

# EMPREGO DO ACIDO ROSOLICO NO ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS BACILLOS DO GRUPO COLI-TYPHICO-DYSENTERICO EM MEIOS SOLIDOS

POR

S. DE CAMARGO CALAZANS E B. RANGEL PESTANA

---

## INTRODUÇÃO

Constitue objecto de frequentes pesquisas dos bacteriologistas o estudo do grande grupo de bacterias a que se deu o nome de coli-typhico-dysenterico. Motivou esse agrupamento o facto de apresentarem taes germes semelhanças biologicas e morphologicas que difficultam sua differenciação, donde o apparecimento de varios methodos especiaes destinados a caracterizal-os, o que bem demonstra não se ter encontrado ainda um que sobrepujasse francamente os demais.

Entre os diversos methodos que temos para a differenciação destas bacterias, aquelles baseados na acção impiedente exercida por varios corantes, ou então, ainda, nas propriedades biochimicas dos germes em relação a diversos hydratos de carbono e alcooes. são de pratica corrente em bacteriologia. Tanto as substancias inibidoras, como as indicadoras da modificação da reacção dos meios de cultura usados, apresentam, contudo, certos inconvenientes, resultantes, quer da sua instabilidade, quer das grandes variações apresentadas pelas differentes partidas dos mesmos productos, que são, via de regra, substancias de constituição chimica muito complexa, e, nem sempre, perfeitamente estabelecida.

Resulta dahi a necessidade de se examinar a acção inibidora de cada partida de alguns desses productos, antes de serem utilizadas, como adiante veremos.

Poucos são os corantes que, adicionados aos meios de cultura, gozam da propriedade de serem ao mesmo tempo indicadores e inibidores, facto este que representaria, sem duvida, uma grande vantagem, não só para a eficiencia do methodo, como ainda do ponto de vista economico.

Entre os meios mais em voga para se isolar os germes do grupo coli-typhico, e que se baseou em taes propriedades de algumas substancias corantes, temos o de Drigalski-Conradi (1) em cuja composição entra o *litmus* como *indicador* e o *crystal violeta* como *seleccionador*. Apresenta este meio o inconveniente de ser de difficil preparo, exigindo, como acabamos de ver, a addição do litmus, substancia de composição chimica não exactamente estabelecida e, além disso, sensivel á acção reductora de muitos germes e outras substancias organicas que a privam do seu oxygenio, descorando-a. Apresenta ainda o grande inconveniente de serem pouco accentuadas as suas mudanças de côr nas vizinhanças da neutralidade (22). Neste meio o crystal violeta é empregado para impedir o crescimento de varios cocos e bacillos, deixando crescer os germes do grupo coli-typhico. Esta acção impediante, porém, faz-se sentir, muitas vezes sobre os *bacillos dysentericos*, motivo pelo qual o meio não é aconselhado para o isolamento desses germes.

Churchmann (2) e Churchmann e Michael (3) fizeram numerosas pesquisas a respeito do poder impediante do crystal violeta, demonstrando que, mesmo em grandes diluições (1/100.000), este corante impedia, com raras excepções, o crescimento dos germes Gram-positivos, ao passo que deixava crescer livremente os Gram-negativos. Estas pesquisas foram confirmadas por Krumwiede e Pratt (4), os quaes demonstraram ainda que tal acção inhibidora não se fazia sentir sobre os pneumococcos e estreptococcos, quando as diluições do corante já actuavam sobre outros germes Gram-positivos. Hall e Tabor (5) verificaram contudo que a regra estabelecida por Churchmann (2) em 1912, não era perfeitamente exacta quando se tratava de alguns anaerobios Gram-positivos. Foi assim que, experimentando com 2 raças de *C. tetani*, 1 de *C. welchii* e 1 de *C. sporogenes*, verificaram que as duas primeiras não cresceram, ao passo que as duas ultimas cresceram.

Verificámos, como veremos mais adiante, no presente trabalho, que os *staphylococcos* e os *estreptococcos* tambem crescem quando cultivados no meio de Drigalski-Conradi, confirmando, pois, no que se refere ao *estreptococco* as pesquisas de outros auctores.

Outro meio de uso frequente entre os bacteriologistas e destinado ao isolamento dos germes do mesmo grupo, é o de Endo (6) em cuja composição entra a fuchsina descorada pelo sulfito de sodio. Sua reacção, quando o meio é preparado de accordo com a technica original, pode ser muito alcalina, attingindo ao pH 8.6, que o torna prejudicial á pesquisa dos *bacillos dysentericos* (7). Deste meio ha varias modificações tendentes a corrigir os defeitos que o mesmo apresenta e a simplificar a tecnica do seu preparo. Entre ellas temos a de Kendall e Day (8) e a de Robinson e Rettger (9) que, contudo, não trouxeram grandes vantagens para o processo.

No meio de azul de methyleno-eosina-agar, de Halt-Harris e Teague (10) as colonias dos bacillos do grupo typhico-dysenterico são transparentes e as do *b. coli* escuras. E' este um dos melhores meios até agora empregados.

Max Levine (11) em trabalho publicado em 1920, verificou, porém, ser este meio accentuadamente inibidor para o bacillo Shiga.

Além disso ha entre nós ainda a difficuldade em se obter no commercio a eosina amarella necessaria para confecção deste meio.

Krumwiede e Pratt (12), em 1914, prepararam tambem um meio no qual ao agar era addicionado o verde brilhante (impedidor), como já o havia feito Conradi (13); ambos, porém, apresentavam o inconveniente de não conter um *indicador* que separasse os germes fermentadores da lactose daquelles que não a fermentavam. Mais tarde, Krumwiede, Pratt e McWilliams (14) acrescentaram a esse meio o *indicador Andrade*, facilitando deste modo o isolamento dos bacillos typhicos e paratyphicos. O grande inconveniente apresentado por este meio é que a quantidade de verde brilhante, a ser addicionada, varia com cada partida de agar preparada.

Por esse motivo, Park (15), recommenda preparar-se grandes quantidades de agar de cada vez, para diminuir o trabalho da padronização. E' necessario ainda empregar-se duas proporções differentes do corante; uma mais forte, outra mais fraca, porque o poder selectivo do verde brilhante varia de accordo com o material semeado e a composição do meio.

Este corante não impede somente o crescimento dos germes Gram-positivos, mas ainda o de muitos Gram-negativos, como o *b. coli* e dysenterico, deixando, porém, crescer os typhicos e paratyphicos.

O pH dos meios em que entra o verde brilhante deve ir de 6.4 ou mesmo de 6.2 a 7 como affirma Kligler (16), porque, com o pH 7.8 difficilmente serão encontrados os *b. typhicos* existentes em fezes de portadores.

## EMPREGO DO ACIDO-ROSOLICO EM MEIOS CULTURAES

O acido rosolico foi tambem empregado nos meios destinados ao isolamento dos germes do grupo coli-typhico. Mandelbaum (17) em 1909 descreveu dois meios novos para o isolamento e differenciação destes germes, baseado, como se fazia com os meios de Drigalski-Conradi e de Endo, e outros, na acção de certas bacterias sobre a lactose.

Com estes dois novos meios conseguia Mandelbaum não só verificar a alcalinização ou a acidificação dos terrenos culturaes pelas bacterias, mas ainda demonstrar a inibição do crescimento dos germes do genero *Proteus* e de todos os coccus que se desenvolviam no meio de Drigalski-Conradi.

Anteriormente, porém, em 1892, Sommaruga (18) já se havia utilizado do acido rosolico addicionado ao caldo simples para fazer a differenciação entre os

bacillos coli e typhicos. Mandelbaum, porém, empregou para suas pesquisas meios solidos com hydratos de carbono e alcooes, utilizando como indicador, em um delles, o acido rosolico e, no outro, o sangue humano desfibrinado. No meio em que adicionava sangue ao agar, para indicar a producção da hemolyse ou a formação de pigmentos por alguns germes, não adicionava o acido rosolico.

Em 1910, Stahr (19), empregando o meio aconselhado por Mandelbaum, verificou que o mesmo não era muito apropriado para o isolamento dos germes do grupo coli-typhico, porque a acidificação produzida pelos bacillos coli se diffundia rapidamente pelo meio de cultura e assim mascarava certas colonias que o alcalinizavam.

Em um segundo trabalho publicado por Mandelbaum (20), em 1902, confessa este pesquisador ter verificado o mesmo inconveniente do meio, e, para corrigil-o resolveu modificar a formula primitiva, substituindo-a pela seguinte:

Agar commum . . . . .	100 c.c.
Lactose . . . . .	3,0 grs.
Acido rosolico (sol. alcoolica a 1%) . . . . .	3 c.c.
Sangue humano desfibrinado . . . . .	10 c.c.

Para Mandelbaum, a addição do sangue, além de corrigir os inconvenientes da diffusão da acidez produzida pelos b. coli, vinha diminuir a acção impedi-diente do acido rosolico (que julgava muito forte), bem como a de outras substancias seleccionadoras até então usadas. Conclue das suas experiencias que foi graças á addição do sangue ao meio que lhe foi possivel isolar o bacillo de Eberth das fezes de 4 doentes de febre typhoide, o que não tinha conseguido empregando o meio de Drigalski-Conradi. No seu novo meio as colonias de b. typhico appareciam com a côr vermelha e as do b. coli tinham uma cor verde-pardacenta que podia chegar a ficar preta.

Pfeilschmidt (21), em 1915, por suggestão de Schmorl, verificou o valor do meio de Mandelbaum (agar-sangue-lactosado-acido rosolico), não só estudando as culturas do laboratorio, mas ainda realizando exames de fezes com o fim de isolar o b. typhico. Seu proposito foi verificar si o novo meio era superior aos já conhecidos de Drigalski-Conradi, de Endo e de verde de malachite, fazendo para isso culturas em todos elles e comparando os resultados. De suas pesquisas concluiu que o meio de Mandelbaum tinha o mesmo valor que os de Drigalski-Conradi e do de Endo, sendo, porém, inferior ao de verde de malachite para os exames de fezes.

Analysando os protocollos apresentados por Pfeilschmidt, verificámos que cresceram no meio empregado bacillos typhicos, paratyphicos, coli, alcaligenes, dysentericos, estreptococcus e estaphylococcus.

Fischer (22), em um tratado publicado em 1912, aconselha o uso do meio de Mandelbaum no qual as colonias se differenciam mais facilmente pela côr,

achando ainda que era um meio muito apropriado para o isolamento do bacillo coli, mesmo quando existente em pequena quantidade.

Em 1918 Bronfenbrenner (23), procurando verificar a concentração dos iões de H nas culturas em meio liquido durante o periodo de crescimento dos germes, empregou uma mistura de 2 indicadores — o azul da China e o acido rosolico, de modo a poder fazer a leitura directa do pH mediante a comparação dos tubos de cultura com uma serie padrão que tinha como indicador a mesma mistura azul da China — acido rosolico.

De todos estes trabalhos publicados até 1918 não se tirou nenhuma conclusão definitiva sobre as propriedades impiedentes do acido rosolico sobre os germes Gram-positivos, propriedades que poderiam então ser utilizadas para o isolamento das bacterias Gram-negativas. Além disso, a addição do sangue ao meio de Mandelbaum, veio, naturalmente, modificar a acção seleccionadora do acido rosolico, tornando-o menos activo e complicando inutilmente a technica do seu preparo.

Com o decorrer do emprego deste indicador, cujo poder bactericida Bronfenbrenner pensava poder ser desprezado, em virtude do facto de se empregar o corante em pequenas quantidades, foi verificado (24) que esta innocuidade existia somente para os germes Gram-negativos examinados, não acontecendo o mesmo com os varios germes Gram-positivos posteriormente experimentados. Para essas verificações foram cultivadas, durante 4 dias, 78 raças diferentes de germes Gram-positivos no seguinte meio:

Solução em agua destillada de peptona de Difco a 1 %

Chloreto de sodio a 0,5%

Solução alcoolica dos corantes (A. C. e R.) misturadas e separadamente e em proporções diferentes.

Das experiencias feitas concluíram Bronfenbrenner e collaboradores que a acção bactericida do indicador C. R. era devida exclusivamente ao acido rosolico, mas que este, mesmo em quantidade 25 vezes maior da que impedia o crescimento dos germes Gram-positivos, não exercia acção inibidora alguma sobre os bacillos typhicos, paratyphicos, dysentericos, coli e outros bacillos Gram-negativos. Concluíram ainda mais que a aparente acção selectiva do acido rosolico associada ao facto de não impedir o crescimento dos bacillos dysentericos, tornava este corante particularmente aconselhado para o isolamento das bacterias intestinaes.

Foi suggestionados pelos trabalhos destes bacteriologistas que resolvemos empregar o acido rosolico em *meios solidos*, em fevereiro de 1923, depois de uma serie de exames preliminares no Instituto Bacteriologico de São Paulo.

Consultando a literatura, depois de termos realizado todas as nossas pesquisas verificamos que, já em 1920, Max Levine (11) aconselhava o uso da mistura C. R. de Bronfenbrenner em *meio solido*, por ter observado tambem que estes indicadores eram muito pouco nocivos aos b. dysentericos, tanto em culturas puras, como misturados ás fezes. O meio que recommendava era o seguinte:

Agua destillada . . . . .	1.000 c.c.
Agar . . . . .	15 grs.
Peptona . . . . .	10 grs.
Phosphato dipotassico . . . . .	4 grs.

A 100 c.c. deste meio, fundido, adicionar:

Lactose . . . . .	5 c.c. (1 gr.)
Glycose . . . . .	1 c.c. (0,05 gr.)
Acido rosolico (sol. alcoolica a 1%) . . . . .	1 c.c. (0,01 gr.)
Azul da China (sol. em H <sup>2</sup> O a 0,5%) . . . . .	1 c.c. (0,005 gr.)
pH. . . . .	7,4 a 7,5

Como vemos na formula acima entram na composição deste meio dois hydratos de carbono, a lactose e a glycose. Julgamos haver grande desvantagem em se adicionar a glycose ao meio, devido á difficuldade que dahi resultaria para o isolamento dos bacillos do grupo typhico-dysenterico, pois sabe-se que todas as bacterias dos generos *Eberthella*, *Salmonella*, *Shigellas* e *Escherichia*, com excepção da *Esch. galactophila*, atacam tal hydrato de carbono.

#### METHODO DE ESTUDO

Empregámos o seguinte meio no qual o acido rosolico actua com o duplo papel de seleccionador e indicador:

Agua destillada . . . . .	1.000 grs.
Gelose . . . . .	30 "
Extracto de carne . . . . .	5 "
Peptona . . . . .	10 "

Ao meio assim preparado adiciona-se 2% de lactose e 1% da solução alcoolica stock de acido rosolico (\*).

O meio é preparado do seguinte modo:

Ajuntar a agua ao agar, reservando 10% (ou 100 grs. por kilo) para dissolver os outros componentes.

---

(\*) A solução alcoolica de acido rosolico é preparada da seguinte maneira:

Acido rosolico de Merck . . . . .	1 gr.
Alcool absoluto . . . . .	50 c.c.
Agua destillada. . . . .	q.s.p. 100 c.c.

Dissolver o agar aquecendo na autoclava a 121°C durante 30 minutos. Dissolver a peptona, o extracto de carne, aquecendo ao banho-maria. Combinar as duas partes e restabelecer o peso correspondente a todos os ingredientes.

Titular com uma solução ao vigesimo de carbonato de sodio e ajustar a reacção entre o pH 7.4 e 7.6 (-0,1 a -0,2) com a solução normal de carbonato de sodio ( $\text{Na}^2\text{CO}_3$ ). Aquecer na autoclava a 123°C durante 10 minutos e filtrar em algodão. Esterilizar na autoclava a 121°C durante 30 minutos.

Adicionar a 100 c.c. do meio 10 c.c. da solução esteril de lactose a 20% e 1 c.c. da solução de acido rosolico a 1%. Agitar o meio e distribuir em placas de Petri.

## PARTE EXPERIMENTAL

Antes de iniciarmos o emprego do novo methodo, repetimos as experiencias de Bronfenbremer e seus collaboradores (24), empregando, porém, um meio solido.

Verificámos nesse meio solido a acção impediante do acido rosolico em relação aos germes do grupo coli-typhico-dysenterico e sobre varios germes Gram-positivos existentes nas collecções dos Institutos Bacteriologico e Butantan.

As nossas conclusões foram as mesmas que tiveram os pesquisadores acima referidos no que concerne á inibição do crescimento da maioria, quasi que absoluta, dos germes Gram-positivos examinados. Em nossas pesquisas empregámos apenas o acido rosolico e não a mistura C. R. (azul da China e acido rosolico), porque só tínhamos em vista o isolamento dos bacillos do grupo coli-typhico-dysenterico.

*Acção do acido rosolico sobre os germes Gram-positivos e Gram-negativos* — Para a verificação da acção do acido rosolico em meio solido sobre os germes Gram-positivos e Gram-negativos, semeámos, em placas de Petri com agar-acido rosolico, os seguintes germes:

QUADRO 1

GERMES	Numero de amostras	Resultados
<i>Eberthella typhi</i> . . . . .	20	creceu
<i>Salmonella paratyphi</i> . . . . .	16	"
" <i>schottmülleri</i> . . . . .	15	"
<i>Shigella dysenteriae</i> . . . . .	11	"
" " var. <i>Flexner</i> . . . . .	14	"
" " " <i>Hiss</i> . . . . .	12	"
" " " <i>Harris</i> . . . . .	1	"
<i>Escherichia communior</i> . . . . .	21	"
" <i>communis</i> . . . . .	20	"
<i>Alcaligenes faecalis</i> . . . . .	40	"
<i>Bacillus prodigiosus</i> . . . . .	1	"
<i>Chromobacterium violaceum</i> . . . . .	4	"
<i>Pasteurella pestis</i> . . . . .	40	"
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	3	"
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> . . . . .	14	não creceu
" <i>hoffmannii</i> . . . . .	5	" "
" <i>xerosis</i> . . . . .	4	" "
<i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	3	" "
<i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	21	" "
" <i>albus</i> . . . . .	3	" "
<i>Streptococcus scarlatinae</i> . . . . .	10	" "
" <i>cardioarthritidis</i> . . . . .	3	" "
<i>Klebsiella pneumoniae</i> . . . . .	2	" "
<i>Clostridium tetani</i> . . . . .	3	" "
" <i>welchii</i> . . . . .	1	" "
" <i>sporogenes</i> . . . . .	1	" "
<i>Bacillus timothy</i> . . . . .	1	" "
" <i>anthracis</i> . . . . .	3	creceu

Verificámos no quadro acima que todos os bacillos Gram-negativos cresceram no meio que continha acido rosolico na proporção de 0,01%, mas os germes Gram-positivos, exceptuando apenas as 3 raças de *Bacillus anthracis*, não vegetaram no agar-rosolico.

Com o fim de confirmar ainda a acção impediante de certas substancias sobre os germes Gram-positivos, foram expostas ao ar durante 1 hora na mesma occasião e no mesmo local tres placas de Petri, uma com agar rosolico, outra com o meio de Drigalski-Conradi e a terceira com agar-commum.

Deste exame resultou o seguinte:

- 1) Placa com agar-rosolico: cresceram apenas 15 colonias de bacillos e diplococcos Gram-negativos: não cresceram germes Gram-positivos.

- 2) Placa com meio de Drigalski-Conradi: cresceram 55 colonias de bacillos com cocos Gram-positivos e negativos.
- 3) Placa com agar commum: cresceram 121 colonias de bacillos, cocos e diplococcos Gram-negativos e positivos.

Em igualdade de condições, portanto, o acido rosolico impediu o crescimento dos germes Gram-positivos do ar.

Confirmada a acção impediente do acido rosolico sobre os germes Gram-positivos, tratámos de comparar essa acção com a dos meios de Endo e Drigalski-Conradi, obtendo os seguintes resultados:

QUADRO 2

Germes semeados	N.º de raças	Meios		
		Endo	Drigalski-Conradi	Agar-Acido rosolico
1) <i>E. typhi</i> . . . . .	1	Cresceu	Cresceu	Cresceu
2) <i>S. paratyphi</i> . . . . .	1	"	"	"
3) <i>S. schottmülleri</i> . . . . .	1	"	"	"
4) <i>Sh. dysenteriae</i> . . . . .	1	"	"	"
5) <i>Sh. paradys. var. Flexner</i> .	1	"	"	"
6) <i>Sh. " " Hiss</i> . . . . .	1	"	"	"
7) <i>Es. communis</i> . . . . .	1	"	"	"
8) <i>Staphylococcus</i> . . . . .	1	"	não cresceu	não cresceu
9) <i>Streptococcus</i> . . . . .	1	não cresceu	cresceu	" "

*Verificação comparativa do poder impediente de alguns meios para bacillos typhicos* — Uma pesquisa de grande importancia e que se impunha antes de se aconselhar o uso de qualquer meio novo era, sem duvida, um estudo comparativo entre elle e os outros mais communmente empregados para o isolamento dos bacillos coli-typhicos. Para isso, semeámos 0,1 de c.c. de cultura, de 24 horas em caldo simples, de varias raças de bacillos typhicos diluidas a 1/100.000, em placas de Petri com os seguintes meios: agar commum, agar-acido rosolico, Drigalski-Conradi, Endo e verde brilhante em duas proporções differentes: 0,3% e 0,4%:

QUADRO 3

Data	Raças de B. typhico	Meios	Numero de germes em cada placa de Petri
10 - I - 27	Eb. typhi 301	Agar-commum	Incontavel
" " "	"	Agar-A. rosolico	"
" " "	"	Drigalski-Conradi	"
" " "	"	Endo	38
" " "	"	Verde brilhante a 0,3 %	Incontavel
" " "	"	Verde brilhante a 0,4 %	"
10 - I - 27	Eb. typhi 141	Agar-commum	Incontavel
" " "	"	Agar-A. rosolico	"
" " "	"	Drigalski-Conradi	"
" " "	"	Endo	"
" " "	"	Verde brilhante a 0,3 %	"
" " "	"	Verde brilhante a 0,4 %	"
7 - IV - 27	Eb. typhi 3	Agar-commum	Incontavel
" " "	"	Agar-A. rosolico	"
" " "	"	Drigalski-Conradi	"
" " "	"	Endo	"
" " "	"	Verde brilhante a 0,3 %	322
" " "	"	Verde brilhante a 0,4 %	940
7 - IV - 27	Eb. typhi 661	Agar-commum	Incontavel
" " "	"	Agar-A. rosolico	"
" " "	"	Drigalski-Conradi	"
" " "	"	Endo	243
" " "	"	Verde brilhante a 0,3 %	Incontavel
" " "	"	Verde brilhante a 0,4 %	"

Pelos resultados obtidos verificámos que houve inibição do crescimento dos germes apenas nos meios de Endo e de verde brilhante. Desejando, porém, aproximar as nossas experimentações o mais possível das condições naturaes, resolvémos cultivar fezes de doentes de febre typhoide, emulsionadas em 10 cc. de caldo commum, ao qual eram adicionadas quantidades differentes de culturas de 24 horas em caldo simples dos seguintes germes: b. typhico, b. paratyphico A e B, b. Shiga, b. Flexner, b. Y (Hiss), b. Strong, Staphylococcus e Streptococcus.

Das emulsões preparadas semeava-se uma alça de platina em placas de Petri contendo os meios de Endo, Drigalski-Conradi e agar-acido rosolico, sendo identificados os germes do grupo typhico-dysenterico reisolados.

O quadro seguinte resume os resultados obtidos das sementeiras nas placas com os meios de Endo, Drigalski-Conradi e agar-acido rosolico.

QUADRO 4

Germes semeados	N.º de raças semeadas	MEIOS					
		Endo		Drigalski-Conradi		Agar-acido rosolico	
		Reisoladas	Porcentagem	Reisoladas	Porcentagem	Reisoladas	Porcentagem
Eberth. typhi . . . . .	5	4	80 %	5	100%	5	100%
Salm. paratyphi . . . . .	5	2	40 %	2	40%	3	60%
Salm. schottmülleri . . . . .	5	4	80 %	2	40%	2	40%
Shig. dysenteriae. . . . .	5	0	0 %	2	40%	3	60%
Shig. paradys. var. Hiss . . . . .	5	1	20 %	2	40%	3	60%
Shig. paradys. var. Flexner . . . . .	3	0	0 %	2	66%	2	66%
Shig. paradys. var. Strong . . . . .	2	0	0 %	0	0%	1	50%
TOTAL . . . . .			36 %		50 %		63%

Em outra serie de experiencias fizemos o exame comparativo entre o meio de verde brilhante a 0,3 e 0,4% e o meio de acido rosolico. Nas placas assim preparadas foram semeadas emulsões de fezes de pessoas portadoras de b. typhico ás quaes adicionámos 0,1 de c.c. de uma cultura de bacillo de Eberth de 24 horas em caldo simples.

Os resultados foram os seguintes:

QUADRO 5

MEIOS								
Verde brilhante a 0,3 %			Verde brilhante a 0,4 %			Agar-acido rosolico		
N.º de raças semeadas	N.º de raças reisoladas	Porcentagem	N.º de raças semeadas	N.º de raças reisoladas	Porcentagem	N.º de raças semeadas	N.º de raças reisoladas	Porcentagem
20	14	70 %	20	11	55 %	20	13	65 %

Pesquisas semelhantes foram feitas com o meio de Teague, agar-rosolico e agar commum (testemunha), dando os seguintes resultados:

QUADRO 6

Raças	MEIOS		
	Agar	Agar rosolico	Teague — pH 8.0
Eberth. typhi — 8 raças . . . . .	Incontavel	Incontavel	Incontavel
Salm. paratyphi — 4 raças . . . . .	"	"	"
Salm. paratyphi — n.º 988 . . . . .	"	1.052	"
Salm. schottmülleri — 5 raças . . . . .	"	Incontavel	"
Shig. dysenteriae — 13 raças . . . . .	"	"	"
Shig. dysenteriae — n.º 168 . . . . .	"	4.048	2.896
Shig. dysenteriae — Butantan . . . . .	978	728	24 hs. 0; 48 hs. 538
Shig. dysenteriae — n.º 1238. . . . .	300	200	220
Shig. dysenteriae — n.º 1435. . . . .	Incontavel	39	90
Shig. dysenteriae — n.º 368 . . . . .	120	0	38
Shig. dysenteriae — Paris . . . . .	177	320	0
Shig. dysenteriae — n.º 1762 . . . . .	Incontavel	0	0
Shig. dysenteriae — n.º 303 . . . . .	"	Incontavel	261
Shig. dysenteriae — n.º 429 . . . . .	4	"	0
Shig. dysenteriae — n.º 29 . . . . .	Incontavel	500	561
Shig. paradys. var. Flexner — 7 raças.	"	Incontavel	Incontavel
Shig. paradys. var. Flexner — n.º 37 .	12	150	55
Shig. paradys. var. Flexner — n.º 677 .	0	13	0
Shig. paradys. var. Flexner — R. . . . .	600	Incontavel	Incontavel
Shig. paradys. var. Flexner — n.º 1170	Incontavel	"	80
Shig. paradys. var. Flexner — Paris . .	300	21	30
Shig. paradys. var. Hiss — 14 raças . .	Incontavel	Incontavel	Incontavel
Shig. paradys. var. Harris — 9 raças.	"	"	"
Shig. paradys. var. Harris — n.º II . .	243	200	100

Comparando-se os resultados obtidos, vemos que os bacillos typhicos, paratyphicos A e B dysentericos Y e Harris cresceram perfeitamente nos tres meios. Quanto aos bacillos Shiga e Flexner, no meio de acido rosolico o crescimento foi um pouco superior.

#### EXAMES DE HEMOCULTURAS EM CASOS DE INFECÇÕES TYPHICAS

Foram praticadas de 5 de fevereiro de 1923 a 31 de dezembro de 1930, 8.524 hemoculturas em doentes suspeitos de febre typhoide ou paratyphoide.

Antes, porém, de se adotar na rotina a applicação do novo meio, fizemos a semeadura de um numero elevado (323) de hemoculturas em bile, nos meios de Endo e acido rosolico com o fim de verificar se havia alguma differença entre os resultados obtidos com um e outro meio. Não se tendo observado discordancia alguma, ficou desde aquella epoca em uso somente o meio de acido rosolico.

Das 8.524 hemoculturas praticadas, 2.315 foram positivas e 6.209 negativas, sendo as positivas assim distribuidas:

Eb. typhi . . . . .	2.243
S. paratyphi . . . . .	63
S. shottmülleri . . . . .	9

Durante o mesmo periodo foram realizadas ainda 8.063 exames bacteriologicos de fezes, não só em convalescentes de febre typhoide, mas ainda, em casos de dysenteria, tendo sido isolados os seguintes germes:

Eb. typhi . . . . .	355
S. paratyphi . . . . .	50
S. shottmülleri . . . . .	133
Sh. dysenteriae . . . . .	80
Sh. paradysenteriae var. Flexner . . . . .	48
Sh. paradysenteriae var. Hiss . . . . .	115
Sh. paradysenteriae var. Harris . . . . .	15
S. morgani . . . . .	10

*Aspectos das colonias dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico sobre as placas de acido rosolico* — Não se pode, pela simples inspecção das placas, separar entre si as colonias dos bacillos que não fermentam a lactose, porque todas se apresentam mais ou menos com o mesmo aspecto e coloração rosea. São, porém, facilmente distinguiveis das colonias dos bacillos coli as quaes por sua vez podem ser separadas em coli *communis* e *communior*.

As colonias dos primeiros são esbranquiçadas, ao passo que as dos segundo apresentam uma coloração amarella alaranjada. As colonias crescem, em geral bem separadas, sendo facil seu isolamento, como vemos na Fig. no. 1.

*Exame bacteriologico de aguas* — As placas de agar lactosado com acido rosolico constituem, a nosso vêr, um dos melhores meios para o isolamento dos bacillos coli das aguas.

A technica por nós usada nos innumerados exames que o Instituto procedeu nas aguas de São Paulo e de outras localidades do Estado, foi, em linhas geraes, a seguinte:

Colhida a amostra de agua em frascos esterilizados de 100 c.c. de accordo com as recommendações usuaes, eram feitas sementeiras em placas de agar commum para a contagem dos germes nas temperaturas de 37°C e 20°C, ao mesmo tempo que semeavam em tubos com caldo lactosado (tubos de fermentação) quantidades crescentes da agua a examinar para a pesquisa dos germes thermophilos e dos germes fermentadores da lactose.

Para a pesquisa do bacillo coli retiravamos, ao fim de 24 a 48 horas, uma pequena quantidade da cultura do tubo que tivesse recebido a menor quantidade de agua e que mostrasse desprendimento de gas. Semeadas uma ou duas gottas em uma placa de agar-acido rosolico-lactosado, distribuia-se a cultura pela placa com um bastão de vidro em L, semeando-se em seguida mais duas placas de Petri com o mesmo meio e sem flambar o bastão. No dia seguinte verificava-se a presença das colonias de coli que facilmente se reconheciam pelo seu aspecto caracteristico.

Com alguma pratica do meio chega-se a reconhecer facilmente as colonias do *B. coli*, podendo-se ainda differenciar as colonias do *B. coli communis* da do *B. coli communior*, como já assignalámos.

A passagem das colonias de bacillos coli *communis* e *communior* pela serie de Hiss sempre confirmou os exames previos feitos nas placas. As colonias do bacillo coli *communior* se apresentam com a côr amarella clara, côr de palha, ao passo que as do coli *communis* são amarellas mais escuras, tirante ao alaranjado.

Este aspecto, verificado, quer nos exames de agua, quer nos exames de fezes, apresenta uma notavel constancia.

Outros germes Gram-positivos aerobios e anaerobios da agua podem produzir o desprendimento de gas nos tubos com agar-lactosado, mas estes germes, que não têm nenhuma importancia no ponto de vista hygienico, excepto o *C. welchii* que é anaerobio, transplantados para as placas de agar-rosolico, não se desenvolvem. Em nenhum exame de agua encontrámos no meio com acido rosolico qualquer bacillo Gram-positivo.

Foram praticados 233 exames bacteriologicos de agua, dos quaes 186 revelaram a presença do *B. coli*.

*Emprego do acido rosolico como indicador na serie de Hiss e no triplice assucar* — Dados os conhecidos inconvenientes do litmus, que foi o primeiro indicador empregado em bacteriologia, resolvemos tentar o emprego do acido rosolico na serie assucarada de Hiss. Este indicador apresenta, como o litmus, o ponto de viragem ao redor do pH — 7 e, além disso, não possui nenhum dos seus inconvenientes, não é alterado pelo calor nem pela luz (23), é de custo relativamente barato e não tem poder inhibitorio sobre os germes que se tem em vista estudar nestes meios.

Os resultados foram os mais satisfactorios possiveis, sendo desde então o unico indicador adoptado para o estudo da acção dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico sobre os hydratos de carbono, no Instituto Bacteriologico de São Paulo.

Foram adicionados ao meio de Hiss (25), cuja formula damos abaixo, as seguintes substancias, na proporção de 1%: dextrose, lactose, maltose, saccharose, xylose e mannita.

Meio empregado (Hiss):

Agua . . . . .	500 c. c.
Gelose . . . . .	4 grs.
Peptona . . . . .	5 grs.
Extracto de carne . . . . .	2 grs.
Chloreto de sodio . . . . .	2 grs.
Gelatina . . . . .	20 grs.
Acido rosolico (Merck) a 1% . . . . .	5 c. c.

Depois de esterilizado adicionam-se ao meio os varios hydratos de carbono (\*) fazendo-se a distribuição em pequenos tubos de ensaio (tubos de Wassermann) que são conservados no laboratorio. Nesses meios a acção dos germes sobre os assucares se faz sentir com grande nitidez e rapidamente (6 a 8 horas). O meio antes do crescimento dos bacillos tem uma coloração vermelha que se transforma em amarello champanha quando se dá a producção de acidos; estes são em geral acidos volateis (26) que se diffundem rapidamente através do meio de cultura. Do mesmo modo a formação de gas pelos germes é notada sem a menor difficuldade neste meio semi-solido, motivo pelo qual o preferimos aos meios liquidos (Fig. n.º 2). Empregamos ainda com bom resultado o mesmo indicador no meio de triplice assucar em substituição ao indicador Andrade.

— A maioria dos serviços technicos deste trabalho foram executados pela nossa distincta auxiliar senhorita Maria Arantes, e é com prazer que lhe apresentamos aqui os nossos agradecimentos, assim como aos demais funcionarios do Instituto que concorreram para as mesmas pesquisas.

## CONCLUSÕES

1. Foi feito um resumo historico sobre o emprego do acido rosolico para o estudo dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

(\*) Recommendamos o emprego dos carbohydratos esterilizados pela filtração ou pelo aquecimento em meio neutro.

2. Mandelbaum foi quem primeiro se utilizou deste corante em meios solidos para taes estudos, empregando-o na proporção de 3 centigrammas por cento (0,03%): Bronfenbrenner e seus collaboradores recommendam uma solução a 0,005%; nós empregámos o corante na proporção de 1 centigramma para 100 de meio (0,01%).
3. Foram confirmados os achados de Bronfenbrenner e seus collaboradores no que diz respeito á acção impiedente do acido rosolico sobre os germes Gram-positivos, quer fossem elles recentemente isolados, quer se tratasse de exemplares já existentes na collecção de culturas do Instituto.
4. O acido rosolico de Merck reúne a dupla vantagem de seleccionador e indicador para o estudo dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico.
5. Empregado comparativamente com os meios de Endo, Drigalski-Conradi, Teague e verde brilhante, mostrou o meio com acido rosolico ser o que reúne as maiores vantagens para o isolamento dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico. A facilidade do seu preparo, que não apresenta a menor complicação para os que possuem technica de bacteriologia, sua estabilidade, seu baixo custo e, principalmente, a constancia dos resultados obtidos, verificados em milhares de exames executados desde 1923, fazem deste meio um dos melhores actualmente conhecidos para o isolamento e estudo dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico.
6. O meio com acido rosolico vem sendo usado no Instituto Bacteriologico de São Paulo desde 5 de fevereiro de 1923 com vantagem sobre todos os outros.
7. Em 323 hemoculturas feitas comparativamente no meio de Endo e no de agar-acido rosolico-lactosado, houve perfeita concordancia de resultados, sendo depois disso abandonado o primeiro, ficando em uso, na rotina, somente o segundo.
8. Pela inspecção das placas de Petri com agar lactosado-acido rosolico faz-se rapidamente a differenciação do *B. coli communior* e *B. coli communis* e dos *B. aerogenes*, de um lado, dos *b. typhicos*, *paratyphicos*, *dysentericos* e *faecalis alcaligenes*, do outro.
9. O agar lactosado-acido rosolico em placas de Petri constitue um excelente meio para o exame bacteriologico da agua, em substituição ao de Endo e outros empregados para o mesmo fim.
10. O acido rosolico é empregado na serie de Hiss e no meio de triplice assucar com reaes vantagens sobre os demais indicadores.

## RESUMO

O estudo feito dos meios mais communmente empregados para o isolamento dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico comparativamente com o emprego do ácido rosólico nos mesmos demonstrou as vantagens da addição desta substancia, por motivos de economia, facilidade do preparo e maior eficiencia:

1) O ácido rosólico de Merck reúne as vantagens de ser ao mesmo tempo seleccionador e indicador.

2) Pela simples inspecção das placas de Petri com agar-lactosado-ácido-rosólico, é possível fazer-se a differenciação dos *b. coli communis*, *coli communior* e *lactis aerogenes* de um lado, dos *b. typhicos*, *paratyphicos*, *dysentericos* e *f. alcaligenes* do outro.

3) O agar-lactosado ácido rosólico constitue um excellente meio para o exame bacteriologico da agua em substituição ao de Endo e outros.

4) O ácido rosólico foi empregado como indicador na serie de Hiss.

5) A facilidade do seu preparo, que não apresenta a menor complicação, para os que possuem technica de bacteriologia, sua estabilidade, seu baixo custo e, principalmente, a constancia dos resultados obtidos, verificados em milhares de exames executados desde 1923, fazem deste meio um dos melhores actualmente conhecidos para o isolamento e estudo dos germes do grupo coli-typhico-dysenterico.

## ABSTRACT

A study made with the media usually employed in the isolation of germs of the coli-typhoid-dysentery group shows the advantage of adding rosolic-acid to those media for reasons of economy, easier preparation and greater efficiency.

Merck's rosolic-acid at the same time plays the rôle of selective and indicator so that by simply looking at Petri plates with agar-lactose-rosolic acid it is possible to distinguish *Escherichia coli*, *E. communior* and *Aerobacter aerogenes*, on the one hand, from *Eberthella typhi*, *Salmonella paratyphi* and *Salmonella schottmulleri*, the different types of *Shigella dysenteriae* and *Alcaligenes faecalis*, on the other hand.

Agar-lactose-rosolic acid represents an excellent medium to take the place of Endo's and others in the bacteriologic examination of water.

As an indicator rosolic-acid has been used in Hiss' series with success.

Thousands of examinations made since 1923 have proved how easy and simple the preparation of rosolic-media is in the hands of trained bacteriologists; they also have shown how stable, uncostly and especially constant in their results such media are, thus becoming one of the best among those employed in both the isolation and the study of the coli-typhoid-dysentery group of bacteria.

## BIBLIOGRAPHIA

1. *Conradi, H. & von Drigalski* — Zeitschr. f. Hygiene XXXIX:283.1902.
2. *Churchman, J. W.* — J. Exper. Med. XVI:221.1912 et XVII:373.1913.
3. *Churchman, J. W. & Michael, H.* — J. Exper. Med. XVI:822.1912.
4. *Krumwiede, C. & Pratt, J. S.* — J. Exper. Med. XIX:20.1914.
5. *Hall, I. C. & Taber, L. B.* — J. Inf. Dis. XV:566.1914.
6. *Endo, S.* — Centralbl. f. Bakt. Orig. XXXV:109.1904.
7. *Abt, G.* — Rev. d'Hygiène XLV:1.1923.
8. *Kendal, A. & Day, A.* — J. Med. Res. XXV:95.1911.
9. *Robinson, & Rettger,* — J. Med. Res. XXIV:363.1916.
10. *Holt-Harris, J. E. & Teague, O.* — J. Inf. Dis. XVIII:596.1916.
11. *Levine, Max* — J. Inf. Dis. XXVII:31.1920.
12. *Krumwiede, C. & Pratt, J.* — J. Exper. Med. XIX:501.1914.
13. *Conradi, H.* — Munch. Med. Wochenschr. LV:1523.1908.
14. *Krumwiede, C.; Pratt, J. & MacWilliams, H.* — J. Inf. Dis. XVIII:1.1916.
15. *Park & Williams* — Path. Microorganisms :126.1920.
16. *Kligler, I. J.* — J. Exper. Med. XXVII:463.1918.
17. *Mandelbaum, M.* — Munch. Med. Wochenschr. LVI:2475.1909.
18. *Sommaruga,* — Zeit. f. Hyg. und Inf. XII.1892 et XV.1893.
19. *Stahr, H.* — Hyg. Rundsch. :113.1910.
20. *Mandelbaum, M.* — Munch. Med. Wochenschr. LIX:306.1912.
21. *Pfeilschmidt, dr. von* — Centralbl. f. Bakt. Orig. LXXVI:88.1915.
22. *Fischer, B.* — Kursgefasste Anleitung zur den Wicht. Hyg. Unter., Berlin. 1912.
23. *Bronfenbrenner, J.* — J. Med. Res. XXXIX.25.1918.
24. *Bronfenbrenner, J.; Schlesinger, M. J. & Soletsky, C.* — J. Bact. V:79.1920.
25. *Hiss & Zinsser* — A Text-book of Bacteriology. (Sixth Edition, 1927).
26. *Hall, M. W & Lacy, G. R.* — J. Inf. Dis. XXXVIII:15.1926.

(Trabalho do Instituto Bacteriologico e da Secção de Bacteriologia Experimental do Instituto Butantan, apresentado como nota previa á Semana do Laboratorio, Soc. Med. Cir. S. Paulo, janeiro de 1932).

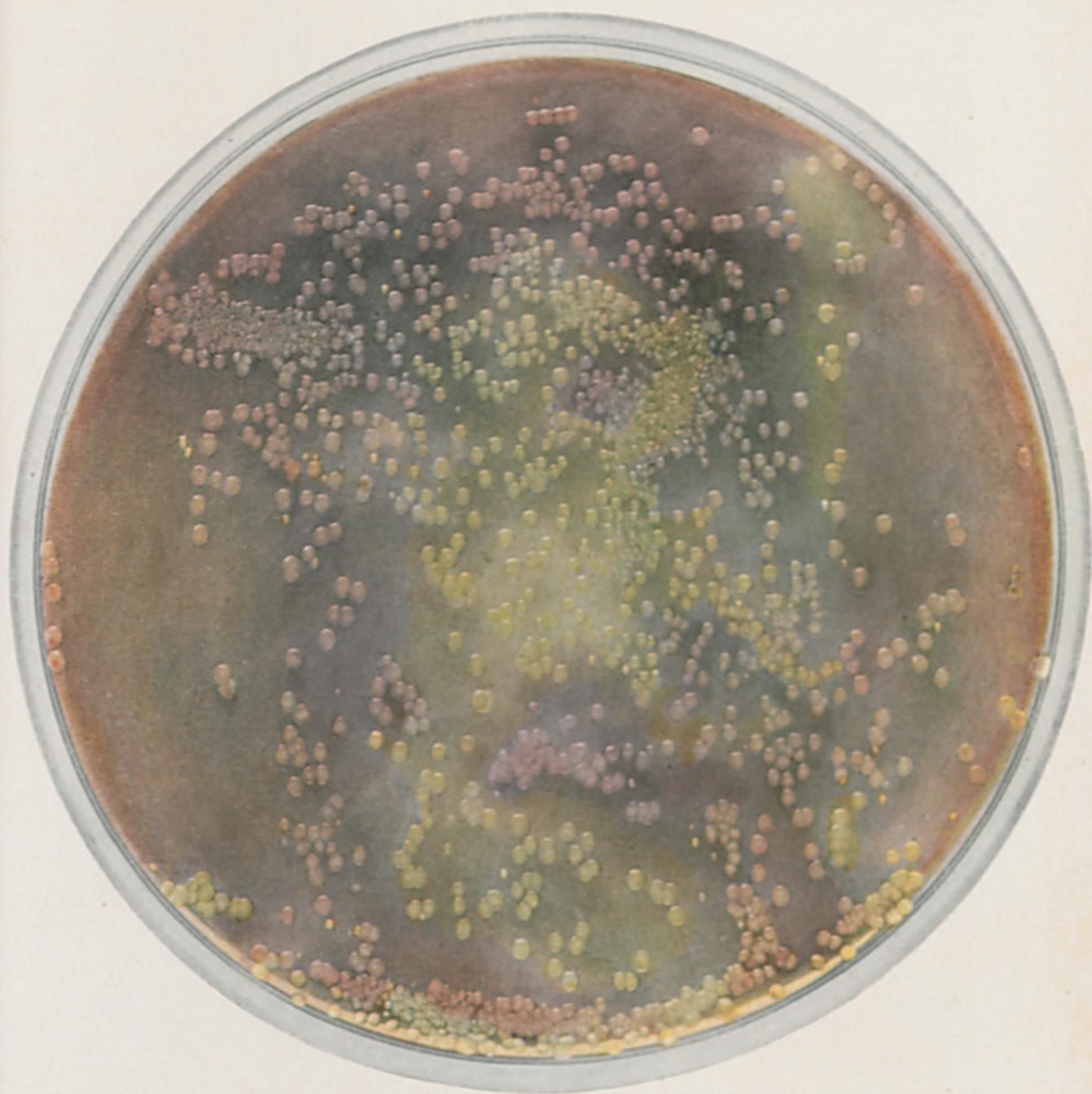


Fig. 1

Placa de Petri com agar-rosolico.

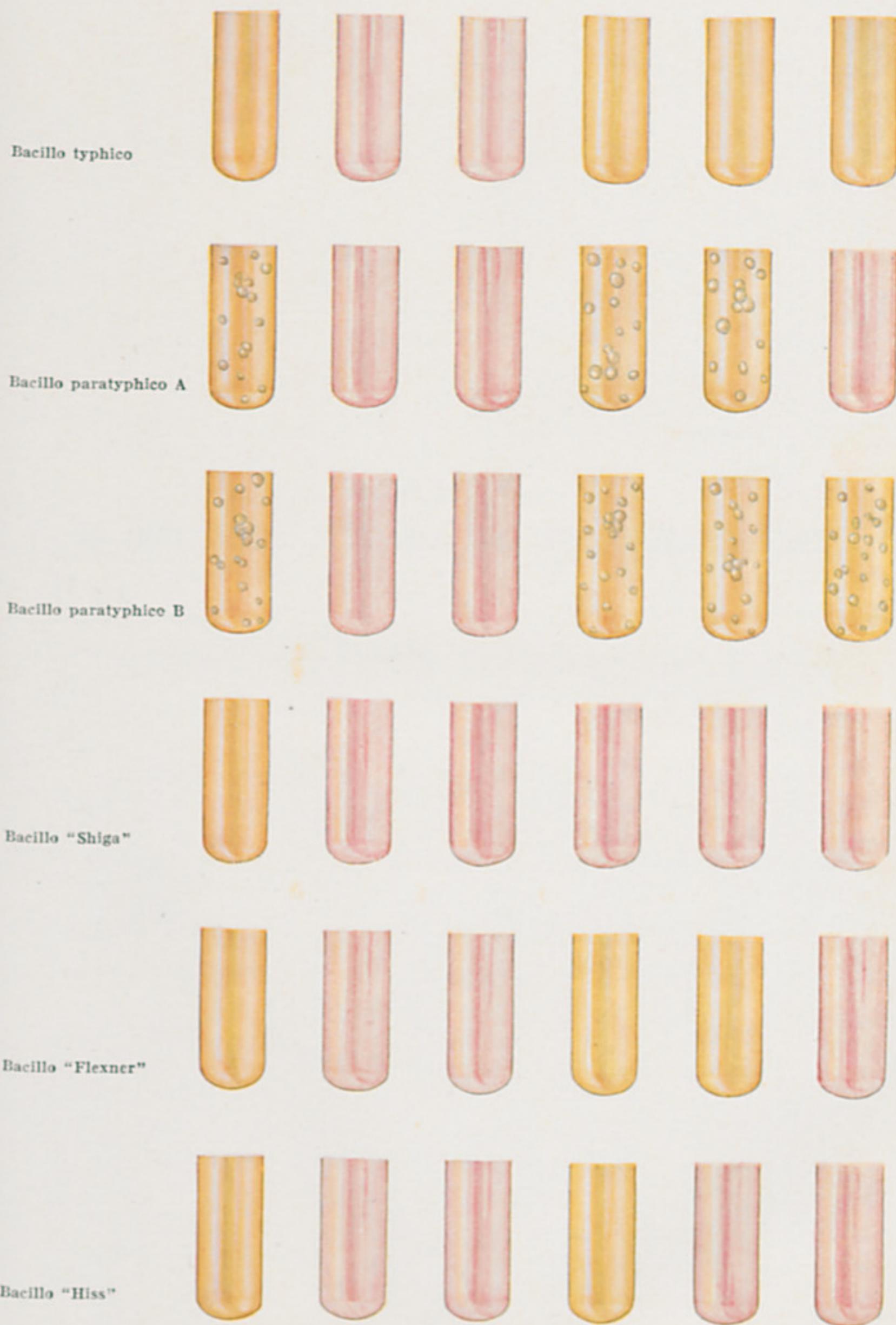


Fig. 2

Serie de Hiss com indicador rosolico.