Alvino B. Sesti

Subsidios para a identificação das raças pneumococcicas de Porto Alegre

Cadeira de Microbiologia

Trabalho feito no Instituto Pereira Filho

These de Doutoramento

1928
do Globo — Porto Alegre
ellos, Bertaso & Cia.
Santa Maria e Pelotas

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

THESE

Apresentada á

Faculdade de Medicina de Porto Alegre

Em 30 de Novembro de 1928

POR

Alvino Placido Sesti

filho legitimo de Luiz Sesti e Catharina Battaglin Sesti, natural do Rio G. do Sul, nascido em 29 de Novembro de 1904,

afim de obter o grau de doutor em medicina.

Subsidios para a identificação das raças pneumococcicas de Porto Alegre

Trabalho feito no Laboratorio Pereira Filho

1928
Livraria do Globo — Porto Alegre
Barcellos, Bertaso & Cia.
Filiaes: Santa Maria e Pelotas

Faculdade de Medicina de Porto Alegre

Prof. **Sarmento Leite,**
Director.

Prof. **Serapião Mariante,**
Vice-director.

Prof. **Sarmento Leite Filho,**
Secretario.

CADEIRAS	PROFESSORES
Physica	Ney Cabral
Chimica geral e mineral Chimica organica e biologica	Christiano Fischer
Biologia geral e parasitologia	Sarmento Barata
Anatomia humana, 1.ª parte	Moysés Menezes
Anatomia humana, 2.ª parte	Sarmento Leite
Histologia	Marques Pereira
Physiologia, 1.ª e 2.ª parte	Raul Pilla
Microbiologia	Pereira Filho
Pathologia geral	Walther Castilho
Anatomia e physiologia pathologicas	Gonçalves Vianna
Pharmacologia e arte de formular	Argymiro Galvão
Pathologia cirurgica	Ervino Presser (interino)
Clinica dermatologia e syphiligraphica	Ulysses de Nonohay
Clinica ophtalmologica Clinica oto-rhino-laryngologica	Diogo Ferraz (interino)
Clinica medica	Annes Dias (interino) Aurelio Py Octavio de Souza
Anatomia medico-cirurgica e operações	Octaciilo Rosa
Therapeutica	Paula Esteves
Clinica cirurgica	Guerra Blessmann Frederico Falk
Pathologia medica, 1.ª parte	Thomaz Mariante (interino)
Pathologia medica, 2.ª parte	Sarmento Leite Filho (subst.)
Clinica pediatrica medica e hygiene infantil	Raul Moreira (substituto)
Clinica pediatrica cirurgica e orthopedia	Nogueira Flôres
Hygiene	Freitas de Castro

CADEIRAS	PROFESSORES
Medicina legal	Annes Dias
Clinica obstetrica	Mario Totta (interino)
Clinica gynecologica	E. Paglioli (interino)
Clinica neurologica	Fabio de Barros
Clinica psychiatrica	Luiz Guedes
Medicina tropical	Basil Sefton
Zoologia geral e parasitologia	Oscar Pereira (interino)
Pharmacia galenica	Carlos Leite (interino)
Chimica analytica	Cunha Louzada
Pharmacogonosia	Waldemar Castro (interino)

Curso de Odontologia

Prothese	Cirne Lima

Professores substitutos

Sarmento Leite Filho — Nona secção (Pathologia medica e clinica medica)
Carlos Leite — Decima quinta secção (Clinica dermatologica e syphiligraphica)
Raul Moreira — Decima sexta secção (Clinica pediatrica medica e cirurgica)

Docentes-livres

Dr. Raul di Primio — Biologia geral e parasitologia
Dr. Oscar Bernardo Pereira — Microbiologia
Dr. Ervino João Carlos Presser — Medicina operatoria
Dr. Elyseu Paglioli — Clinica obstetrica
Dr. Florencio Ygartúa — Clinica pediatrica medica e hygiene infantil
Dr. Raul Jobim Bittencourt — Clinica psychiatrica

Professores em disponibilidade

Mario Pinheiro de Castro Bittencourt — Substituto
Alvaro Fróes da Fonseca — Cathedratico

Professores jubilados

Francisco de Carvalho Freitas — Pharmacologia
João Dias Campos — Therapeutica
Francisco Freire de Figueiredo — Clinica ophtalmologica
Manoel Velho Py — Hygiene

Professores honorarios

Carlos Barboza Gonçalves
Olympio Olinto de Oliveira
Protasio Antonio Alves

Professores licenciados

Alberto de Souza — Pathologia medica
Manoel Gonçalves Carneiro — Clinica pediatrica medica e hygiene infantil
Serapião Mariante — Clinica gynecologica
Martim Gomes — Clinica obstetrica

NOTA — A Faculdade não approva nem reprova as opiniões emittidas nas theses por seus auctores.

FACULDADE DE MEDICINA

CONSIDERAÇÕES INCIAES

Com o constante evoluir dos conhecimentos humanos, tambem na sciencia medica, o empirismo de outróra foi supplantado pelos methodos racionaes e o genio investigador foi cada vez mais ganhando terreno, de maneira a transformar completamente a medicina empirica dos tempos idos em uma sciencia nova, edificada sobre os solidos alicerces da experimentação.

Foi assim, que ao lado de tantas outras descobertas, hoje já brilhantemente confirmadas pela pratica, surgiram os trabalhos de innúmeros scientistas, tendentes a dividir os pneumococcos em um certo numero de raças e fazer a therapeutica das pneumococcias pela sôrotherapia especifica, de accôrdo com a raça provocadora da manifestação pathologica.

Tendo em vista os concludentes resultados obtidos por esses incansaveis experimentadores com a sôrotherapia que substituiu, com vantagens, os demais processos de tratamento das infecções por esse microbio, resolvemos abraçar esse assumpto como thema da nossa these, esperançados de conseguir, com a nossa modesta contribuição, incrementar os estudos sobre este importante capitulo, afim de que resultados praticos póssam delle surgir.

Feitas no laboratorio Pereira Filho, as nossas observações são a resultante de demorados estudos e experiencias, onde, ao lado dos escolhidos dados technicos, encontrareis a mais sincera imparcialidade na interpretação dos resultados.

Para claresa, dividiremos nosso trabalho em 5 capitulos, de accôrdo com o summario que segue:

I CAPITULO

I — Da importancia do assumpto.
II — Principaes meios de cultura do pneumococco, sua technica de preparação e caractéres das culturas.
III — Isolamento e Identificação dos pneumococcos.
IV — Classificação dos pneumococcos pela sôro-agglutinação.
V — Observações e conclusões.

FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Da importancia do Assumpto

Ao iniciarmos o estudo e a identificação das raças de pneumococcos que grassam entre nós, cumpre realçar, desde logo, a necessidade de se fazer uma apreciação da frequencia das pneumococcias assim como da mortalidade que ellas têm determinado em nosso meio e confrontar essa mortalidade com a produzida nos paizes em que já se tem feito, não só a classificação desse microbio, como tambem a respectiva sôrotherapia especifica.

Na impossibilidade absoluta de fazermos uma estatistica, abrangendo todas as pneumococcias, limitamonos ao quadro que segue, que é uma relação das pneumonias lobares agudas registradas no hospital Santa Casa de Misericordia, fornecendo-nos, ao mesmo tempo, a indicação da gravidade que essa molestia tem attingido no nosso meio.

QUADRO N.º 1

PNEUMONIA LOBAR AGUDA

Anno	N.º de doentes		Total	N.º de mortos		Total	Por cento
	H.	M.		H.	M.		
1925	60	14	74	12	3	15	20,2%
1926	52	20	72	16	6	22	30,5%
1927	74	16	90	19	4	23	25,5%

Total dos doentes 236 Total de mortes 60 Porcentagem total 25,8%

Como vemos no quadro numero 1, em 1925 trataram-se nesse hospital 74 pneumonias, tendo morrido 15 doentes, o que dá uma cifra de 20,2 %. Em 1926 trataram-se 72 pneumonias, tendo morrido 22 doentes, portanto uma cifra nada desprezivel de 30,5 %. Em 1927 trataram-se no dito hospital 90 pneumonias, em consequencia das quaes morreram 23 doentes, isto é, 25,5%.

Sommando-se esses resultados notamos que, em 3 annos, só no hospital Santa Casa de Misericordia estiveram 236 pessoas atacadas de pneumonia, 60 das quaes pagaram com a vida o seu tributo a essa doença, tendo havido, por conseguinte, uma mortalidade de 25,8%. O que tambem deve ser notado é que a immensa maioria dos obitos foi de individuos, contando menos de 40 annos de idade.

Parece, pois, que a pneumonia não é muito rara em nosso meio, convindo ainda observar que é quasi exclusivamente no inverno que ella grassa.

Si volvermos agora os olhos para outros paizes e compararmos a percentagem da mortalidade por pneumonia com a nossa, ficaremos estupefactos, vendo que, em muitos delles essa mortalidade, que era até superior á nossa, declinou a cifras verdadeiramente admiraveis. Basta citarmos os resultados de Cole, em New York, que conseguiu, graças á sôrotherapia especifica, em 235 doentes baixar a mortalidade a 10,5 % quando ella era de 25 a 30 % nos doentes nãotratados pelo sôro.

Com a classificação dos pneumococcos em raças, feita na America do Norte, por Cole, Walker, Paul Lewis, Mathers, Stilmann, Lacy e Hartmann, e na França por Nicolle e Debains, surgiram os estudos tendentes a dar bases solidas ao tratamento sôrotherapico. Foram, então, preparados sôros especificos com as raças isoladas, fazendo-se uso de tal ou tal sôro, conforme a raça que estivesse em acção. Com o sôro anti I, que é o mais

efficaz, conseguiram os americanos do norte, nas pneumonias do typo I, baixar a mortalidade, de 25 a 30 %, a 7,5 %. Com o sôro anti II os resultados foram menos notaveis; com o anti III quasi não obtiveram vantagens, e contra o typo IV, heterogeneo, não lograram resultados, por ausencia de sôro monovalente.

O Dr. Beaujean, no hospital Frejus, e o Dr. Blazy, no hospital São Raphael, tratando de Senegalezes, conseguiram resultados dignos de nota, dada a gravidade das pneumonias nos negros. O primeiro, em 73 pneumonicos, dos quaes dois eram tuberculosos, perdeu apenas 9 comprehendidos os 2 tuberculosos; cada doente recebeu, em media, 80 a 100 cm^3 de sôro. O segundo, no hospital São Raphael, conseguiu o seguinte resultado:

Primeira serie: — (de 15 de Maio a 31 de Agosto de 1917) em 107 pnenmonicos tratados com sôro, 18 mortes, seja 16 %.

Segunda serie: — (Abril a Maio 1917) pneumonias não tratadas pelo sôro, mas pelos meios habituaes: revulsão, estimulantes, tonicardiacos, etc., mortalidade 30 %.

Terceira serie: — (Agosto 1917) pneumonias não tratadas pelo sôro, mortalidade 32 %.

O Dr. Lassance do hospital Sainta-Maria, de Belfort, diz ter obtido resultados surprehendentes em 71 casos de pneumonia lobar franca e em 3 casos de pneumonias generalisadas com o sôro anti-pneumococcico do Instituto Pasteur.

Emfim, para não ir mais longe, citamos apenas as opiniões de alguns dos innúmeros medicos que se têm occupado da sôrotherapia anti-pneumococcica.

Cotoni diz considerar a acção do sôro anti pneumococcico como indubitavel no tratamento da pneumonia. Saequépée numa publicação diz: "Nous ne connaissons jusqu'à ce jour aucun traitement qui donne

dans la pneumonie de l'adulte aussi bons resultats". Caurcaux el Deglaire escrevem: "L'entrée dans la pratique de la sôrothérapie antipneumococcique, constitue un progrès important dans le traitement des pneumapathies aigües à pneumocoques".

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE
BIBLIOTECA

II CAPITULO

Principaes meios de cultura do pneumococco, technica de sua preparação e caractéres das culturas

E' o pneumococco um germen delicado para se cultivar. Tem como temperatura optima de desenvolvimento 37° e como limites extremos 24° e 42°. Embóra anaerobio facultativo, desenvolve-se melhor em presença do ar e requer um meio ligeiramente alcalino.

Como os meios mais correntemente usados nos laboratorios não são muito apropriados para a cultura do pneumococco, passaremos rapidamente em revista os principaes delles, reservando maiores detalhes a certos meios especiaes que se prestam melhor ao seu desenvolvimento, como o meio de Cotoni, que temos utilisado nas culturas por nós feitas, quando elaboramos as observações que acompanham este trabalho.

MEIOS LIQUIDOS

Caldo Martin — O desenvolvimento do pneumococco é pouco abundante, ha em 24 horas uma ligeira turvação do meio, e depois a formação dum deposito pulverulento com esclarecimento do meio.

Em **Caldo Glycosado** a 8 % e **Caldo-ascite** a cultura é mais abundante.

O **sôro liquido de coelho** novo foi preconisado por Mosny como bom meio de cultura e Bezançon e Griffon acham que é tanto mais favoravel, quanto mais novo

fôr o animal. Nesse meio o pneumococco vegeta abundantemente, prepondera sobre os outros germens e reveste seu aspecto microscopico caracteristico (diplococco lanceolado encapsulado).

E' um bom meio para diagnostico.

Gilbert e Fournier reconhecem no **Sangue Desfibrinado** um bom meio de cultura e conservação do pneumococco, no qual elle mantem, por muito tempo, a sua vitalidade e virulencia, mas a morphologia não é caracteristica. Nesse meio a cultura em estria dá uma coloração primeiro esverdeada e depois amarello claro.

MEIOS SOLIDOS

Gélose — Neste meio a cultura não é muito rica, ha em 24 horas a formação de pequenas colonias transparentes com o aspecto de gottas de orvalho (Fraenkel) e mais visiveis pela reflexão.

O pneumococco do typo III e algumas amostras do typo II dão em 24 horas colonias brilhantes, translucidas e de aspecto mucoso, do tamanho duma cabeça de alfinete, as quaes conflúem facilmente, formando um enducto mucoso que, retirado com fio de platina, se estira em filamento.

A **Gelose-ascite** é um meio superior ao precedente e fornece colonias com aspecto identico.

Convem, porém, accentuar que nenhum dos meios acima mencionados corrige os dois grandes caracteristicos do pneumococco: A difficuldade de sua cultura e a difficil conservação dellas.

Assim, quando nos limitamos a empregar o caldo ou a Gelose para o cultivar, ou o microbio que sáe do organismo não se habitúa a esses meios e a cultura não é obtida, ou as primeiras culturas vegetam, mas as repicagens tornam-se impossiveis e a colheita microbiana se torna cada vez mais escassa. Com o objectivo de

conseguir remover esta dupla difficuldade, L. Cotoni, C. Truche e Nicolle, depois de muitos ensaios e longas experiencias, apresentaram novos methodos de cultura para o pneumococco, dos quaes nos occuparemos com mais attenção por serem elles, não só de extrema facilidade, como tambem por serem os que empregamos nas nossas culturas, com os melhores resultados.

1.° **Meio T. de Cotoni.** — Designa-se sob esse nome uma agua peptonada a 4 % (peptona de Chapoteaux), salgada a 0,5 % e glycosada a 0,2 %, de reacção ligeiramente alcalina. Num litro de agua distillada, aquecida em banho-maria a 80°, dissolvem-se 40 grs. de peptona Chapoteaux, 5 grs. de sal marinho e 2 grs. de glycose pura. Alcalinisa-se com soda até reacção ligeiramente rosea da phenol-phtaleina; leva-se á ebullição durante 5 minutos, filtra-se, reparte-se e esterilisa-se levando-se a temperatura a 110° durante 15 minutos. A peptona Chapoteaux (albumoses-peptona) não póde ser substituida nem pela peptona Witte (albumoses), nem pela peptona Defresne (peptona peptides), sem que as culturas se tornem precarias, não chegando além de 2 repicagens. Esta nota é particularmente importante, a mudança de peptona leva a insucesso nas culturas (culturas facilmente antolysaveis e desapparecimento dos germens, donde as repicagens negativas). A titulagem da peptona Chapoteaux não póde ser reduzida á metade, sem que se provoque uma diminuição crescente do desenvolvimento e parada ao cabo de 6 a 7 passagens. O sal marinho não póde ser substituido pelo KCL (culturas escassas). Emfim, não convem elevar a quantidade de glycose acima de 0,2 %, sem que a acidez se exagere e os germens sejam fatalmente attingidos na sua vitalidade (e por conseguinte na sua virulencia). Com 0,2% de glycose não se observa senão uma leve acidez e sem inconvenientes praticos e, com 0,1 %, as culturas tornam-se muito pobres. O meio T tem a vantagem de

permittir repicar indefinidamente; semeando-se 1 gotta de sangue pneumococcico em 10 cm³ de meio T e, fazendo-se com 24 horas de intervallo, 16 repicagens, sempre com 1 gotta de semente para 10 cc. de liquido á temperatura de 37°, no fim das 16 passagens, a quantidade não varia e o germen do ultimo tubo é virulento. A riqueza das culturas é consideravel e para certas raças o deposito de 10cc. centrifugados chegou a dar nas mãos de Cotoni 3 cg. de materia microbiana.

O meio S só differe do precedente por contar apenas 1 gr. de glycose por litro.

O meio T-ascite contem por 2 partes de meio T, uma de ascite recolhida asepticamente e não filtrada.

Gelose T é feita ajuntando-se 20 grs. de gelose a cada litro de meio T. Uma vez dissolvida a gelose no meio T aquecido, alcalinisa-se a mistura até a côr rosea da phenolphtaleina, reparte-se em tubos e esterilisa-se aquecendo-a a 110° durante 20 minutos. Antes de tirar os tubos da autoclave, espera-se 30 minutos para inclinal-os, os flocos mais volumosos, que escurecem o meio, se depositam assim no fundo dos tubos. A suppressão da filtração que simplifica a technica, tem a vantagem de tornar o meio mais nutritivo (phenomeno geral indicado já ha muito tempo por Nicolle). A transparencia é sufficiente, e este processo permitte eliminar completamente o emprego da gelose-ascite, duma preparação mais complicada.

CARACTÉRES DAS CULTURAS EM MEIO T, E GELOSE T.

A cultura no **MEIO T** apresenta uma turvação mais ou menos densa e a riqueza varia conforme a amostra observada.

Cotoni diz ter conseguido 3 cg. de substancia microbiana viva em 10 cm³ de cultura, mas é uma cifra

raramente observada. O mesmo auctor distingue um typo "magro" e um typo "gordo", cujas abundancias nas culturas estão entre si, como 1 para 1,5. O typo "magro" em meio T não foi encontrado por aquelle auctor sinão nas amostras virulentas. A reciproca não é verdadeira, pois diversas amostras virulentas fornecem culturas muito ricas em meio T. Nas nossas observações pessoaes, sempre a germinação no meio T foi abundante, e não tivemos occasião de encontrar o typo magro de Cotoni.

Em Gelose T. — Segundo Cotoni, as colonias de pneumococcos de 24 horas têm aspecto muito variavel. A forma é redonda ou oval, raramente umbilicada no centro; de altura variavel e de 1 a 4 mm. de diametro.

A transparencia das colonias em "gottas de orvalho" (forma classica) encontra-se apenas em certos especimens.

O que se vê, o mais das vezes, são colonias ligeiramente transparentes, arrendondadas, do volume duma cabeça de alfinete. Depois de 24-48 horas as colonias pódem perder a transparencia e tomar um aspecto cremoso, amarellado ou esbranquiçado que nada têm de caracteristico. Nesses casos recommenda o mesmo auctor que se examinem as colonias mais novas e, mesmo assim, a differenciação com o estreptococco é muitas vezes impossivel pelo simples exame das colonias.

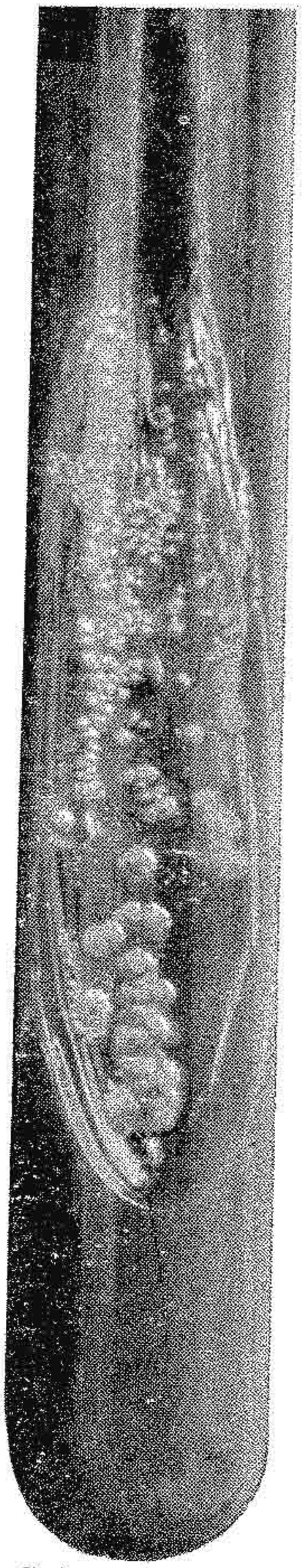
Burger descreve como caracteristico das colonias de certos pneumoccocos em Gelose-ascite, o seguinte aspecto: depois de 18 a 24 horas as colonias apresentam-se chatas, regularmente arredondadas, e, vistas pela reflexão, são hyalinas, com centro deprimido; vistas por transparencia, dão o aspecto de manchas leitosas, com centro translucido: é o **typo em annel.**

Segundo o mesmo pesquizador o aspecto em questão é, porém, inconstante e Cotoni julga ser a forma umbilicada por elle descripta e recommenda não se con-

fundir este typo de colonia com as em annel periferico saliente e centro superelevado de certos estreptococcos. Nas nossas observações as culturas em Gelose T têm-se apresentado sob varios aspectos, mais commummente são colonias amarelladas, que convergem no fim de certo tempo formando um enducto mucoso; a forma em gottas de orvalho tambem não é rara, principalmente nas culturas do typo I e algumas do typo II.

A estampa n.º I é a photographia da cultura em gelose T do pneumoccoco typo III que identificamos com a observação n.º 6 do escarro dum pneumonico.

Como se póde ver, as colonias são arredondadas, variando de tamanho e de aspecto, conforme a idade, assim as mais antigas apresentam-se maiores e muito semelhantes ás de estreptococos, ao passo que as mais novas são pequenas e translucidas, mais faceis de se reconhecer como colonias de pneumoccocos.



Cultura em Gelose T, do pneumococco typo III identificada com a observação n.º 6 ;

FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA
BIBLIOTECA

FACULDADE DE MEDICINA
BAHIA

III CAPITULO

Isolamento e identificação dos pneumoccocos

Isolamento: Dois processos temos empregado para isolar o pneumococco. Inoculação no Rato e cultura nos meios indicados por Cotoni. Feito o exame directo (pelo Gram ou coloração de capsulas) do material suspeito: escarro, púS, serosidades, sangue, e outros materiaes, recorremos, ao mesmo tempo, á cultura in-Vivo pela inoculação no rato e á semeadura em Gelose T.

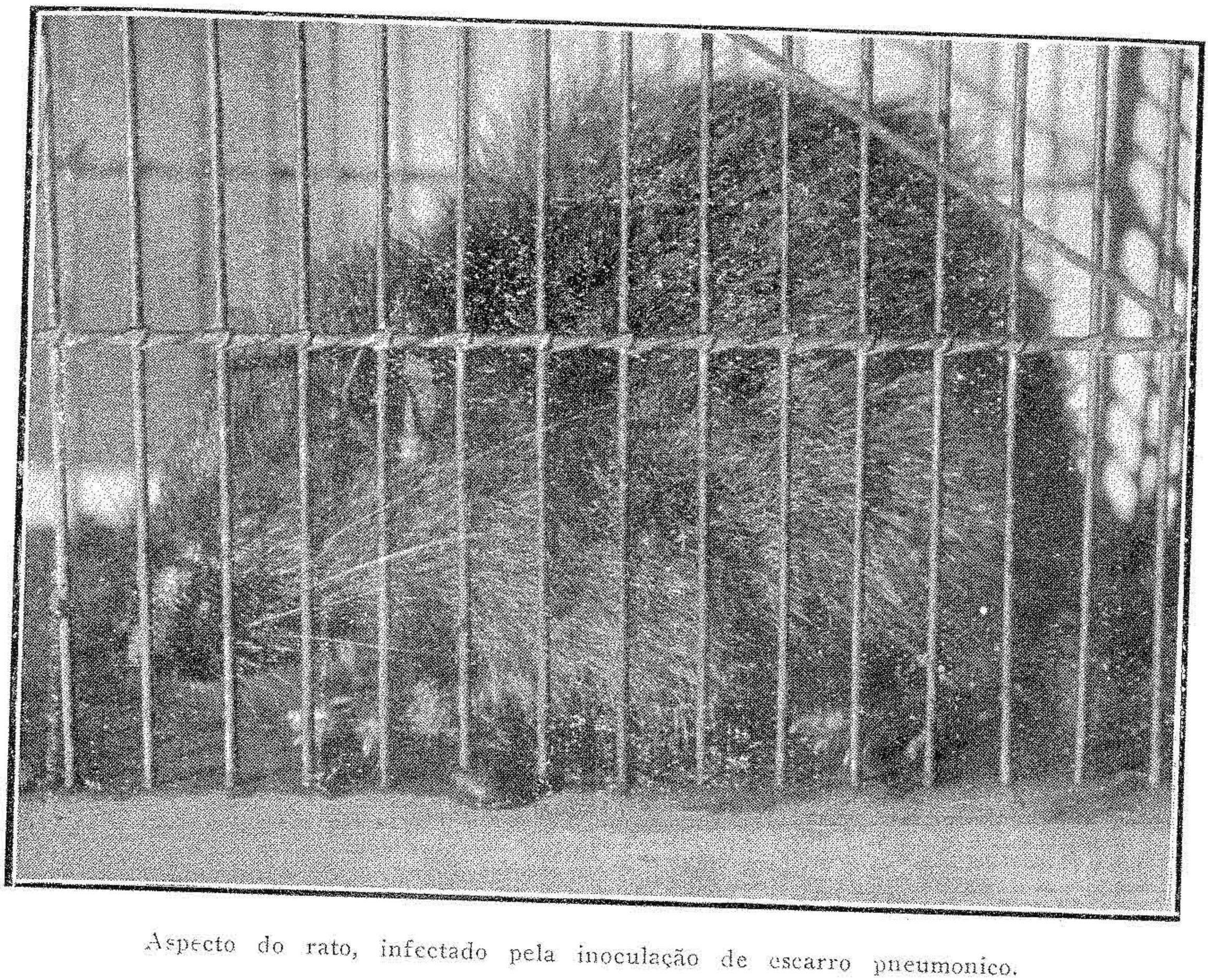
1) **Inoculação no Rato**—E' o meio mais pratico e rapido de isolar o pneumoccoco, pois o Rato tem uma sensibilidade electiva por este microbio que prolifera abundantemente, chegando-se em 24 horas a obtel-o em estado de pureza no sangue do animal inoculado. Faz-se a inoculação do escarro diluido, sob a pelle do animal, na base da cauda ou na coxa, e em um lapso de tempo variavel de 18 a 36 horas, antes que a morte se dê, logo que o rato apresentar symptomas manifestos de infecção profunda (vide estampa II), precipita-se a sua morte pela inhalação de ether, fazendo-se então a colheita do sangue do coração. Para isso, depois de aberto o thorax com instrumentos flambados, cauterisa-se um ponto do coração e nesse ponto introduz-se uma pipeta esterilisada, aspirando o sangue com pneumoccoeos, no estado de pureza. Feito isso, faz-se a semeadura com o respectivo sangue em tubos de Gelose T e meio T, obendo assim culturas puras, promptas para a identificação.

2) **Isolamento por meio de culturas** — Si o material examinado é presumido puro, tal como o sangue recolhido asepticamente das veias, semeamol-o directamente no meio T. Para fazer-se uma boa hémocultura semea-se 15 a 20 cm3. de sangue a examinar num balão contendo grande quantidade de meio T, (200 cm3) anteriormente aquecido a 37.° e deixa-se na estufa, á mesma temperatura, obtendo-se assim culturas em condições de serem identificadas. Si ao contrario o producto é impuro, como por exemplo o escarro pneumonico, é indispensavel fazer o isolamento em meio solido. Lavamos uma parcella do escarro em diversos vidros de sôro physiologico estirilisado e semeamos esse material em placas de Gelose T. Depois da cultura a 37.°, durante 24 horas, escolhemos as colonias mais caracteristicas e, após examinal-as, repicamos em meio T, obtendo então culturas puras. No caso de não se obter desenvolvimento, ou ser elle retardado no meio T, fazemos a semeadura directamene em meio T-ascite que dá culturas ricas. Esta unica passagem em meio T-ascite tem por fim assegurar o constante desenvolvimento do germen nas segintes repicagens em meio T. Graças á presença do liquido d'ascite, o pneumoccoco se deshabitúa pouco a pouco dos humores do organismo e vegeta em seguida sem a menor difficuldade no meio T, meio rico em peptona e assucar. São principalmente as amostras que, em Gelose, se apresentam em colonias muito finas e oriundas de germens muito virulentos, que, ás vezes, requerem este processo.

Identificação das culturas

Nas culturas obtidas, seja directamente, seja após passagens em animaes, é indispensavel o exame minucioso afim de identificar o pneumoccocos, dada a faci-

ESTAMPA II



Aspecto do rato, infectado pela inoculação de escarro pneumonico.

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

lidade que ha de se o confundir com o estrepto e entero-roccoco.

Procuraremos, portanto, ao mesmo tempo que estudarmos os principaes caractéres dos pneumoccocos, delinear tambem os meios de identifical-os no grupo pneumo-entero-estreptoccoco, tão infinitamente ligados pelos seguintes caractéres communs: 1) Coccos susceptiveis de agrupamentos em cadeias, 2) frequencia de capsulas, 3) coloração pelo Gram e 4) não liquefação da gelatina.

A forma dos pneumoccocos em diploccocos lanceolados, encapsulados, Gram positivos immoveis e dispostos em 8 é muito caracteristica, mas não é constante e nem pathognomonica, assim nas culturas o aspecto arredondado dos coccos e a disposição em cadeias e grupos não é rara, podendo ser confundido com o estrepto, entero e estaphyloccocos.

Gasse e Trouche, pela simples mudança de meio, com um pneumoccoco que em meio T-ascite era nitidamente lanceolado, obtiveram até uma forma apresentando o aspecto de bacillos diphtericos curtos.

Tambem não é raro encontrarem-se formas monstruosas no exsudato peritoneal dos cobaios infectados pelo pneumoccoco.

Por outro lado, o estreptoccoco póde, por sua vez, assemelhar-se ao pneumoccoco, apresentando-se em cadeias curtas e aspecto lanceolado, e o enteroccoco lembra o pneumoccoco, quando estudado nos productos pathologicos, onde se apresenta ordinariamente sob a forma de diploccocos lanceolados, aureolados e Gram positivos.

Assim, para sua differenciação com o estreptoccoco, devemos nos lembrar que, quando os pneumoccocos se apresentam em cadeias, estas são mais curtas, menos flexuosas e formadas de diploccocos em chamma de vela, envolvidos por uma capsula que separa os diplocco-

cos componentes da cadeia uns dos outros. Quando os coccos forem pequenos, arredondados e desprovidos de capsulas, devemos ver si não ha polymorphismo dos elementos e se estes são nitidamente arredondados, o que é mais commum no estreptoccoco. Os pneumoccocos tendem sempre para a forma oval ou lanceolada.

Nos casos duvidosos, seguindo o conselho de Cotoni, fazem-se culturas nos meios addicionados de liquidos organicos, ascite ou sangue, ou a inoculação no rato, afim de se observar a morphologia dos germens, pois o pneumoccoco, nessas condições, apresenta o seu aspecto caracteristico. O enteroccoco, que tambem se póde prestar a confusões, só se assemelha entretanto ao pneumoccoco nos productos retirados directamente do organismo, onde commummente se apresenta sob a forma de diploccoco lanceolado e aureolado. Os dois elementos do diploccoco são, porém, o mais das vezes, dissemelhantes, um delles, sendo arredondado, e o outro ovoide, e dispostos em accento circumflexo, variando muito o tamanho dos elementos na mesma preparação.

A presença de capsula que, com a forma lanceolada, é um dos melhores caracteristicos dos pneumocccocos, não basta tambem para a sua identificação, sendo muitas vezes difficil pol-a em evidencia no exame das culturas, é mais constantemente encontrada nas culturas addicionadas de liquidos organicos e nos humores dos animaes infectados.

Ora, o enteroccoco é tambem o mais das vezes cercado de uma aureola e, além disso, Bordet mostrou que a capsula se desenvolve tambem em estreptoccocos inoculados no peritoneo de cobaios.

Concluindo as considerações expostas de que o aspecto morphologico não raras vezes é por si só insufficiente para identificar os pneumoccocos, estudaremos

agora alguns caractéres particulares, que o permittam reconhecer.

Para evitar repetição, não falaremos mais dos caractéres culturaes que o leitor poderá ler no capitulo referente ás culturas, mas trataremos sómente do modo como se comporta o pneumoccoco na **Gelatina**, em presença da **bilis**, da **inulina** e da **esculina**.

1) **Gelatina** — Todas as raças de pneumoccocos vegetam mal na gelatina, e, sendo 24.º a menor temperatura que o pneumoccoco requer para a sua cultura, este meio não se presta para o seu desenvolvimento. A gelatina não se liquefaz, mas as colonias são esbranquiçadas e escassas.

O entero e o estreptoccoco, pelo contrario, vegetam bem nesse meio.

2) **Inulina** — Baseados na propriedade que têm os pneumoccocos de fermentar a inulina e na falta dessa propriedade aos estreptoccocos, póde-se tambem deduzir desse facto uma circumstancia differencial entre esses dois germens. Hiss uzou para esse fim um meio composto de sôro de boi 1 parte, agua distillada 2 partes, com 1 % de tournesol a 5 %, aquecendo a mistura a 100.º. O pneumoccoco e o estreptoccoco mucoso, que actualmente é considerado como o pneumoccoco typo III, coagulam e envermelhecem o meio, ao passo que o estreptoccoco verdadeiro não produz modificações sobre esse meio. Esse caracter é, porém, impreciso, porque o proprio Hiss concluiu que o pneumoccoco póde perder in vitro essa propriedade e Levy encerrou tambem com a seguinte conclusão os seus trabalhos nesse sentido: "Os estreptoccocos não fermentam a inulina e os pneumoccocos pódem ou não fermental-a".

3) **Phenomeno de Neufeld, isto é, a solubilidade na bilis** — Neufeld observou em 1900 que uma cultura liquida de pneumoccocos, addicionada de bilis de coelho

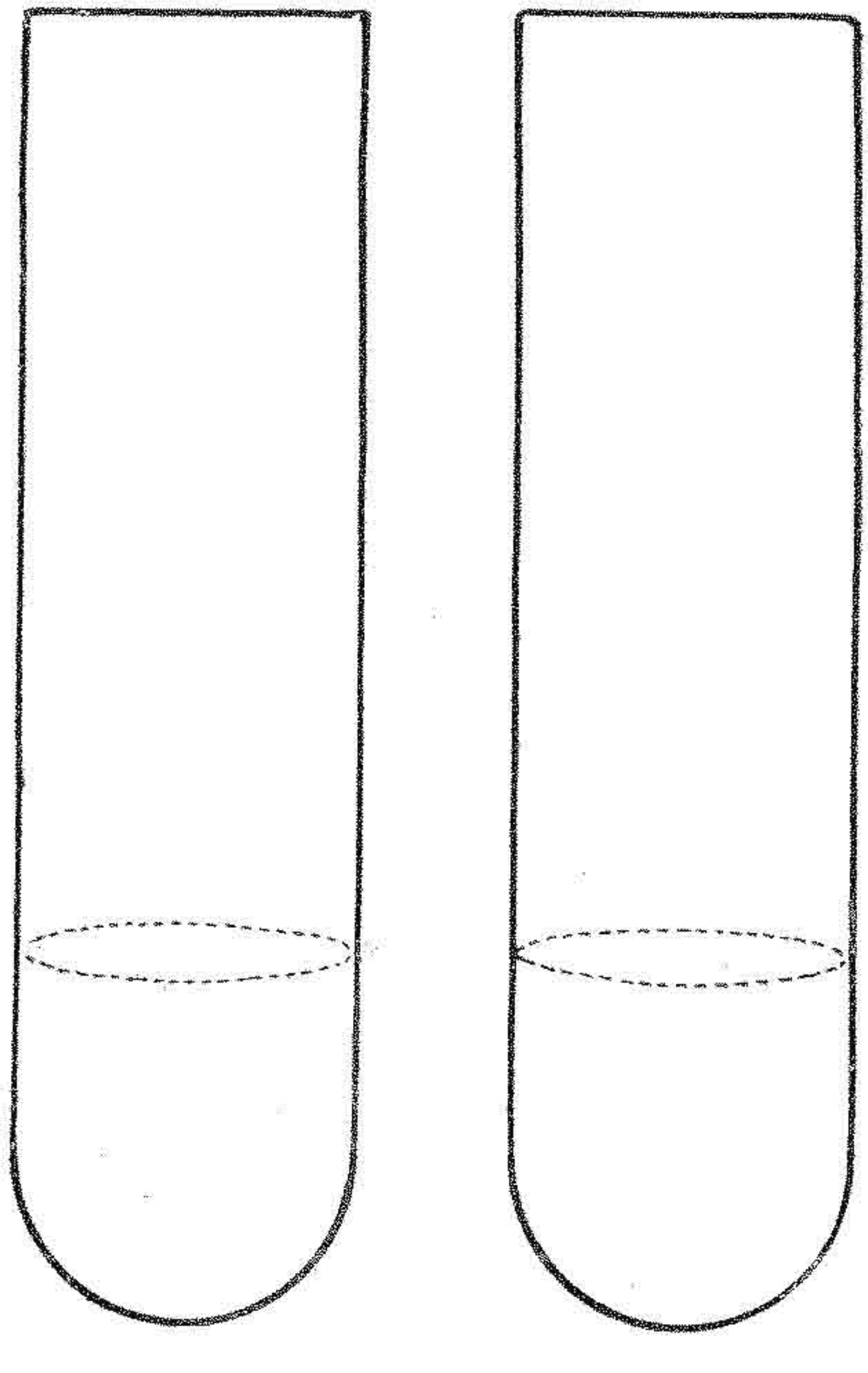
na proporção de 1 a 2 cm3. de cultura para 1 cm3. de bilis, se esclarecia rapidamente pela dissolução dos germens: o exame microscopico, as semeaduras e as inoculações deram resultados negativos. Entre as outras especies microbianas apenas tres são ligeiramente sensiveis á acção da bilis (bacteria do colera das gallinhas, bacillo do mormo e cocco bacillo pestoso). O vibrião cholerico, o bacillo typhico, o colibacillo, a bacteridia carbunculosa, o bacillo pyocyanico e o pneumobacillo são mais resistentes e o estrepto e estaphyloccoco são refractarios . O estreptococco mucoso capsulado, que actualmente é considerado como pneumococco, tambem soffre a acção da bilis. Lewy, Libman e Rosenthal são apologistas desta prova e admittem que a solubilidade nunca falta com os pneumococcos. Neufeld, Hendel e Cotoni acham que a solubilidade é apanagio das amostras virulentas, este ultimo experimentador em 74 amostras encontrou 34 soluveis e 40 insoluveis. Nas observações por nós feitas, ajuntamos 3 gottas da mistura em partes iguaes de bilis de boi e glycerina, a 1cm.3 de cultura em meio T. de 24 horas, conforme o methodo de Cotoni, e observamos o seguinte resultado: em 12 dellas a prova da bilis foi positiva, notando-se entre essas todos os casos graves, inclusive tres terminados pela morte; em cinco casos, todos provenientes de pneumonias benignas, a prova ficou negativa.

Achamos que na realidade os pneumococcos virulentos são os que mais facilmente soffrem a acção da bilis, mas que essa propriedade não deve ser tomada muito a rigor, como demonstrativa da virulencia da cultura, porque, nas nossas experiencias, diversas culturas pneumococcicas de virulencia não pouco elevada, foram tambem dissolvidas pela bilis.

FACULDADE DE MEDICINA

ESTAMPA

Phenomeno de Neufeld



SOLUBILIDADE NA BILIS

Quadro n.º 2

Numero da observação	Modo de terminação da pneumonia donde proveio o material		Consequencias da inoculação experimental no rato			Acção da Bilis	
	Cura	Morte	Indifferença	Cura	Morte	Positiva	Negativa
1	+	0	0	0	+	+	0
2	0	+	0	0	+	+	0
3	0	+	0	0	+	+	0
4	+	0	—	—	—	0	+
5	+	0	0	+	0	+	0
6	+	0	0	0	+	—	+
7	+	0	0	+	0	0	+
8	+	0	—	—	—	0	+
9	+	0	0	0	+	+	0
10	0	+	0	0	+	+	0
11	+	0	+	0	0	+	0
12	+	0	0	0	+	+	0
13	+	0	—	—	—	+	0
14	+	0	—	—	—	+	0
15	+	0	—	—	—	+	0
16	+	0	0	0	+	+	0
17	+	0	—	—	—	0	+
	14	3	1	2	7	12	5

\+ significa a verificação do facto indicado.
0 " a não verificação do facto indicado.
— " não ter sido feita a pesquiza.

FACULDADE DE MEDICINA

4) **Esculina** — Glucoside extrahida da casca do castanheiro da India, póde ser desdobrada, sob a influencia de certos fermentos (emulsina), em glucose e esculetina. Certas bacterias se mostram capazes de realizar esta decomposição, ao passo que nas mesmas condições de experiencia, outras não gozam desta propriedade. Esta particularidade póde servir de diagnostico differencial entre o grupo estrepto-entero-pneumococco.

Estudado pela primeira vez por Harrison e Van der Leck em 1908 para a identificação do colibacillo e em seguida por Klotz, Rankin, Loknis e Aimée Horowitz que estudaram o colibacillo e o Proteus vulgaris; foi retomado o seu estudo por Rochaix e Sarda que a applicaram como meio de differenciação do grupo acima mencionado.

Technica das culturas — Póde-se pesquizar, seja a glucose libertada pela cultura, seja a esculetina, phenol complexo, que se póde pôr em evidencia pelo citrato de ferro. Esse ultimo methodo é preferivel. O meio póde ser solido ou liquido.

a) **Agua peptonada citratada esculinada.**

Harrison e Van der Leck propuzeram o seguinte meio:

Peptona de Witte	1 a 2%
Taurocholato de sodio.....	0,5%
Esculina	1%
Citrato de ferro.....	0,05%
Agua	100 cc.

Depois da ebullição de 15 a 30 minutos, filtra-se cuidadosamente e reparte-se em tubos de ensaio.

Löknis preconisa simplesmente um caldo com:

Esculina	0,5%
Citrato de ferro.....	0,5%

Este caldo não deve ser esterilisado na autoclave. Rochaix e Sarda preferem os meios solidos, onde, segundo os seus dizeres, a reacção é mais nitida.

b) **Gelose com esculina citratada.**

Fazer ferver até dissolver em 1.000 cc. de agua:

Peptona Witte	10,0
Saes biliares (commerciaes)	2,5
Glucose	15,0

Neutralizar com soda normal, esfriar abaixo de 60°, ajuntar duas claras de ovos, levar á ebulição e filtrar, desde que a albumina esteja bem coagulada, neutralizar e filtrar. Ajuntar ao filtrado quente e claro:

Esculina	1 gr.
Citrato de ferro.....	1 "

Titular a acidez com uma solução decinormal de soda e leval-a a 0,6, seja por addição do alcalino, si a acidez for alta, seja por addição do citrato de ferro, si for muito biaxa.

O meio assim obtido, de côr cinzenta azulada è levemente fluorescente, é posto em tubos e esterilizado na autoclave pela technica habitual.

Feita a semeadura, leva-se 24 horas á estufa e lê-se o resultado. Si a reacção for positiva, a esculina resultante do desdobramento da glucoside se combina com o citrato de ferro e as colonias tornam-se negras, o meio de cultura passando pelo pardo, enegrece por sua vez bastane rapidamente.

Si a reacção for negativa, as colonias se desenvolvem com o aspecto normal e o meio conserva à sua coloração primitiva.

Certas especies dão tardiamente uma leve turvação

ao meio; é melhor não dar valor a estas reacções incompletas e só considerar como positivas aquellas que em 24 horas apresentarem uma côr negra bem accentuada.

Rochaix e Sarda, semeando em meio solido 24 amostras de enterococcos de diversas origens, obtiveram 22 vezes uma coloração negra caracteristica em 24 horas, uma reacção pouco intensa e apenas uma completamente negativa, conservando-se o meio sem modificações.

Ás amostras de pneumococcos por elles semeadas nesse meio nunca vegetaram.

Quanto aos estreptococcos, vegetam e dão colonias em "grãos de semola" identicas ás obtidas em gelose ordinaria, mas não se observa em geral nenhuma modificação da coloração no meio.

De 14 amostras differentes de estreptococcos hemolyticos de diversas origens, examinadas pelos mesmos bacteriologisas, todas deram um resultado negativo, mesmo depois de diversos dias de estufa a 37°.

Tendo os ditos pesquizadores obtido com uma amostra de estreptococco viridans um resultado positivo, com coloração negra bem nitida em 24 horas, tentaram aproveitar esse meio tambem como distinctivo entre o estreptococco hemolytico e o viridans, mas o facto não se confirmou e cinco outras amostras de viridans não deram a reacção, sómente uma dellas apresentou em 48 horas uma leve coloração escura, sem reacção nitida.

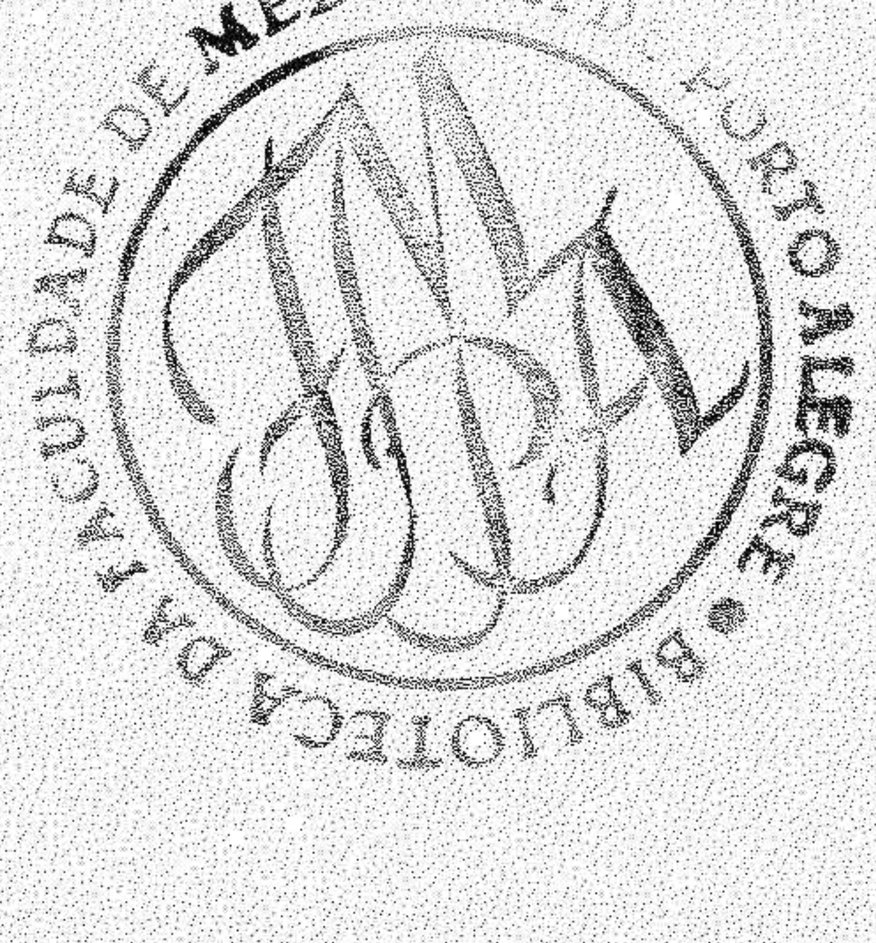
Emfim, uma amostra de estreptococco ao mesmo tempo hemolytico e viridans e uma outra de estreptococco não hemolytico nem viridans foram ambas negativas.

No total, **em 22 especimens de estreptococcos examinados, um só deu resultado positivo.**

Concluindo, dizem os experimentadores que o enterococco vegeta nesse meio e o enegrece; o estreptococco

vegeta mas não o enegrece e o pneumococco não se desenvolve nem o enegrece.

Donde a conclusão, já confirmada por Molliex e André Dufourt de que a Gelose com Esculina é um excellente meio de differenciação do grupo Estrep-entero-pneumococco.



Faculdade de Medicina do Porto

IV CAPITULO

Classificação dos pneumococcos pela sôro-agglutinação

Da mais alta importancia, a classificação dos pneumococcos constitúe hoje uma necessidade imprescindivel a todo o clinico que se achar em face de uma infecção desta naturesa; é ella que vae dar ao medico o conhecimento exacto da raça pneumococcica em fóco e, por conseguinte, ditar o sôro de que deve lançar mão, afim de fazer a sôrotherapia especifica monovalente.

As bases em que se assenta a actual classificação em raças, são muito diversas das que guiaram os scientistas antigos; assim hoje não são mais nos caractéres morphologicos e culturaes que vamos buscar elementos para classificação, mas sim na propriedade que tem o sôro antipneumococcico de agglutinar os germens da mesma raça que serviu para a sua preparação, não actuando sobre os das outras raças.

Historico

Já em 1891 Metchnikoff assignalára a agglutinação dos pneumococcos no sôro dos individuos vaccinados. Bezançon e Griffon encontraram agglutininas no sangue dos pneumonicos, ás vezes desde o 3.º dia da molestia, mas mais constantemente na defervescencia e, notando que o sôro destes doentes agglutinava muitas vezes exclusivamente o seu pneumococco, lembraram-se já, nessa occasião, da questão das raças.