 213, 219.)

Dean — An experimental enquiry into the nature of the substance in serum wich influences phagocytosis. (Proc. of. the Roy. Soc. London, 1905, vol. LXXVI, pag. 506.)

Banks — The variations in scarlet fever of the opsonic power of streptococci. (Journ. Path. and. Bact. 1908.)

Beddard — The opsonic power of blood. (Guys's Hosp. Gaz. London, 1905, XIX, 420.)

Bolduan — The value of the opsonic index as a guide in the treatment of. bacterial infection. (Long. Island, Med. Journal t. I, 1907.)

Bulloch — Inquiry into the opsonic content of the blood serum in healthy individuals and in patients affected y blupus. (Tr. Pathol. Soc. Lond. 1905, LVI, 334.)

Bulloch — The treatment of tuberculosis by tuberculin. Trans. of the Royal med. chir. Soc. 1906, vol. LXXXIX, pag. 69.)

Bulloch — On the principles underlying the treatment of bacterial disease by the inoculation of corresponding vaccines. (Practitioner, Nov. 1905.)

Bulloch and Western — The specificity of the

opsonic substances in the blood serum. (Proc. Roy. Soc. Lond. 1905-06, B. LXXVII, pag. 531.)

Chark and Simonds — A study of typhoid opsonin. (Journ. inf. diseases 1908, VI, pag. 13.)

Cowie and Chapin — On the reactivation of heated normal human opsonic serum with fresh diluted serum (Journ. of. Med. Rest. t XVII, oct. 1907, pag. 57.)

Briscoe and Williams — The treatment of pulmonary affections by the inoculation of vaccines controlled by the opsonic index, (The practitioner, t LXXX, Mai 1903, pag. 671.)

Ellet — A note on the effect of bodily exertion on the opsonic index of healthy pers. (Brit. Med. Journ. Lond. 1906, pag. 131.)

Farland — The nephelometer, (Journal Am. Med. assoc. t XLIV, f. 14, pag. 1176 (1907.)

Farland and Engle — The specific nature of opsonins. (Journal Am. Med. assoc. t LIX f. 14, pag. 1180 (1907.)

Hume — Opsonins and the opsonic index. Med. Brief. Saint-Louis, 1906, XXXIV, 689.

Flemming — Some observations on the opsonic index with special reference to the accuracy of the method and to some of the order sources of error. (The Practitioner, n.º 5, t LXXX, Mai 1908, pag 617.)

Bosanquet and Roland — The influence of antituberculous serum on the opsonic index. (Brit. Med. Journ. 13 Avril, 1907.)

Bradshaw and Glynn — The significance of the opsonic power of the blood and the value of estimations of the opsonic index in the diagnosis and treatment of tubercular and other infections. (Liverpool. M. Ch. Journ. 1906, XXIV, pag. 115.)

Brooke — A note on the opsonic index. (Dublin J. M. Sc. 1906, CXXII, pag. 180.)

Bulloch and Atkin — Experiences on the nature of the opsonic action of the blood serum. (Proceed. of the Roy. Soc. 1905, LXXIV, pag. 379.)

Frederick — Opsonins and aggressines, (Albany Med. Ann. 1906, XXVII, 730.)

French — On opsonic factors: their estimation and use in therapeutics. with some illustrated cases. (Practitioner. Lond. 1906, LXXVII, 64.)

Inmann — On opsonins and the principles of therapeutic inoculation by bacterial vaccines. (Treatment Lond. 1906, XI, 61.)

Inmann — The value of the opsonic index in the treatment of pulmonary tuberculosis. (The Practitioner, t LXXX Mai 1908.)

Fishe — Some notes on opsonins. (Montreal M. J. 1906, XXXV, pag. 662.)

Hektoen and Ruediger — Studies in phagocytosis. (The Journal of infections Diseases, vol. II, n.° 1, pag. 128, 1905.)

Moss — Studies on opsonins. (John's Hopkins Hosp. Bull. t XVIII, 1907, pag. 195.)

Mair and Martin — On the combining properties of opsonins of normal serum, (Brit. Med. J. 1907, 22 Déc, pag. 1783.)

Morton — Duration of phagocytic power of human leucocytes and of opsonic power of human serum outside the body. (Trans. of the Chicago Pathol. Soc. Avril. 1905.)

Noguchi — On the influence of the reaction and of dessication upon opsonins. (Reprint. from Journ. of Exp. Med. 1907, vol. IX, n.° 4.)

Opie — Opsonins of inflammatory exudates, (Journ. of Exp. Med. t. IX, 1907, pag. 445.)

Park and Riggs — The opsonic index as a guide to regulate the use of vaccines in the treatment of disease, (Journ. of Med. Res. t. XVIII, f. 1.^o, 1907, octot, pag. 77.)

Ditman, Bradley, et Potter — The opsonic index in medicine. J. (Am. M. Ass. Chicago, 1906, t. XLVII, pag. 1722.)

Potter — Further observations on opsonins in normal and pathologic sera, (J. Am. Med. Ass. t. XLIX, f. 22, pag. 1815.)

Ross — An address. on the opsonic theory and its practical application to medicine and surgery. (Brit. Med. Journ. 1906, II, pag. 16.)

Rankin — Observations on the effects of fasting upon the opsonic power of the blood towards staphylococcus aureus.

Lamar et Simon — A method of estimating the opsonic content of blood and other fluids. (John's, Hopkins. Hosp. Bull. Balt. 1906, XVII, — 27.)

Simon — A further contribution to the knowledge of the opsonins.)

Simon, Lamar, Bispham — A contribution to the study of the opsonins. (Reprinted from the Journ. of Exp. Med. vol. VIII, doc. 1906.)

Smith — The opsonic index. The probable identity of the opsonins with the normal agglutinins. (Ophthalmoscope Lond. 1906, IV, 513, Proceed. Lennan, Soc. New, South, Wales, 1905, II, 269.)

Thomas — Variability and unreliability in the determination of the opsonic index. (Journ. Am. Med. Ass. t. XLIX, f. 15, 1249.)

Turton and Roy Appleton — Th relative opso-

nic power of the mothers blood serum and milk. Brit. Led. Journ. Avril, 1907, pag. 866.)

Western—The treatment of bacterial infections by vaccines. (Lancet, t. CLXXIII, nov. 1907, pag. 1217, 1375 et 1449.)

White — Note on the experimental error in the method of determining the tubercule opsonic index of the blood. (The Practitioner f. 5, mai, 1908, pag. 639.)

Whitfield — On the treatment of skin diseases by inoculation after the opsonin method. (The Practitioner, t. LXXX, pag. 697.)

Walker — The relative influence of the blood fluids and the bacterial toxines in phagocytosis. (Journ. of Med. Res. Nov. 1905.)

Jork and Smith — The effects of injection of antitoxic and antibacterial sera on the opsonic power of the blood. (Bio. Chem. Journ. Liserpool, 1906, I, 341).

Barrat — Royal. Soc. Proc. LXXVI, 1906, 524.)

Beatti. di Sheiffeld — (Lancet, 1907)

Francis (Glasgow) — (Lancet, 1907)

Crafton — (Journal, of Hyg. Set. 5, 1905).

Calvert — (Brit. Med. Journ. Juillet, 1906).

Davis — (Journ. inf. diseases, 1905)

Dodds — (Brit. Med. Journ. 1906.)

Fernet — (Brit. Journ. of Derm. 1906).

Flechner — (J. of Exp. Med, Man, 14. 1907).

Gray — (Lancet, Abril, 1906).

Rankin — (Lancet, 1907).

Leishmann — (Brit. M. J. Janeiro, 1902).

Meakin — (Brit. Med. J. Novembro 1905).

Ratch — (J. Am. Med. Ass. Agosto, 1907).

Urwich — (Brit. Led. J. Julho, 1905, pag. 172).

Bine und Lissner — Die technik der Opsonin bestimmung und ihre Anwendung bei Lugen-tuberkulose. (Munch Med. Wochen. n.º 51, 1907).

Hamburger und Hekma—Quantitative Studien über phagocytosis. Einfluss von wasserentziehung. (Bioch. Zeitsch, vol, VIII fasciculo 1 e 2, pag. 102).

Meyer — Uber die phagocytose befördernden substanzen des Blutserums. (Berl. Klin. Woch. 1905, n.º 13).

Neufeld — Uber die Grundlagen der Wrigtschen opsonintheorie. (Deutsche. Med. Woch, 1904 pag. 1929.)

Neufeld.—(Berl. Klin. Woch. 25, Maio, 1908, pag. 993.)

Neufeld und Huhne — (Arh. aus dem kaiserl gesundheitsamte, 1907 vol. XXV, fasculo I).

Neufeld und Rimpau — (Deuts. Med. Woch. 1904, vol. XXX, n.º 40, pag. 1458).

Neufeld und Rimpau — (Zeitschrift fur hyg, 1905, vol. LI, pag. 283.)

Neufeld und Töpfer — (Centralblatt, f. Bakteri-riol, vol, XXXVIII, pag. 456.)

Neumann — Untersuchungen über opsonine und phagocytose Centralblatt. Bact. 1907, pag. 47).

Sauerbeck.— Neue tatrachen und theorien in der immunitaetsforsch. die opsonin theorie (Wiesbaden, 1907.)

Sauerbeck — Ergebnisse der allg. patholog. heraugegeben von O. Lubarsch und R. Osterreich. 1907, t. XI, pag. 716).

Sleewijk — Uber den Bau der opsonine. (Centralb, f, Bak. LXLVI, 513, 1907.)

Weinstein — Über die Grundlagen und Anwendung der Wrightschen, Opsonintherapie, (Berl. Klin. Woch. 1905, XLIII, pag. 1007).

Becher — (Zeitschrift., f. Hyg. 1907, vol. LVI, pag. 33.)

Boelke — (Deutsch. Med. Woch., 1907, n.º 37, pag. 2487.)

Gruber und Futaki — (Münch. Med. Woch. 1906, n.º 6, vol. XXXVIII, pag. 11.)

Hahn — (Deutsch. Arch. für. Klin. Med. 1906.

Kaemmerer — (Munch. Med. Woch. 1907, n.º 39.)

Löwenstein — (Zeitsch. für. Hyg. Bd. 55, 1906.)

Sachs — (Deutsch. Med. Woch. 1908, n.º 18, pag. 2172.

Schoetmuller und Much — (Munch. Med. Woch. 1908, Fev, n.º 8.)

Wakelin — Die quantitative bestimmung der erythrocyten opsonine (Centralb. Bak. 1907, pag. 838.)

Schard et Feuillet — Resistance et activité des leucocytes dans les épanchements pathologiques (Soc. beio. II, Janeiro, 1908, pag. 17, 18 Janeiro 1908, pag. 74, 8 Julho 1908.)

Bube et Medalla — Applications pratiques de la thérapeutique opsonique (Bost. Med Journ. vol. CLVIII, 1908 n.º 19.)

Bossan — Opsonines et index opsonique comme moyen de contrôle de l'effet produit par certaines medications. (Gaz. des Hop. 1907 pag 111.)

Breton et Petit — Propriétés cytasiques ou opsonisantes du sérum dans la fièvre typhoïde. (C. R. Soc. biol. 1.º semestre, pag. 941.)

Chantemessé — Serothérapie anti-typhoïde. (Congrès de Berlin 23 Setembro 1907)

Clarke — Effet de lá tuberculine sur l'index général de lá tuberculose. chez les tuberculeux 1907, Lancet, 20 Junho.

Doyen — Diagnostic du cancør par une réaction spécifique avec le microccus neoformans. (Soc. briol. 9 maio 1908, pag. 916.)

Eisler et Sohna — Recherches sur le contenu en opsonines du sang de mères saines, immunisées et des nouveau-nés. (Munch. Klinich. Woch. Maio 1908.)

Fornet — Sur le séro-diagnostic, les précipitines et les opsonines. (Much. Med. woch. 1908, Jan. 28.)

Gay — La déviation de l'alexine dans l'hémolyse. Relations des sensibilisatrices et de l'alexine (Ann. de l'Inst. Pasteur, 1905, 1906, pag. 462, A 2.^a em colaboração com Bordet.)

Guillain, Boidin et Fiessinger — Sur quelques propriétés du sérum d'un malade convalescent d'oedème charbonneux de la face. (C. R. Soc. biol 12, et 19, oct 1907, pag. 308.)

Jousset — La méthode opsonique de Wright. Bull Med. 15 Maio, 1907.)

Levaditi — Les opsonines, (Presse Medical, 31 agosto 1907, pagina 553.)

Levaditi — Les opsonines et le traitement des maladies infectieuses. (Presse Medical, 7 Setembro 1907, pag. 560.)

Levaditi et Mutermilch — Pouvoir immunisant de l'antigène cholérique soluble dans l'alcool. (Soc. Biol, 27 Junho 1908, pag. 1151.)

Levaditi et Roché — Les opsonines et le mécanism de la crise dans la Tick-fever. (Bull. Soc. Biol 1907, pag. 619.)

Levaditi et Koessler — Contribution à l'étude

des opsonines normales. Anticomplément et anti opsonine. (Bull. Soc. Biol. 1907, pag. 685.)

Levaditi e Inmann — Contribution à l'étude des opsonines. Propriétés opsonisantes des sérums normaux, (Bull de Soc. Biol 1907, pag, 682 et pag. 725.)

Levaditi e Inmann — Mécanism de l'opsonisation. (Bull. soc. de Biol. 1907, pag. 869.)

Löchlein — Observation sur la phagocytose in vitro, 1.^{er} memoire (Ann. de l'Inst. Pasteur Oct 1905, pag. 646.) 2.^o memoire. (Nov 1906, pag. 939.)

Metchnikoff — Phagocytose. (Handbuch du pathol. Micoorg. Iena chez Fischer.)

Milhit — Les opsonines. Etude physique, chimique et biologique, (These de Paris, 1909.)

Milhit — (Congrès de Berlin, 23 septembre, 1907.)

Milhit — (Gaz des Hop.)

Milhit — Influence de quelques facteurs dans le phenoméne de l'opsonisation, (Progrès Medical 1908, Julho.)

Milhit — Specificité des opsonines. (Arch. de Med. Exp. n.^o 4, Julho 1908.)

Roger — Les reactions défensives de l'organisme contre les infections. (Presse Medicale, Nov. 1907, pag. 741.)

Romme — Les opsonines et la phagocytose. (Presse Med. Nov. 1907, pag. 560.)

Briscoe — Source des opsonines et caractères des cellules intéressées dans la phagocytose. (1907, Lancet.)

Gaultier — Les opsonines et la therapeutique opsonisante par les vaccines de Wright. (Paris, 1909.)

Armand Delille — Le mécanisme de l'immu-

nité, Anticorps, antigènes et deviation du complément. (Monographies Cliniques n.º 55, Janeiro 29, 1909.)

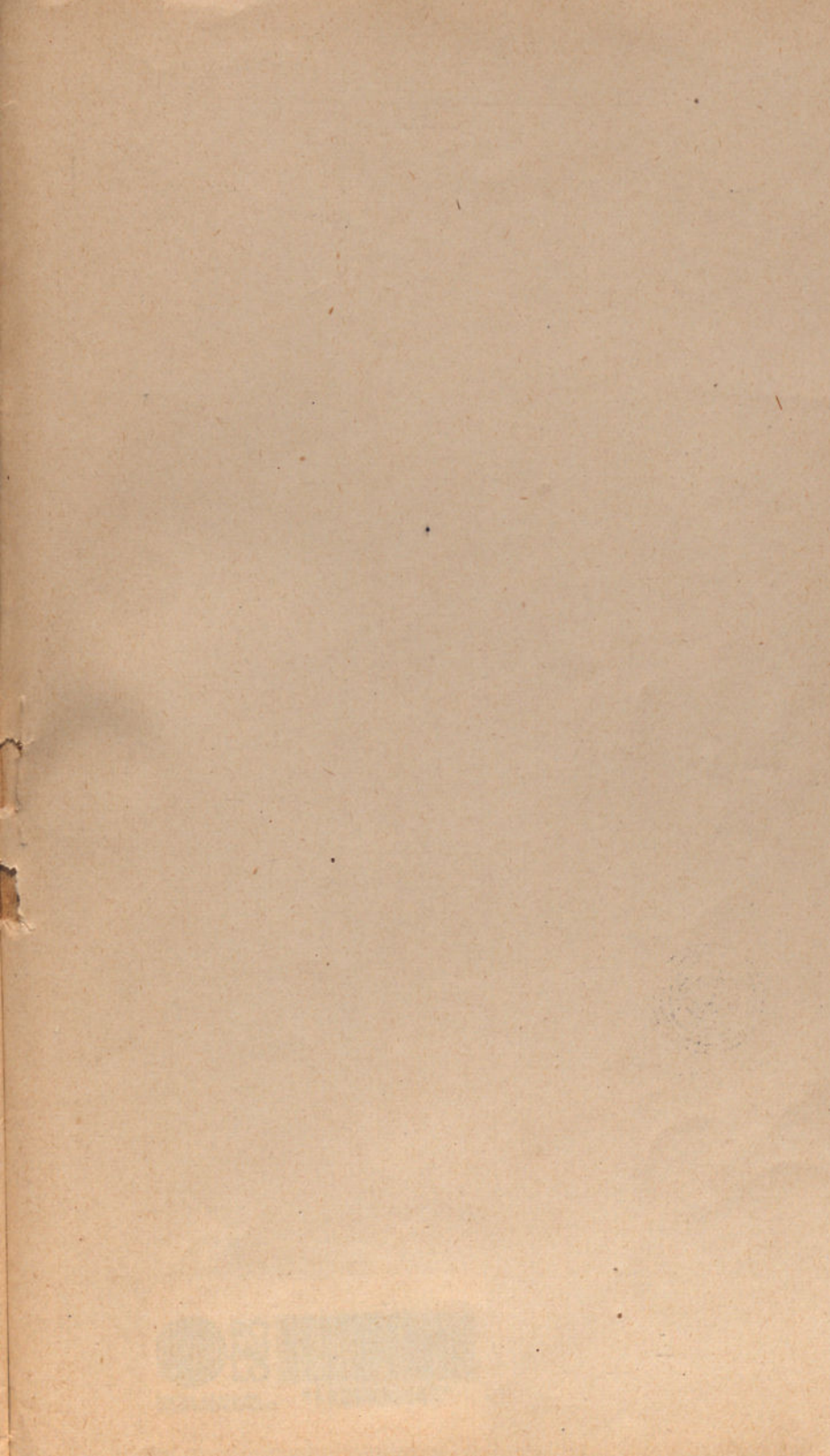
Metchnikoff — L'immunité dans les maladies infectieuses. (Paris 1901.)

Römer — La teoria delle catene laterali di Erlich 1905.

Blasi — Sulla natura delle aggressine sul loro comportamento rispetto alle opsonine. (Inst. Ag. Univ. Rome. Ann. Ig. Iper.)

Sousa — Sobre immuidade. (These de Lisboa, 1906.)







RÓ
MU
LO

CENTRO CIÊNCIA VIVA
UNIVERSIDADE COIMBRA



1329689958

