

**Estudo sobre um estafibacteriofago isolado
de polpa vacinica**

pelo

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO

1.º Assistente do Instituto de Higiene de S. Paulo

I

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE A IDENTIDADE DOS FENOMENOS DE TWORT E DE D'ÉRELLE (*)

Coube a TWORT (1), incontestavelmente, o merito da descoberta de agentes bacterioliticos filtraveis e transmissiveis.

Foi em 1915 que TWORT apresentou a sua primeira memoria sobre alterações bacterianas produzindo-se em série. Verificou que esse principio obtido da linfa vacinica glicerinada de vitelo, tinha o seu maximo poder litico sobre alguns micro-organismos mais sensiveis. Experimentou esses agentes liticos principalmente sobre diversos micrococcos isolados da propria linfa vacinica e tambem sobre **Staphylococcus aureus** e **albus** isolados de furuncullos do homem, obtendo menor ação sobre estes do que sobre aqueles.

Dois anos mais tarde iniciaram-se os estudos de d'HÉRELLE sobre a Bacteriofagia.

Contudo, d'HÉRELLE absolutamente não admite serem identicos os fenomenos observados por êle e por TWORT. Diz não poder compreender como o fenomeno observado por TWORT, em que a cultura sobre gelose se transforma em uma camada vitrosa formada pela fragmentação dos corpos bacterianos que ai se apresentam em pequenas granulações coloraveis em vermelho pelo Giemsa, possa ser confundido com o da bacteriofagia, que é um fenomeno de dissolução dos corpos bacterianos, "dissolução sem residuo". E sobre o assunto diz d'HÉRELLE (2) — "Aucun auteur n'a essayé la moindre explication, tous se contentent d'affirmer qu'il y a similitude, sans preuve, sans discussion".

Ora, ultimamente o assunto tem sido abundantemente discutido por GRATIA, e provas foram apresentadas, prin-

(*) Trabalho apresentado á Secção de Biologia da Associação Paulista de Medicina, em: 5-II-933. Publicado na revista da mesma Associação. Vol. II — Março de 1933. — N. 3.

principalmente por BORDET e CIUCA, JAUMAIN, BRUYNOGHE e MAISIN, que nos induzem a crer na prioridade de TWORT na descoberta do fenomeno, o que justifica a lembrança de GRATIA de se dar á bacteriofagia o nome de fenomeno de TWORT-D'HÉRELLE.

Da substancia vitrosa de TWORT consegue-se facilmente isolar o bacteriofago; mas d'HÉRELLE afirma que nesse caso trata-se da coexistencia na polpa vacinica dos dois principios liticos para o estafilococo — o seu e o de TWORT.

GRATIA conseguiu reproduzir o fenomeno de TWORT utilizando-se de um bacteriofago estafilococico autentico, perfeitamente purificado por sucessivos isolamentos; o mesmo tendo obtido tambem com um bacteriofago não proveniente de vacina.

Para d'HÉRELLE, o fenomeno observado por TWORT só apresenta de comum com o seu a reprodução em série.

Um dos pontos em que d'HÉRELLE se baseia para não admitir a identidade dos fenomenos é a progressão da transformação vitrosa assinalada por TWORT, afirmando que com o bacteriofago isso não se observa, pois as manchas circulares, nuas, sem traço de cultura, características da bacteriofagia ficam inmutaveis durante muitos dias, sem invadir a cultura, sem progredir, sem se estender.

Experiencias muito interessantes foram feitas por GRATIA (3), recentemente, deixando demonstrada mais uma vez a transformação vitrosa de TWORT com um bacteriofago, como tambem a progressão dessa transformação contestada por d'HÉRELLE. As seis experiencias apresentadas por GRATIA e acompanhadas de nitidas figuras não deixam duvidas sobre a identidade dos fenomenos. Na sua VI experiencia mostrou tambem que não existe a menor diferença entre a ação do bacteriofago e a materia vitrosa de TWORT. Tocando lados diametralmente opostos de uma mesma colonia de um estafilococo sensível, um lado com o material vitroso de TWORT, o outro com um estafibacteriofago, observou que a colonia ia sendo invadida ou transformada em substancia vitrosa igualmente dos dois lados, e que essa transformação progredia lentamente, encontrando-se na linha mediana no quarto dia.

D'HÉRELLE (4) diz que repetiu todas as experiencias de GRATIA e afirma ter GRATIA obtido apenas cultura secundaria, confundindo-a com a materia vitrosa granular de TWORT.

As finas granulações dessa materia vitrosa são incultiváveis segundo o trabalho original de TWORT.

D'HÉRELLE examinando a camada vitrosa obtida pelos processos de GRATIA afirma que ela apresenta bacterias coloraveis, morfológicamente semelhantes ás bacterias da cultura primaria e perfeitamente cultivaveis.

D'HÉRELLE termina deixando afirmado que GRATIA confundiu cultura secundaria com a materia vitrosa granular de TWORT, o que poderá ser demonstrado por um simples exame microscopico. E diz: "O que se obtem, o que GRATIA obteve e confundiu com a camada vitrosa do fenomeno de TWORT, são culturas secundarias de bacterias resistentes ao bacteriofago: a camada mais ou menos fina examinada ao microscopio mostra unicamente bacterias perfeitamente coloraveis, morfológicamente semelhantes ás bacterias da cultura primaria".

Em seguida foi apresentado por GRATIA (5) resposta a essa confusão de fenomenos tão diferentes que d'HÉRELLE lhe attribuia.

Diz GRATIA que ha muito tempo que examina ao microscopio essa massa transparente; que a tem colorido pelo metodo de GRAM, observando não ser ela formada por microbios resistentes, mas sim raros elementos isolados, que se encontram no meio de massa amorfa vagamente granulosa e que não toma o Gram.

Essa massa amorfa é que é constituída por fina granulação. E foram essas granulações que BORREL apresentou ao 1.º Congresso de Microbiologia, em julho de 1930, como sendo o "virus bacteriofago".

GRATIA apresenta figuras mostrando o material vitroso de TWORT colorido pelo metodo de Gram em que se observam alguns cocos resistentes Gram positivos, raros, no meio da massa amorfa, Gram negativa, do material vitroso, terminando por dizer que não pôde haver confusão possivel entre material vitroso e cultura secundaria.

TWORT, não se baseando só nas experiencias de GRATIA, como afirma d'HÉRELLE, mas nas suas proprias, e trabalhando com autenticos bacteriofagos diz considerar que as descrições dadas ao bacteriofago são perfeitamente applicaveis aos seus agentes bacterioliticos transmissiveis.

Durante a grande guerra das Nações, TWORT perdeu as suas fontes originais de agentes liticos, mas reconhece que o que GRATIA e ele têm obtido com legitimos bacteriofagos é o mesmo principio que descrevera em 1915. Acha que

as bacterias sendo atacadas, dissolvidas, lisadas ou “fagadas” pelo agente ativo, o resultado em meio solido variará de acordo com o numero de bacterias presentes; sendo atacada uma cultura já visivel, poderá resultar uma massa vitrosa transparente, visivel; se o agente atuar antes que o crescimento seja visivel, onde ele estiver aparecerão manchas claras, sem nenhum sinal de crescimento bacteriano.

Um e outro fenomeno ficam na dependencia da técnica empregada, podendo variar tambem de acôrdo com a raça bacteriana, o principio litico, sua atividade, etc..

Ainda em artigo recente TWORT (6) lembra que na sua memoria original dizia ser provavel encontrar o seu principio ativo em casos de disenteria e outras afecções vizinhas — “Cest une coincidence curieuse que ce soit précisément dans ces affections que d’HÉRELLE ait obtenu ses premières souches de principe actif. Il pourrait-aussi être remarqué que si j’ai été empêché, par mon service á la guerre, de poursuivre des experiences de vaccination, j’ai suggéré dans mon mémoire que des essais thérapeutiques devraient être entrepris”.

A nossa impressão é que os fenomenos de TWORT e de d’HÉRELLE são identicos.

Pela leitura cuidadosa do trabalho original de TWORT vê-se, perfeitamente, que as linhas gerais dos estudos de d’HERELLE sobre a Bacteriofagia foram nele sugeridas cabendo a este dar o grande desenvolvimento que o assunto hoje apresenta.

Não podemos, contudo, deixar de assinalar o extraordinario valor dos trabalhos de d’HÉRELLE que foi quem indiscutivelmente deu todo o desenvolvimento que o assunto merecia, abrindo caminho para inumeras pesquisas a que se tem dedicado não pequeno numero de cientistas.

II

O BACTERIOFAGO ESTAFILOCOCCICO NAS POLPAS VACINICAS

A primeira verificação da existencia nas polpas vacinicas de um agente bacteriolitico para o estafilococo, foi feita em 1915, por TWORT, como vimos no capitulo precedente.

Coube a GRATIA, em 1930, identificar esse principio litico ao bacteriofago.

Não obstante ser o bacteriofago estafilococico isolado de polpas vacinicas o primeiro bacteriofago conhecido, são raros os trabalhos em que são estudados os principios liticos dessas polpas.

Entre nós J. L. MONTEIRO (7) apresentou um trabalho sobre "O bacteriofago nas polpas vacinicas glicerinadas", tendo obtido um bacteriofago de ação manifesta para estafilococos isolados das proprias polpas vacinicas, como tambem para alguns de origem humana. Não encontrou nesse principio litico ação alguma sobre germens do grupo coli-tifico-disenterico; no entanto, das fézes de alguns dos vitelos donde provinham as polpas, isolou bacteriofago de ação sobre germens desse grupo. Sendo dificil evitar a contaminação fecal do campo vacinado do vitelo, era de esperar que o bacteriofago isolado, se tivesse essa proveniencia, conservasse ainda alguma ação sobre os germens do grupo coli-tifico.

GRATIA, nos seus diversos trabalhos sobre o assunto, verificou a presença constante do bacteriofago estafilococico na polpa vacinica entretida em serie sobre a pele de vitelos, e tambem a sua ausencia nas fézes desses animais, lembrando não ser obrigatoria essa sua origem. Na realidade o bacteriofago é encontrado de acôrdo com o grupo de microbios da região: no intestino, agindo sobre bacterias do grupo coli-tifico-disenterico; nas afecções cutaneas, para os microbios de sua predileção, como os estafilococos, etc.

Em 1931 GRATIA (8) teve ocasião de apresentar um trabalho no qual procurou verificar a presença do bacteriofago estafilococico em um grande numero de linfas vacinicas de diversas proveniencias: Strasburgo, Dresden, Madrid, Boston, Pearl River (U. S. A.), Philadelphia, Indianapolis, New Brunswick (N. Y.), Paris, Viena, Colonha e Londres. Dessas polpas vacinicas, umas eram polpas brutas frescas, outras glicerinadas e outras polpas brutas sêcas.

De 17 amostras conseguiu em um primeiro ensaio isolar o bacteriofago estafilococico de 15.

De grande importancia pratica foram as suas observações sobre serem esses bacteriofagos divididos em dois grupos: um, de bacteriofagos de ação litica indistintamente para os estafilococos **aureus**, **albus** e **citreus**, quer sejam patogenicos ou saprofitas; outro, compreendendo a grande

maioria dos bacteriofagos isolados (12 vezes em 17 casos), era ativo apenas para algumas raças de *Staphylococcus albus*.

Ao primeiro grupo GRATIA denominou de **polivalentes**; ao segundo, **monovalentes**.

Verificou que todos os bacteriofagos isolados do primeiro grupo pertenciam a um unico bacteriofago polivalente, e que os do segundo tambem pertenciam a um só e mesmo bacteriofago monovalente. Ha, contudo, entre os representantes de cada grupo, pequenas diferenças.

Verificou tambem que esses dois grupos ainda se distinguem pelas suas propriedades antigenicas e que se portavam diferentemente na aptidão de produzir a materia vitrosa de TWORT. Enquanto os estafibacteriofagos do primeiro grupo são mediocres nessa transformação, os do segundo dão em geral nitidamente o fenomeno de TWORT.

Ainda outra diferença interessante observou GRATIA entre esses dois grupos de bacteriofagos: o grupo dos bacteriofagos polivalentes formando manchas pequenas; o dos monovalentes produzindo manchas comparativamente muito maiores.

Já BAIL (1922) e HADLEY (1924) para o *B. disenteriae* "Shiga" e ASHESHOW (1922) para o *B. disenteriae* "Flexner", demonstraram que num bacteriofago do grupo coli-tifico-disenterico pôdem existir duas variedades de bacteriofagos, dando uns grandes manchas e outros pequenas.

Os estudos de BAIL assinalam a existencia de bacteriofagos de grandes, médias e pequenas manchas fazendo crêr que essas variações correspondem a diferenças na ação do principio litico sobre os microbios sensiveis; e mais ainda: que os de pequenas manchas são estaveis, ao passo que os de grandes manchas pôdem ser dissociados em grandes e pequenas.

Tambem com um bacteriofago ativo para o *B. paratuberculosis* B, HADLEY e DABNEY (1928) demonstraram a existencia de principios de grandes e pequenas manchas, o mesmo sendo observado com bacteriofagos ativos para o *B. disenteriae* "Y" por DENYS (9).

ARKWRIGHT (1920) e DE KRUIF (1921) fizeram estudos sobre a dissociação das bacterias do grupo coli-tifico-disenterico em dois tipos: R (rough) e S (smooth), correspondendo este a colonias convexas, lisas e sendo virulento; aquele, a colonias chatas, rugosas, mostrando-se avirulento.

Ora, estudos identicos estão sendo feitos com as colonias ou manchas dos bacteriofagos.

Ha os estudos iniciais de BORDET sobre a ação dos principios “fortes” e principios “fracos” sobre colonias dos tipos R e S do **B. coli**.

Em 1923 GRATIA (10) verificou que os principios liticos fracos davam grandes manchas e que os principios fortes davam grandes e pequenas, tendo tambem ocasião de isolar um **B. coli S (smooth)** e um **B. coli R (rough)**, demonstrando que o bacteriofago de grandes manchas atacava o tipo S, respeitando o tipo R; dando-se o inverso com o bacteriofago de pequenas manchas, cuja ação litica manifesta-se para o tipo R, embora excepcionalmente tambem para o tipo S.

DENYS, no seu trabalho acima citado, verificou a existencia de bacteriofagos ativos para o **B. disenteriae “Y”**, uns lisando só o tipo S, outros só o tipo R e alguns lisando esses dois tipos. Os principios ativos para o tipo S são de grandes manchas, constituindo um grupo homogeneo, ao passo que os principios ativos para o tipo R formam um grupo heterogeneo, diferindo quasi todos entre eles, principalmente pelo aspecto de suas manchas.

São muito interessantes estas relações entre manchas de bacteriofagos ou colonias de bacteriofagos e colonias de bacterias.

III

NOSSAS EXPERIENCIAS

A existencia constante do estafibacteriofago nas polpas vacinicas sendo um fato já perfeitamente demonstrado, nos levou a fazer o nosso estudo noutra sentido, no da virulencia desses bacteriofagos, sua exaltação, conservação e obtenção de um bacteriofago polivalente para fins terapeuticos.

No estudo da virulencia escolhemos o processo que nos pareceu melhor: a contagem das manchas, ou colonias de bacteriofagos, seguindo a técnica de d'HÉRELLE.

Primeira serie de experiencias

A polpa vacinica que nos serviu para estudo foi recebida do Instituto de Butantan, com a seguinte nota:

“Polpa vacínica n. 4.689.

Data da colheita: 23-VII-1930.

Emulsionada em 4 partes de glicerina”.

Para a pesquisa do bacteriófago semeamos 1 c.c. dessa polpa vacínica em um pequeno balão com 50 c.c. de caldo comum (p H = 7,8). (*)

Após 48 horas de estufa a 37°, centrifugamos e filtramos em vela Chamberland L3, sob a pressão negativa de 300 a 350 milímetros de mercúrio.

A esse filtrado denominamos B V B, e foi obtido em 23-X-931, portanto, um ano e tres meses após a colheita da polpa vacínica, conservada no “frigo” a mais ou menos 8°.

Da mesma polpa vacínica isolamos tres estafilococos, dos quais dois dourados — *Staphylococcus aureus* (St 1 e St 2) e um branco — *Staphylococcus albus* (St 3).

Com esses estafilococos e mais alguns *aureus* e *citreus* de procedencia humana, fizemos experiencias para verificar se o filtrado B V B apresentava bacteriófago para esses cocos.

Para cada cocco tomam-se dois tubos contendo 4,5 c. c. de caldo comum: no 1.º colocam-se 0,5 c. c. do filtrado, servindo o 2.º de testemunha. A ambos junta-se emulsão do cocco a examinar (cultura de 24 horas), de maneira a ficar a emulsão nos tubos com aproximadamente 250 milhões de germens por c. c. Os tubos depois de agitados são colocados na estufa a 37°.

Após 24 horas de estufa verifica-se o resultado no caldo, comparando-se a lise com o tubo testemunha, sendo ao mesmo tempo passada uma alsa do material de cada tubo em estria sobre gelose inclinada.

Esses tubos são colocados na estufa a 37°, durante 24 horas, lendo-se em seguida o resultado, comparando-se o aspecto da cultura ao longo da estria, nos dois tubos.

No quadro abaixo damos o resultado da primeira verificação da existencia do principio litico no filtrado B V B para oito estafilococos:

(*) Todas as nossas experiencias foram feitas, tanto em caldo como em gelose, com p. H = 7,8.

QUADRO I

CULTURAS	Resultado no caldo	Resultado na gelose
Staphylococcus aureus—St 1	0	0
” ” .. — St 2	* *	* *
” ” .. — St 7	0	0
” albus ... — St 3	0	0
” citreus. — St 4	0	0
” ” .. — St 5	0	0
” ” .. — St 6	0	0
” ” .. — St 8	0	0

Significação dos sinais acima e que serão usados em experiências identicas:

Em caldo:

- 0 Turvação como no tubo testemunha.
- * Lise apenas perceptivel.
- ** Lise perceptivel.
- *** Lise com ligeira turvação do caldo.
- **** Lise total aparente.

Em gelose (estria):

- 0 Cultura homogenea em toda a estria, semelhante ao tubo testemunha.
- * Cultura ligeiramente rugosa em toda a extensão da estria.
- ** Cultura rugosa com numerosas zonas claras e colonias atipicas.
- *** Cultura interrompida apresentando grandes espaços claros e colonias atipicas.
- **** Somente raras colonias atipicas.
- ***** Nenhuma colonia, ficando o meio com a apparencia de esteril.

O nosso filtrado B V B, de acôrdo com as experiencias do Quadro 1, apenas revela a presença de principio litico para o *Staphylococcus aureus* — St 2, isolado da propria polpa vacinica em estudo.

Fizemos cinco passagens do mesmo filtrado com o estafilococo St 2, e vamos em seguida verificar a virulencia desses filtrados.

Dada a existencia do bacteriofago na forma de corpusculos, existencia essa facilmente demonstravel, d'HÉRELLE faz a dosagem de um bacteriofago pela contagem desses corpusculos, que se multiplicam á custa das bacterias e cuja virulencia é proporcional á multiplicação de cada um deles.

A sua técnica, em linhas gerais, é a seguinte:

Toma-se uma série de 10 a 12 tubos, contendo cada um 4,5 cc. de uma emulsão em caldo da bacteria sensivel, com 250 milhões de germens por c.c., provindos estes germens de uma cultura em gelose, de 24 horas.

Colocam-se 0,5 c.c. do bacteriofago a dosar no primeiro tubo da série, obtendo-se assim a primeira diluição 10^{-1} (notação logaritmica). Agita-se bem.

Tomam-se 0,5 c.c. da primeira diluição colocando-os no segundo tubo, o que dará a diluição 10^{-2} , e 0,02 em um tubo de gelose inclinada, extendendo-se da melhor maneira possivel sem misturar com a agua de condensação. (sendo preferivel retira-la na vespera).

Sucessivamente vão sendo feitas as diluições e passadas para gelose, tendo-se o cuidado indispensavel de usar uma pipeta para cada diluição.

Fazendo-se a dosagem em placas, tomam-se 0,55 c.c. de cada diluição, colocando-se 0,50 c.c. no tubo seguinte da série e 0,05 na placa de gelose, em seguida extendendo-se bem.

Por ser mais facil preferimos fazer a contagem dos corpusculos em tubos de gelose.

O calculo para a contagem dos corpusculos é feito da seguinte maneira:

Tomemos o exemplo da dosagem do da 3.^a passagem (Estafibacteriofago B V B 3). Em 0,02 c.c. da diluição 10^{-6} foram encontradas 36 manchas de corpusculos, devendo 1 c.c. conter 50 vezes mais, isto é, 1,800 a suspensão original deverá conter 1.800×10^6 igual a 1.800.000.000 de corpusculos por centimetro cubico.

Na dosagem em placas a quantidade da diluição usada é 0,05 c.c., portanto, 1 c.c. terá 20 vezes mais corpusculos,

sendo esse numero de corpusculos multiplicado pelo titulo da diluição.

Damos a seguir os quadros demonstrativos das dosagens, assinalando de um lado, o resultado da lise no caldo, e do outro, o resultado em gelose.

QUADRO 2

Dosagem do estafibacteriofago B V B

(Filtrado da polpa vacinica n.º 4689)

Diluições	Resultado em caldo	Resultado em gelose
	24 horas a 37°	24 horas a 37°
10 ⁻¹	* *	Camada bacteriana rugosa
10 ⁻²	0	Camada bacteriana normal, homogenea
10 ⁻³	0	Camada bacteriana normal, homogenea
10 ⁻⁴	0	Camada bacteriana normal, homogenea

Este filtrado é o mesmo do Quadro 1, no qual fizemos apenas a verificação de existencia de principio litico para oito estafilococos.

Nesta dosagem para contagem de corpusculos do B V B, na quantidade de 0,02 c.c. passada para gelose — não foram constatados corpusculos, partindo da diluição 10⁻¹.

Feita a primeira passagem do B V B com o estafilococo sensivel St 2, denominamos B V B 1 essa primeira passagem, cuja dosagem é a seguinte:

QUADRO 3

Dosagem do estafibacteriofago B V B 1

(1.^a passagem)

Diluições	Resultado em caldo	Resultado em gelose
	24 horas a 37°	24 horas a 37°
10 ⁻¹	* * * *	Manchas incontáveis
10 ⁻²	* * * *	157 manchas
10 ⁻³	* * * *	30 manchas (1.500.000 p c.c.)
10 ⁻⁴	*	8 manchas
10 ⁻⁵	0	Cultura normal, homogenea
10 ⁻⁶	0	" " "

Resultado: 1.500.000 corpusculos por c.c.

Fazemos o calculo para a contagem de corpusculos tomando o maior numero abaixo de 100 contado nos tubos. Em tubo de gelose a contagem acima de 100 manchas, não póde ser perfeita, visto a existencia de manchas confluentes.

Em seguida damos as outras passagens.

QUADRO 4

Dosagem do estafibacteriofago B V B 2

(2.^a passagem)

Diluições	Resultado em caldo	Resultado em gelose
	24 horas a 37°	24 horas a 37°
10 ⁻¹	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻²	* * * *	Manchas incontáveis, confluentes
10 ⁻³	* * * *	271 manchas
10 ⁻⁴	*	20 manchas (10.000.000 p c.c.)
10 ⁻⁵	0	3 manchas
10 ⁻⁶	0	Cultura normal, homogênea
10 ⁻⁷	0	" " "
10 ⁻⁸	0	" " "
10 ⁻⁹	0	" " "
10 ⁻¹⁰	0	" " "

Resultado: 10.000.000 de corpusculos por c.c.

QUADRO 5

Dosagem do estafibacteriofago B V B 3

(3.^a passagem)

Diluições	Resultado em caldo	Resultado em gelose
	24 horas a 37°	24 horas a 37°
10 ⁻¹	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻²	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻³	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻⁴	* * * *	Manchas incontáveis, confluentes
10 ⁻⁵	* * * *	265 manchas
10 ⁻⁶	* * * *	36 manchas (1.800.000.000 p c.c.)
10 ⁻⁷	* * *	4 manchas
10 ⁻⁸	0	Cultura normal, homogenea
10 ⁻⁹	0	" " "
10 ⁻¹⁰	0	" " "

Resultado: 1.800.000.000 corpusculos por c.c.

QUADRO 6

Dosagem do estafibacteriofago B V B 4

(4.^a passagem)

Diluições	Resultado em caldo	Resultado em gelose
	24 horas a 37°	24 horas a 37°
10 ⁻¹	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻²	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻³	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻⁴	* * * *	Manchas incontáveis
10 ⁻⁵	* * * *	88 manchas (440.000.000 p c.c.)
10 ⁻⁶	* * *	8 manchas
10 ⁻⁷	* * *	Cultura normal, homogênea
10 ⁻⁸	* *	" " "
10 ⁻⁹	0	" " "
10 ⁻¹⁰	0	" " "

Resultado: 440.000.000 corpúsculos por c.c.

QUADRO 7

Dosagem do estafibacteriofago B V B 5

(5.^a passagem)

Diluições	Resultado em caldo	Resultado em gelose
	24 horas a 37°	24 horas a 37°
10 ⁻¹	* * * *	Camada bacteriana anormal, rugosa
10 ⁻²	* * *	Manchas incontáveis, confluentes
10 ⁻³	* * *	11 manchas (550.000 p c.c)
10 ⁻⁴	* *	1 mancha
10 ⁻⁵	* *	Cultura normal, homogenea
10 ⁻⁶	*	" " "
10 ⁻⁷	0	" " "
10 ⁻⁸	0	" " "
10 ⁻⁹	0	" " "
10 ⁻¹⁰	0	" " "

Resultado: 550.000 corpusculos por c.c.

Nesta primeira série de experiencias constatamos a presença de principio litico na polpa vacinica n. 4689 para um estafilococo dourado, dos oito estafilococos experimentados .

Essa polpa nos foi enviada do Instituto de Butantan com a indicação de ter sido colhida em 23-VII-1930. As nossas experiencias foram iniciadas em 23-X-1931.

Portanto, esse principio litico foi encontrado nessa polpa após um ano e três mēses a sua colheita.

Esse estafibacteriofago cuja atividade era insignificante, em três passagens atingiu o maximo da sua virulencia, virulencia que se foi exaltando progressivamente, para cair da quarta passagem em diante, conforme podemos ver no seguinte resumo:

B V B 1	1.500.000	Corpusculos	por	c. c.
B V B 2	10.000.000	"	"	"
B V B 3	1.800.000.000	"	"	"
B V B 4	440.000.000	"	"	"
B V B 5	550.000	"	"	"

Segunda série de experiencias

Em 16--1-932 vacinámos um coelho com a mesma polpa vacinica n. 4689 escarificando uma pequena zona.

Houve desenvolvimento regular da vacina, que foi colhida cinco dias depois.

Tomámos 1 c. c. dessa polpa, e semeámos em um balão com 50 c. c. de caldo. Após incubação a 37° durante 48 horas, centrifugámos e filtrámos em vela Chamberland L. 3. Ao filtrado denominamos B V B C.

Como na primeira série de experiencias, fizemos identicas pesquisas com o filtrado B V B C para verificar a existencia de principio litico, usando os mesmos estafilococos.

Esse filtrado mostrou ligeira ação somente para o *Staphylococcus aureus* St. 2, lise apenas perceptivel (*).

Fizemos em seguida nove passagens do filtrado B V B C com o estafilococo sensível St. 2.

Dosámos pela contagem de corpusculos todos esses filtros, em tudo repetindo o que fôra feito com B V B na nossa primeira série de experiencias.

A seguir damos resumidamente o resultado dessa contagem:

B V B C 1	112.000.000	corpúsculos por c.c.
B V B C 2	1.560.000.000	" " "
B V B C 3	1.635.000.000	" " "
B V B C 4	200.000.000	" " "
B V B C 5	420.000.000	" " "
B V B C 6	420.000.000	" " "
B V B C 7	160.000.000	" " "
B V B C 8	160.000.000	" " "
B V B C 9	100.000.000	" " "

* * *

Esta segunda série de experiencias nos mostra que tanto a polpa vacinica n. 4689 de vitelo, como esta de coelho (obtida pela passagem daquela no coelho), forneceram dois estafibacteriofagos que indiscutivelmente são identicos, sendo a mesma raça de bacteriofago. Ambos manifestaram ação litica apenas para o **Staphylococcus aureus** St. 2, dos oito estafilococos experimentados.

A virulencia desses dois filtrados foi sendo exaltada até a terceira passagem para dai em diante cair.

Terceira série de experiencias

Tomámos a mesma polpa vacinica glicerizada n. 4689, que nos tem servido desde a primeira experiencia e que mantemos sempre conservada no "frigo", em temperatura aproximadamente de 8°C.

Essa polpa, como vimos acima, foi colhida em 23-VII-930.

Um ano e tres menses após a sua colheita, em 23-X-931, fizemos a nossa primeira serie de experiencias isolando o estafibacteriofago B V B.

Agora, 26-VII-932, portanto, dois anos e tres dias após a colheita dessa polpa, repetimos as pesquisas da nossa primeira serie de experiencias, com o fim de verificar se, passados dois anos, ainda poderíamos obter o mesmo estafibacteriofago e qual as modificações da sua virulencia.

O filtrado obtido, que denominamos B V B (2.a), revelou uma lise apenas perceptivel (*), sómente para o **Staphylococcus aureus** St. 2, nenhuma ação mostrando para os ou-

tros, fato identico ao observado pelos estafibacteriofagos B V B e B V B C .

Com o B V B (2.a) fizemos quatro passagens, com o estafilococo sensivel.

O resultado dessas passagens foi o seguinte:

B V B 1 (2.a) . . .	475.000	corpúsculos por c. c.
B V B 2 (2.a) . . .	1.350.000.000	” ” ”
B V B 2 (2.a) . . .	650.000.000	” ” ”
B V B 4 (2.a) . . .	190.000.000	” ” ”

* * *

Esta terceira série de experiencias nos mostra que da polpa vacinica glicerizada n. 4689, decorridos dois anos e tres dias de conservação no frigo, a 8°C, ainda pudemos isolar um estafibacteriofago, em tudo semelhante ao isolado um ano antes, apenas mostrando-se um pouco menos virulento.

Quarta serie de experiencias:

As nossas experiencias foram feitas na estufa a 37°. Con- vem, contudo, assinalar que d'HE'RELIE verificou ser a temperatura de 32° a melhor para o fenomeno da bacterio- fagia, principalmente em se tratando de bacteriofagos disen- tericos e estafilococicos, embora comumente vejamos traba- lhos nesse sentido feitos a 37°.

A falta, nos laboratorios, de uma estufa a 32° talvez seja a razão pela qual é usada a estufa a 37°.

HAUDUROY (11) aconselha a temperatura do labo- ratorio, aproximadamente 20°.

De acôrdo com as nossas experiencias, aconselhamos a temperatura do laboratorio de 20° a 25°, cujos resultados são melhores do que a 37°, principalmente quando se não traba- lha com bacteriofagos de grande virulencia.

Com bacteriofagos de fraca e média virulencia as cultu- ras secundarias aparecem em poucas horas a 37°, por ser óti- ma esta temperatura ao desenvolvimento da maior parte das bacterias patogenicas, não dando tempo para a ação completa de bacteriofago.

Vamos comentar com exemplos.

Quando dosamos o B V B C 6 (segunda série de experiências) tivemos ocasião de fazer ao mesmo tempo duas séries de diluições até 10^{-10} , rigorosamente iguais, colocando uma na estufa a 37° , deixando a outra na temperatura do laboratório (nessa ocasião a 23°) e fazendo a leitura do resultado após 24 e 48 horas, como se pôde vêr no quadro seguinte:

QUADRO 8

ESTAFIBACTERIOFAGO B V B C 6

(Ação litica sobre o *Staphylococcus aureus* St 2)

Diluições	Leitura após 24 horas		Leitura após 48 horas	
	37°	Temp. do laboratório 23°	37°	Temp. do laboratório 23°
10^{-1}	—	****	*	****
10^{-2}	*	****	**	****
10^{-3}	**	****	**	****
10^{-4}	****	****	**	****
10^{-5}	***	****	*	****
10^{-6}	***	****	*	****
10^{-7}	***	****	—	****
10^{-8}	**	****	—	****
10^{-9}	**	*	—	****
10^{-10}	—	—	—	****

Vê-se, no Quadro 8, que na temperatura do laboratório a lise foi muito mais ativa e uniforme.

A 37°, no fim de 48 horas, as culturas secundárias turvam novamente o caldo com maior ou menor intensidade.

Vê-se, também, nesse quadro, que na temperatura de 37°, a diluição 10^{-1} , com maior quantidade de bacteriófago, não apresenta sinal de lise em 24 horas. Observa-se o mesmo nas diluições 10^{-2} e 10^{-3} , que deveriam estar mais lisadas que as seguintes.

O fato explica-se da seguinte maneira: nas primeiras diluições, pela maior quantidade de bacteriófago nelas existente, dá-se a lise em poucas horas (quatro a seis). Tratando-se de bacteriófagos de fraca ou média virulência, algumas horas após a lise aparecem as culturas secundárias, razão pela qual a leitura feita após 24 horas poderá dar o resultado acima.

Com bacteriófagos mais virulentos a lise inicial mantém-se, mesmo a 37°, como pôde ser visto na dosagem do B V B 3 (Quadro 5).

Na temperatura ambiente, com bacteriófagos de fraca virulência, embora mais lentamente se processe a lise, esta se mantém mais facilmente.

Vamos dar um exemplo que nos servirá para deixar esse fato demonstrado, permitindo-nos também verificar a diminuição de virulência do bacteriófago em estudo, após alguns meses de conservação.

O nosso estafibacteriófago B V B 3, foi dosado logo após a sua filtração, isto é, em 13-1-932, cujo resultado está no Quadro 5.

Nota-se nesse quadro que a lise completa foi até 10^{-6} , a 37°, em 24 horas de estufa. Nessa ocasião a dosagem revelou a presença de 1.800.000.000 de corpusculos por c. c.

Ao fim de sete meses de conservação na temperatura do laboratório, em empolas fechadas, fizemos nova dosagem, isto em 17-8-932, em duas séries de tubos: uma ficando na temperatura do laboratório e outra a 37°. Fizemos também a contagem de corpusculos, em tudo seguindo a mesma técnica.

A contagem de corpusculos revelou a presença de 800.000.000 por c. c., portanto, menos da metade da primeira dosagem.

O resultado da lise foi o seguinte:

QUADRO 9
ESTAFIBACTERIOFAGO B V B 3
(Após seis meses de conservação)

Dosagem na estufa a 37°

	Caldo 3 horas	Caldo 5 horas	Caldo 1 dia	Caldo 2 dias	Caldo 3 dias	Caldo 4 dias	Caldo 5 dias	Caldo 7 dias	Caldo 10 dias
10-1	***	****	**	*	*	*	*	*	*
10-2	*	****	***	**	*	*	*	*	*
10-3	0	***	***	**	**	*	*	*	*
10-4	0	*	**	**	**	**	**	*	*
10-5	0	0	**	**	**	**	*	*	*
10-6	0	0	***	**	*	*	**	*	*
10-7	0	0	*	*	*	*	*	*	*
10-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

QUADRO 10

ESTAFIBACTERIOFAGO B V B 3
(Após seis meses de conservação)

Dosagem na temperatura do laboratório (23°)

	Caldo 3 horas	Caldo 5 horas	Caldo 1 dia	Caldo 2 dias	Caldo 3 dias	Caldo 4 dias	Caldo 5 dias	Caldo 7 dias	Caldo 10 dias
10-1	0	0	***	***	***	***	***	***	***
10-2	0	0	***	***	***	***	***	***	***
10-3	0	0	**	***	***	***	***	***	***
10-4	0	0	*	**	***	***	***	***	***
10-5	0	0	*	**	***	***	***	***	***
10-6	0	0	0	0	***	***	***	***	***
10-7	0	0	0	0	0	***	***	***	0
10-8	0	0	0	0	0	***	***	***	**
10-9	0	0	0	0	0	0	0	0	***
10-10	0	0	0	0	0	**	***	***	0

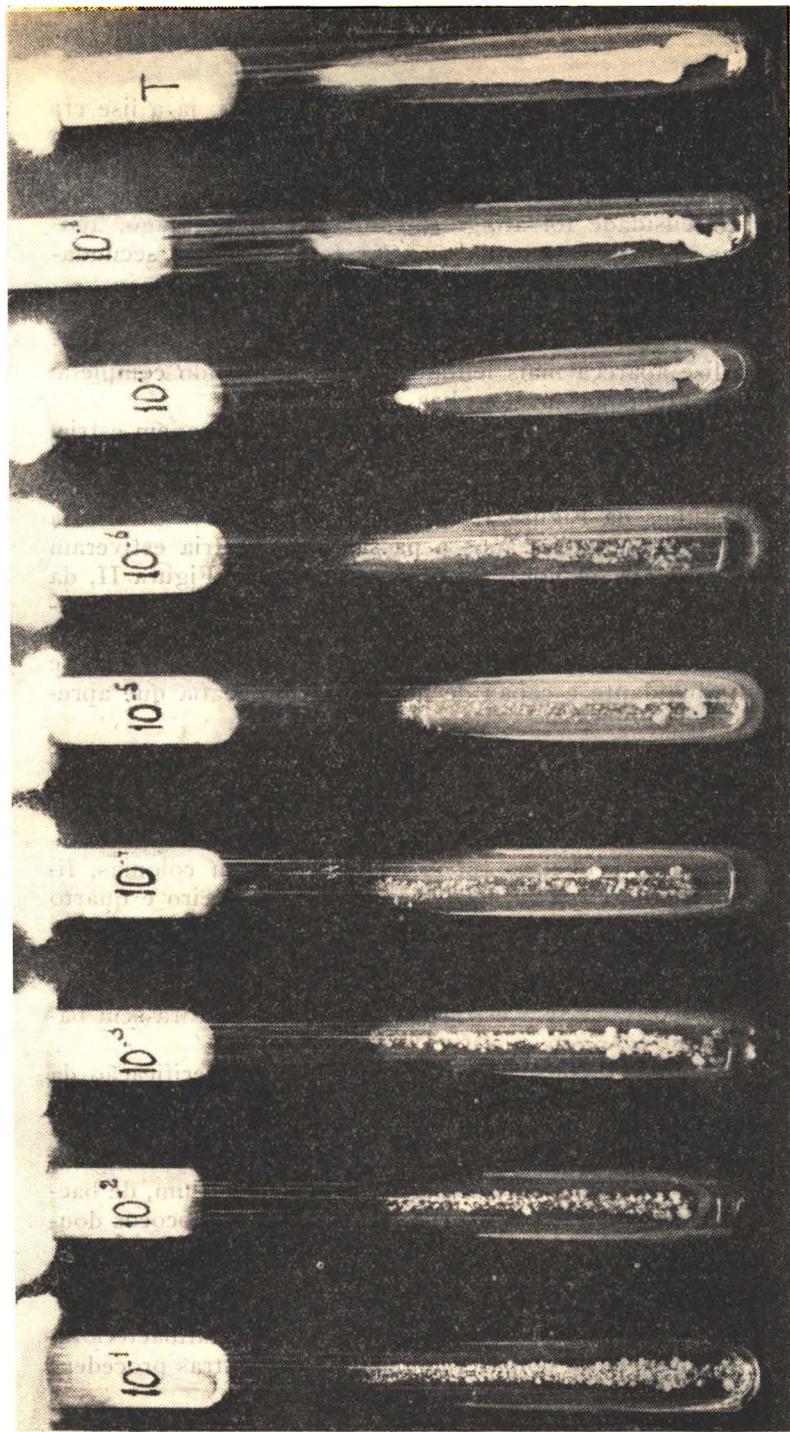


FIG. I - Da serie que se achava na estufa a 37°

Vê-se no Quadro 9 que, a 37°, em 5 horas, já a lise era completa nos dois primeiros tubos, cuja turvação daí em diante corre por conta das culturas secundárias.

Observa-se também grande irregularidade na lise cuja maior intensidade foi atingida, com esse bacteriófago, após 24 horas de estufa, para daí em diante as culturas secundárias turvarem cada vez mais os caldos.

A mesma dosagem feita na temperatura do laboratório — Quadro 10 — deu resultados muito mais uniformes, embora a lise apareça mais lentamente; mas, quando completa, ela se mantém por muitos dias.

Se passarmos essas duas diluições para gelose, em estria, melhor presenciaremos a diferença existente na ação da temperatura sobre a lise, como se pôde vêr nas Figuras I e II.

Os tubos da Figura I, da série que se achava na estufa a 37° durante um dia, após a passagem da estria estiveram na estufa a 37°, 24 horas; ao passo que os da Figura II, da série conservada na temperatura do laboratório, também ficaram na temperatura do laboratório após a passagem da estria. Nestes, só após dois a três dias é que a vegetação se tornou abundante e capaz de nos dar a fotografia que apresentamos.

Na Figura I (verificação na estufa a 37°) vê-se, na passagem de todas as diluições, ora cultura irregular e rugosa, ora colônias atípicas, esparsas.

Na Figura II (verificação na temperatura do laboratório), nos dois primeiros tubos não apareceram colônias, ficando o meio com aparência de esteril; no terceiro e quarto vêm-se pequenas colônias na parte superior desses tubos, notando-se nitidamente no oitavo, as manchas dos corpúsculos bacteriófagos.

No tubo T vê-se a estria testemunha — cultura sem bacteriófago.

Portanto, é bem clara a diferença entre a verificação da ação lítica de um estafibacteriófago na estufa a 37°, ou na temperatura do laboratório, sendo esta preferível.

GRATIA, como vimos acima, dividiu os estafibacteriófagos que tem estudado, em dois grupos principais: um, de bacteriófagos **polivalentes**, ativos para todos os estafilococos dourados, citrinos e brancos, patogênicos ou saprofitas; outro, de **monovalentes**, encontrado em 70 % dos casos e de ação unicamente para algumas raças de estafilococos brancos.¹⁶

Nesse seu trabalho vê-se uma lista de 17 estafibacteriófagos, dos quais 14 de polpas vacínicas e 3 de outras proceden-

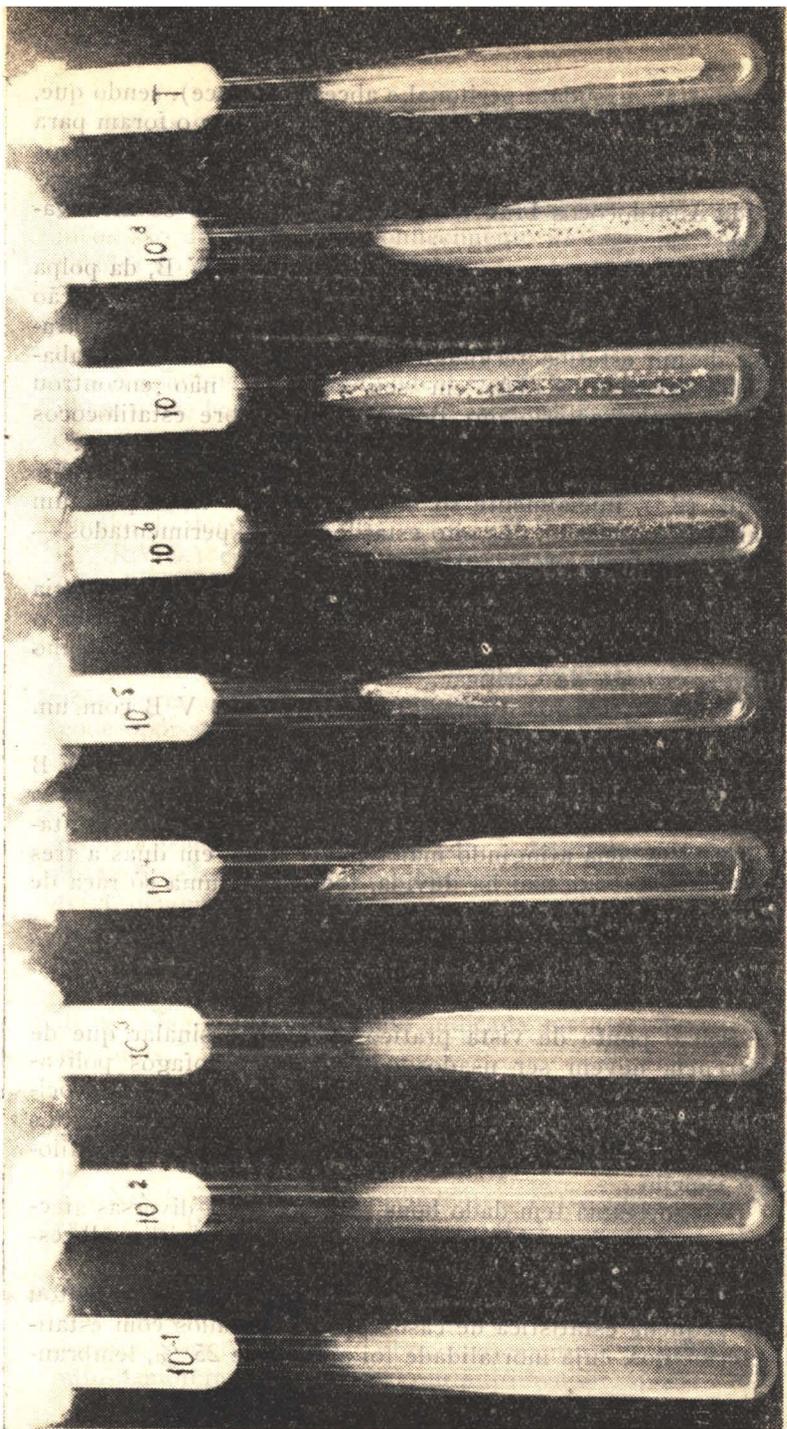


Fig. II - Da serie que se achava na temperatura do laboratorio

cias (antrax, exsudato peritoneal e abscesso da face), sendo que, os ativos para os estafilococos dourados, tambem o foram para os brancos, portanto, **polivalentes** (5 dos 17); e os não ativos para os estafilococos dourados, só o foram para algumas raças de estafilococos brancos (12 dos 17) — são os **monovalentes**.

Ao isolarmos o nosso estafibacteriofago B V B, da polpa vacinica do Instituto de Butantan, vendo a sua nitida ação litica para um estafilococo dourado, esperavamos que se tratasse de um estafibacteriofago polivalente, pois, como acabamos de vêr, GRATIA, em seu trabalho, não encontrou nenhum estafibacteriofago que, de ação sobre estafilococos dourados não o fosse tambem para estafilococos brancos.

Os nossos tres estafibacteriofagos B V B — B V B C e B V B (2.^a), inicialmente só mostraram ação litica para um estafilococo dourado, dos oito estafilococos experimentados — o St 2, isolado da propria polpa vacinica.

Fazendo diversas passagens com o St 2, a virulencia desse filtrado aumentou extraordinariamente, mas só para o St 2, continuando sem ação para os outros estafilococos, como tivemos ocasião de verificar.

Tambem fizemos diversas passagens do B V B com um estafilococo branco — o St 3, nada conseguindo.

Os nossos estafibacteriofagos B V B — B V B C e B V B (2.^a), pela sua procedencia, sua ação unicamente para o **Staphilococcus aureus** St 2, fraca virulencia inicial, facil exaltação de virulencia atingindo maior poder litico em duas a tres passagens, — são, não ha duvida, todos êles, uma só raça de bacteriofago.

* * *

Sob o ponto de vista pratico, convem assinalar que de preferencia devem ser usados os estafibacteriofagos polivalentes nas applicações terapeuticas das afecções estafilococicas, ficando o emprego dos **monovalentes** unicamente para os casos de verificação prévia da sua ação litica para o estafilococo isolado.

A fagoterapia tem dado bons resultados em diversas afecções estafilococicas: furunculos, anthrazes, panariços, abcessos, flegmões, e mesmo, septicemias.

Nas septicemias estafilococicas RAIGA (12) apresentou uma pequena estatistica de casos por êle tratados com estafibacteriofagos, cuja mortalidade foi apenas de 25 %, lembran-

do que as conclusões de ARLOING, DUFOUR e LANGE-
RON no Congresso Francês de Medicina, em 1927, apresen-
taram para casos semelhantes a mortalidade de 80 a 90 %.

Os insucessos da fagoterapia assinalados por alguns cli-
nicos são devidos ao desconhecimento de algumas particula-
ridades do seu emprego.

A verificação da ação litica para o germen isolado do
doente é necessária, mas, quando positiva, ainda assim pôde
talhar a sua ação curativa.

No sangue do doente pôdem existir anti-fagos que se opo-
nham á lise bacteriana; e, nesse caso, o organismo do doente
constitue um meio desfavoravel á fagoterapia.

Nos casos clinicos mais graves e refratarios ao bacterio-
fago esses anti-fagos são geralmente encontrados no sôro san-
guineo do doente.

RAIGA constatou mais os seguintes fatos interessantes:
quando presentes anti-estafi-fago e anti-estrepto-fago—maior
gravidade do caso, que se torna completamente refratario á
fagoterapia.

O sôro sanguineo humano — que normalmente nenhuma
ação apresenta sobre a bacteriofagia, — em casos especiais
pôde opôr-se a esse fenomeno, quer agindo sobre o bacterio-
fago, enfraquecendo ou neutralizando a sua ação; quer agin-
do sobre a bacteria, conferindo-lhe maior resistencia á lise.

ROSENTHAL (13) estudou esse assunto, apresentan-
do uma técnica muito simples para a determinação desses an-
ti-fagos de ação uns sobre o bacteriofago, outros sobre a bac-
teria, denominando-os de anti-fagos diretos e indiretos. Esses
anti-fagos pôdem estar presentes simultaneamente no mesmo
sôro.

A via parenteral não será indicada no caso da existencia
de anti-fagos diretos; sendo indicada no caso de anti-fagos
indiretos.

A presenca desses anti-fagos não constitue uma contra-
indicação á fagoterapia. Êles desaparecem pela auto-hemote-
rapia, que veiu prestar um valioso auxilio á ação do bacterio-
fago.

Nesse sentido são convincentes, entre outras, as obser-
vações de ROSENTHAL e de RAIGA.

RAIGA afirma que, graças á auto hemoterapia, conse-
guiu o desaparecimento de anti-fagos em 96 % de casos, e
que, considerando unicamente o numero global de curas em
doentes com anti-fagos, obteve o seguinte resultado: sem
auto-hemoterapia — 56 %; com auto-hemoterapia — 76 %.

RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho é dividido em tres partes.

Na primeira fizemos considerações sobre a identidade dos fenomenos de TWORT e de d'HE'RELLE, deixando afirmada a nossa impressão de serem esses fenomenos identicos.

Na segunda parte estudámos o bacteriofago estafilococico nas polpas vacinicas, resumindo e discutindo os ultimos trabalhos a esse respeito.

A terceira parte consta de quatro séries de experiencias.

Na primeira série de experiencias constatámos a presença do principio litico na polpa vacinica n.º 4.689 para um **Staphylococcus aureus**, dos oito estafilococos (**aureus**, **albus citreus**) experimentados.

Essa polpa nos foi enviada do Instituto de Butantan com a indicação de ter sido colhida em 23-7-930. As nossas experiencias foram iniciadas em 23-10-931. Portanto, esse principio litico foi encontrado nessa polpa após um ano e tres mêses da sua colheita.

Esse estafibacteriofago, cuja atividade era insignificante, em tres passagens atingiu o maximo da sua virulencia (1.800.000.000 corpusculos bacteriofagos por c. c.), para cair da quarta passagem em diante.

Na segunda série de experiencias verificámos que tanto a polpa vacinica n.º 4.689, de vitelo, como uma outra de coelho, obtida pela passagem daquela em coelho, — forneceram dois estafibacteriofagos identicos, sendo a mesma raça de bacteriofago. Ambos manifestaram ação litica apenas para o **Staphylococcus aureus**, St. 2, dos oito estafilococos experimentados, assim como nas passagens com esse germen a virulencia foi sendo exaltada até a terceira passagem, para cair daí em diante.

Na terceira série de experiencias verificámos que da polpa vacinica n.º 4.689, após dois anos e tres dias de conservação no frigo, a 8°, ainda nos foi possivel isolar um estafi-

bacteriófago em tudo semelhante ao isolado um ano antes, apenas um pouco menos virulento.

Na quarta série de experiências fizemos considerações sobre qual a melhor temperatura para a ação lítica do bacteriófago estafilocócico, deixando demonstrado não ser indiferente essa questão de temperatura.

De acôrdo com as experiências por nós apresentadas, aconselhamos a temperatura do laboratório, de 20° a 25°, cujos resultados são melhores do que a 37°, principalmente quando não se trabalha com bacteriófago de grande virulência.

Na temperatura do laboratório, com bacteriófagos de fraca virulência, embora mais lentamente se processe a lise, ela é mais intensa e mais uniforme, mantendo-se também por maior tempo.

Com esses bacteriófagos, a 37°, as culturas secundárias turvam rápida e novamente os caldos lisados.

GRATIA, no seu trabalho por nós comentado, apresentou uma lista de 17 estafibacteriófagos, sendo que, todos eles, quando ativos para os **Staphylococcus aureus**, também o foram para os **albus** (polivalentes); e, quando não ativos para os **Staphylococcus aureus**, só o foram para alguns **Staphylococcus albus**, (monovalentes).

O estafibacteriófago por nós estudado, embora de ação sobre o **Staphylococcus aureus** St. 2, não poderia ser classificado entre os **polivalentes** de GRATIA por ter ação lítica apenas para esse **Staphylococcus aureus**, como também não revelou ação para nenhuma das raças experimentadas de **Staphylococcus albus** e **citreus**; e não o poderíamos ainda classificar entre os seus **monovalentes**, cuja ação é limitada a algumas raças de **Staphylococcus albus**.

Fizemos considerações sobre as aplicações terapêuticas de estafibacteriófagos, lembrando que podem existir antifagos no sangue do doente e que, quando presentes, convém juntamente empregar a auto-hemoterapia.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study is divided into three parts.

In the first part we pondered over the identity of the TWORT and d'HE'RELLE phenomena, and declared our impression that these phenomena are identical.

The second part studies the action of the staphylococcic bacteriophage on vaccine pulp, summarizing and discussing the last reports on this subject.

The third part includes four series of experiments.

In the first series of experiments we observed the presence of the lytic element, in vaccine pulp n. 4.689, for one *Staphylococcus aureus*, from among the eight staphylococci (*aureus*, *albus* and *citreus*) experimented upon.

This pulp was prepared at the Butantan Institute and was marked as obtained on 23-VII-930. Our experiments were started on 23-X-931. Thus the lytic element was observed in the pulp fifteen months after its collection.

This Staphylobacteriophage whose activity was insignificant, attained after three passages its maximum virulence, (1.800.000.000 bacteriophage corpuscles per c. c.) to fall again after the fourth passage.

In the second series of experiments we observed that the calf vaccine pulp n. 4.689, as also a rabbit pulp obtained by the passage of the first into a rabbit gave us two identical staphylobacteriophages of the same bacteriophage race. Both showed a lytic action only for the *Staphylococcus aureus* St 2, from among the eight staphylococci experimented upon, and in their passages with this germ their virulence increased up to the third passage, to fall from then on.

In the third series of experiments we observed that it was possible to isolate a staphylobacteriophage similar in all points to the one isolated a year before, only a little less virulent, from the vaccine pulp n. 4.689, which had been kept for two years in an icebox at 8° C.

In the fourth series of experiments we made some observations, with demonstrations, on which would be the best temperature to obtain the lytic action of the staphylococcic bacteriophage.

The temperature is also of importance.

In accordance to the experiments we made, we would advise a laboratory temperature from 20-25° C., whose results are better than at 37°C, especially when one work with a bacteriophage of small virulence.

With a little virulent bacteriophage, at laboratory temperature, the lytic action is slower but more intense and uniform, and it lasts also for a longer time.

With these bacteriophages at 37° C., the secondary cultures rapidly cloud again the lysed broth.

GRATIA in his studies, which we commented, presented a list of seventeen staphylobacteriophages all of which when they were activated for the **Staphylococcus aureus** acted also on the **albus** (polyvalent); and when not active for the **Staphylococcus aureus**, then acting only on some **Staphylococcus albus** (monovalent).

The staphylobacteriophage which we observed although it acted on the **Staphylococcus aureus** St 2 can not be classified among GRATIA's polyvalent ones, since their lytic action affected only this **Staphylococcus aureus**, as also, it manifested no action on any of the **Staphylococcus albus** and **citreus** experimented upon, we cannot also classify it among any of the monovalent ones, whose action is limited to races of the **Staphylococcus albus**.

We considered the therapeutic utilisation of staphylobacteriophages calling attention to the fact of the possible presence of antiphages in the blood of the patient. In that case it is better to use at the same time some auto-hemotherapy.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — TWORT, F. W.
1915 The Lancet. Vol. II, p. 1.241.
 - 2 — HE'RELLE, F. d
1926 Le Bactériophage et son comportement. Deuxième édition, p. 243.
 - 3 — GRATIA, A.
1931 Ann. de L'Inst. Past. T. XLVI. n. 1, p. 1.
 - 4 — HE'RELLE, F. d'
1931 Ann. de L'Inst. Past. T. XLVI. n. 6, p. 616.
 - 5 — GRATIA, A.
1931 Ann. de L'Inst. Past. T. XLVI. n. 6, p. 619.
 - 6 — TWORT, F. W.
1931 Ann. de L'Inst. Past. T. XLVII. n. 5, p. 464.
 - 7 — MONTEIRO, J. L.
1930 Memorias do Instituto de Butantan, T. V p. 27.
 - 8 — GRATIA, A.
1931 Ann. de L'Inst. Past. T. XLVI. n. 6, p. 622.
 - 9 — DENYS, P.
1932 Ann. de L'Inst. Past. T. XLVIII. n. 3, p. 349.
 - 10 — GRATIA, A.
1923 Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. LXXXIX, p. 821.
 - 11 — HAUDUROY, P.
Le Bactériophage de d'Hérelle.
 - 12 — RAIGA, A.
Le Bactériophage et ses applications thérapeutiques.
P. 90.
 - 13 — ROSENTHAL, P.
1929 Compt. rend. de la Soc. de Biol. T. C, p. 1019.
-