

EXAME BACTERIOLÓGICO DE FEZES

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe da Subdivisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz.
Assistente do antigo Instituto Bacteriológico.

MARIA JOSÉ FARACO

Técnica de laboratório do Instituto Adolfo Lutz e do antigo Instituto Bacteriológico.

Da segurança e dos resultados satisfatórios dos exames de laboratório dependem, em grande parte, os diagnósticos. É necessário para isso o emprego de métodos seguros e experiência do técnico que trabalha, afim de escolher os meios, verificar as falhas que podem aparecer e saber interpretar os resultados.

Em geral os técnicos encarregados dos serviços de rotina têm sempre os seus métodos de escolha, com os quais têm sido bem sucedidos. Consequentemente, eles hesitam em aceitar novos métodos ou modificações a serem introduzidos nos processos velhos. Somos de opinião que devem ser padronizados os métodos de exame, principalmente aqueles que dizem respeito à identificação e classificação. Mas, os que temos em mãos nem sempre são perfeitos, devendo por isto serem feitas pesquisas para melhorar; porem, antes de adotar um método nos serviços de rotina, devemos experimentá-lo, usando inteligentemente e com consciência, comparativamente com vários outros métodos já aceitos e experimentados.

Tendo estado durante algum tempo a nosso cargo, os exames bacteriológicos de fezes do Instituto Bacteriológico de São Paulo, vamos dar aqui a técnica por nós seguida, os métodos verificados e os resultados da nossa observação. A identificação mais minuciosa e o estudo dos diversos germes por nós isolados, assim como a sua frequência, será feito em outro trabalho que pretendemos publicar muito em breve.

(*) Trabalho realizado no antigo Instituto Bacteriológico de S. Paulo. Recebido para publicação em 11-2-1942.

Alem dos serviços de rotina tivemos sempre em mente a investigação, não só para o aperfeiçoamento da técnica, como também para o estudo dos germes isolados, principalmente a sua biologia, identificação e classificação e sempre que nos foi possível aproveitámos para tirar alguma orientação para os clínicos e questões de epidemiologia.

O bacteriologista não pode dispensar a cooperação do clínico, do higienista e do epidemiologista, para que os resultados das suas pesquisas sejam mais proveitosos.

As fezes por nós examinadas foram de pessoas com disenteria, colites ou perturbações intestinais e que procuram o Instituto Bacteriológico para elucidação do diagnóstico, ou provenientes de doentes do Hospital de Isolamento, principalmente os destinados a pesquisa de portadores.

Como bem salienta E. Hormaeche e N. S. Surraco, os estudos feitos sobre os diferentes meios usados devem ser feitos em material de origem humano ou animal e não em cepas da coleção. As nossas pesquisas foram sempre feitas com fezes humanas, usadas nos serviços de rotina do Instituto Bacteriológico para exame de fezes.

Nos exames bacteriológicos de fezes são importantes não só os meios de enriquecimento e isolamento, como os de identificação.

Como meios de preservação e de enriquecimento, usamos a Glicerina aconselhada por Teague e Clurman, o de glicerina e clorureto de lítio de Gray e caldo com hipossulfito de sódio aconselhado por Leon Muller e modificado por Schäffer e por Kauffmann.

SOLUÇÃO DE GLICERINA

Solução de glicerina de Teague — A solução de glicerina e clorureto de sódio de Teague, usada pelo Instituto foi a seguinte:

Sol. de clorureto de sódio a 0,6%	700 cc.
Glicerina	300 cc.

Filtrar e distribuir em quantidade de 10 cc. por tubos ou frascos com tampão de algodão. Esterilizar no autoclave a 121° durante 20 minutos. O algodão poderá ser substituído por rolas de borracha para o transporte de fezes.

Solução de glicerina e clorureto de lítio — À solução acima, adiciona-se clorureto de lítio na proporção de 0,5 grs. para 100 cc.. Tomar uma parte de fezes, dando preferência à que contem muco e fazer uma suspensão na solução de glicerina. Logo depois fazer a primeira semeadura em placas. Se nenhuma colônia é suspeita depois de 24 horas, fazer nova semeadura com a suspensão que ficar à temperatura média de 18° a 23°.

Meio de caldo em hipossulfito de sódio — O caldo de hipossulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) foi utilizado por Leon Muller, o qual verificou ter se mostrado melhor que os meios de verde brilhante e do que verde malachite para o enriquecimento dos germes do grupo tifo e paratifo.

Usamos comparativamente o meio aconselhado por Schäffer e o meio de Kauffmann.

Meio de Schäffer — As fezes eram emulsionadas no seguinte meio e depois de 24 horas de estufa eram semeadas em placas de agar ácido resólico e de Teague:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	60 grs.
CaCO_3	25 grs.
Caldo comum (pH 7.4)	900 cc.

Esterilizar durante 25 minutos a 115° e a cada 100 cc. juntar 5 cc. da seguinte solução:

I.	12 grs.
KI	100 cc.
Água destilada	100 cc.

Esterilizar e juntar depois de frio. A mistura é distribuída em tubos de 8 cc..

Meio de Kauffmann:

Caldo comum	90 cc.
Carbonato de cálcio esterilizado	5 grs.
Sol. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (500 grs. + 100 cc. de água destilada)	10 cc.
Sol. de Iodo-iodureto de potássio (I.20 grs. + KI 25 grs. + água destilada 100 cc.) não aquecida	2 cc.

Misture tudo, porem não aqueça.

Jnnte a cada 100 cc. do caldo acima, o seguinte:

Sol. de verde brilhante (Hochstcryst extr)	
1:1000 em água destilada	1 cc.
Biles de boi esterilizado	5 cc.

Misture tudo muito bem e distribua em tubos com 8 cc. A cada tubo de 8 cc. emulsionar uma porção de fezes do tamanho de uma ervilha, ou 0,5 cc.. Depois de 16 a 20 horas de estufa a 37° será semeada em placas.

As experiências feitas comparativamente por nós, em diversas séries, deram os seguintes resultados:

1.^a Série:

Glicerina comparada com meio de Shäffer.

Fezes de disentéricos

	Totál iso- lados	Shigellas isoladas	Shiguellas Hiss Russel isoladas	Salmonellas isoladas	Eberthella typhosa isolada
Glicerina	42,1%	27,6%	21,0%	14,4%	
Shäffer	13,1%	7,8%	3,9%	0,0%	

Fezes de portadores de germes

Glicerina	39,0%	15,5%	14,2%		14,2%
Shäffer	16,8%	10,3%	9,0%		3,8%

2.^a Série:

Glicerina comparada com meio de Kauffmann

Fezes de disentéricos

Glicerina	31,4%	12,3%	9,0%	17,9%
Kauffmann ...	14,6%	10,1%	6,7%	4,4%

Fezes de portadores de germes

Kauffmann ...	9,5%			7,1%
Glicerina	7,1%			7,1%

Uma das grandes vantagens do emprego da glicerina é impedir o crescimento do germe do gênero *Proteus*.

Assim no meio de Kauffmann e de Shäffer, verificamos um crescimento de 17,0% de germes do gênero *Proteus*, enquanto que nos exames comparativos na glicerina não houve crescimento.

No emprego do cloreto de lítio, tanto na glicerina, como nas placas na proporção de 0,5%, observamos, como já foi verificado por outros pesquisadores, que não houve vantagem no seu emprego, pois impede o crescimento dos germes do grupo disentérico, além de prejudicar o crescimento do bacilo tífico.

O efeito da temperatura nos métodos de glicerina foi verificado por nós, tendo visto que a temperatura 20° é melhor que a temperatura de 37°.

O ótimo de temperatura, como já foi verificado por outros autores, é na média de 20°, sendo que as temperaturas mais altas favorecem o crescimento de outros germes e as mais baixas impedem o crescimento dos germes patogênicos.

O semeamento do material emulsionado em glicerina no período de alguns dias tem importância, pois poderá aumentar o número de resultados positivos, conforme tivemos ocasião de observar e de já ter sido observado por outros pesquisadores.

Isto é natural, porque a substância preservativa, causa o decréscimo de outros germes da flora fecal existente.

Verificamos haver vantagem em se proceder a duas sementeiras, conforme já foi aconselhado por outros com espaço de 24 horas, pois assim procedendo, conseguimos um aumento de 10,2% nos resultados por nós obtidos. Observamos que os resultados podem ser negativos na primeira sementeira e positivos na segunda.

Das experiências feitas comparativamente da glicerina com os caldos de hipossulfitos, segundo as modificações de Shäffer e Kauffmann, verificamos que o melhor método de preservação e enriquecimento é o glicerina, pois este foi o que maiores porcentagens de isolamento nos deu.

Experimentamos também comparativamente com a glicerina, o meio de selenio-F. de Leifson para isolamento da *Eberthella typhosa*, tendo se revelado ainda melhor a glicerina, pois tivemos com esta 12,2% de positivos, enquanto que com o meio F. somente 10,3% de resultados.

Como meio de isolamento, o Instituto Bacteriológico de São Paulo, depois de empregar Drigalski e Endo, passou a usar placas de agar e ácido rosólico, meio este por um de nós aconselhado

(Rangel Pestana), e o meio de ágar eosina e azul de metileno aconselhado por Holt, Harris e Teague.

Sobre as vantagens do emprego do meio de ácido rosólico no isolamento dos bacilos do grupo coli-tífico-disentérico, comparativamente com os outros meios de Endo, Drigalski — Conrardi e de verde brilhante já tivemos ocasião de demonstrar as suas vantagens, conforme trabalho publicado nas Memórias do Instituto de Butantan por Rangel Pestana em colaboração com o Dr. Sebastião de Camargo Calazans.

Este meio foi usado no Instituto Bacteriológico de São Paulo há mais de 15 anos, sendo que nos últimos 4 anos usamos sempre comparativamente com meio de Holt, Harris e Teague.

A experiência nos demonstra que ambos são bons meios para o isolamento dos germes do grupo coli-tífico-disentérico, tendo, no entanto, o meio de agar ácido rosólico a vantagem de impedir o crescimento dos germes Gram-positivos e os do gênero *Proteus*, o qual cobre quasi sempre toda a placa do meio de eosina azul de metileno, dificultando assim o isolamento de outros germes existentes. Este fato geralmente não acontece com o emprego do meio de ágar ácido rosólico, o qual impede o crescimento de *Proteus*, não deixando que ele se espalhe por toda a placa, o que facilita grandemente o isolamento dos outros germes.

Todos que estão habituados ao exame bacteriológico de fezes sabem bem as dificuldades para impedir o crescimento do *Proteus*, tendo sido aconselhados para esse fim diversos métodos como emprego do álcool, ácido fênico, e o meio de Wasserblau de Werner Herman, os quais foram experimentados por nós, mas que não superam o emprego do ácido rosólico.

Este inconveniente é maior quando se empregam os métodos de enriquecimento na sementeira direta do material a ser examinado, sendo necessário recorrer a substâncias inibitórias para o *Proteus*, como: verde brilhante, bilis, ácido pícrico, etc..

Para o isolamento do bacilo tífico tivemos ocasião de empregar o meio de bismuto aconselhado por Wilson e Blair, o qual deu bom resultado para isolamento desse germe e das salmonellas. Impedindo porem, o crescimento dos germes do grupo disentérico, torna-se necessário, quando se quer pesquisar outros germes, alem do seu emprego, o uso de um outro meio para pesquisa do grupo disen-

térico, o qual não só encarece o serviço de rotina, como aumenta o trabalho sem grandes vantagens, principalmente quando se tem numerosos exames diários e pouco pessoal, como acontece no Instituto Bacteriológico.

Não deixaremos, porem, de salientar a vantagem do seu emprego quando se tem em vista somente o isolamento dos bacilos tíficos e das salmonellas, principalmente nos casos de portadores desses germes.

O meio de bismuto deverá ser guardado na geladeira e não ser usado depois de 5 dias de sua preparação.

Recentemente E. Leifson aconselha o meio de gelose citratado desoxicolatado como um ótimo meio para o isolamento dos germes do grupo disentérico, o qual, experimentado por diversos autores, foi por eles verificado ser um bom meio para o isolamento de bacilos disentéricos, principalmente os do grupo Flexner, Sonne e Newcastle (Hardy e colaboradores, Irons e colaboradores, Hardy e Watt, Coleman), pois os germes do grupo coliforme apresentam às vezes diversos tipos de coloração, tornando difícil o isolamento de bacilos tíficos e disentéricos.

Tivemos ocasião de fazer um estudo comparativo deste meio com os agar-ácido rosólico (Calazans e Rangel Pestana) e agar eosina-azul de metileno (Holt, Harris e Teague) e os resultados por nós obtidos, já publicados, são os seguintes:

Germes isolados	Agar-deso- xicolato- citrato	Agar-ácido rosólico e agar-eosina-azul de metileno
<i>S. dysenteriae</i> Hiss-Russel	141	89
" " Flexner	27	28
" " Shiga	3	6
" " Schmitz (ambigua)	0	4
" " Harris	0	1
<i>Eberthella typhosa</i>	0	4
<i>Salmonela schottmuler</i>	0	3
TOTAL	171	135

A porcentagem de germes isolados foi de 81,5% para o meio de agar desoxicolato-citrato, calculada para o total de germes isolados (209) e de 64,5% para os meios de agar-ácido rosólico e agar-eosina-azul de metileno.

Dos bacilos disentéricos isolamos o seguinte nos meios de desoxi-colato-citrato e agar-ácido rosólico e agar-eosina-azul de metileno:

	Cresceram em todos os meios	Cresceram só em agar-desoxicolato citrato	Cresceram só em agar-ácido rosólico e agar-eosina-azul de metileno
<i>S. dysenteriae</i>	79	62	10
" " Flexner	3	0	6
" " Shiga	18	9	10
" " Schmitz (ambigua) ...	0	0	4
" " Harris	0	0	1
TOTAL	100	71	31

A porcentagem de germes disentéricos isolados a mais só no meio de desoxicolato-citrato foi de 71,0%, enquanto que só nos meios de ácido rosólico e eosina-azul de metileno, foi de 31,0%.

A porcentagem de germes isolados — *Shigella dysenteriae Hiss Russel* é maior nos meios de desoxicolato-citrato (93,3% que nos meios de agar-ácido rosólico e eosina-azul de metileno (58,9%).

A *Shigella dysenteriae Flexner* foi obtida quasi que igualmente, tanto no meio de desoxicolato citrato (27), como nos meios de agar-ácido rosólico e eosina-azul de metileno (28).

Não resta dúvida, pois, ser o meio de desoxicolato-citrato ótimo para o isolamento da *Shigella dysenteriae Hiss-Russel* e *Shigella dysenteriae Flexner*, principalmente entre nós, por serem esses germes os mais frequentemente encontrados em fezes.

Verificamos porem haver um certo impedimento para a *Shigella dysenteriae Shiga*, pois somente isolamos 3 raças no meio de desoxicolato e citrato, enquanto que nos meios de agar-eosina-azul de metileno e agar-ácido rosólico, foram isoladas 9.

Alias este fato tem sido verificado por nós em outros meios tambem, pois é fato observado, que certas cepas de *Shigella dysenteriae Shiga* são muito sensíveis até à glicerina, sendo aconselhado fazer a sementeira direta do material em placas.

Observamos que se torna necessário, para bem trabalhar com o meio de Leifson e outros, conhecer o meio e o aspécto das diversas colônias, pois que os germes do grupo coliforme, quando crescem, apresentam diversos tipos de colônias, tornando difícil o isolamento dos bacilos disentéricos, tíficos e paratíficos.

Verificamos tambem haver vantagem em ser feita a leitura das placas após 48 horas de incubação, assim procedendo, obtivemos um aumento de 20% no número dos germes isolados.

A segunda sementeira do material emulsionado em glicerina é tambem vantagem, pois obtivemos um aumento de 21% de casos

positivos para os meios de agar-ácido rosólico e agar-eosinal-azul de metileno e de 10% para o meio de desoxicolato-citrato.

É de grande importância no preparo do meio a qualidade de peptona empregada, conforme salienta Leifson. Verificamos que no meio preparado com a peptona de Witte, Merck ou de Park Davis, o crescimento dos bacilos disentéricos foi bem menor que quando o meio foi preparado com a proteose Difco. Com essa peptona os bacilos disentéricos crescem com mais abundância, dando um número de casos positivos bem maior.

Ao contrário do que verificou Leifson encontramos um poder inibitivo para a *Shigella ambigua* (Schmitz) e para a *Eberthella typhosa* e *Salmonellas*.

Impede ele também o crescimento dos germes Gram positivos, dos bacilos do grupo coliforme, das *Shigellas alkalescens* e *dispar* e dos *Proteus*.

Uma das vantagens do meio de Leifson é que devido ao poder impediante ao desenvolvimento dos germes normalmente encontrados em fezes, pode ser semeada grande quantidade de material, sendo aconselhado usar em primeiro lugar o meio de Leifson e depois as placas de agar-ácido rosólico e eosina-azul de metileno.

Interessante é aqui notar que dentre as várias raças isoladas nenhuma teve todos os seus espécimens crescendo em todos os meios, sendo, portanto, de vantagem o emprego de diferentes meios para que não sejam falhos os resultados, conforme também recomendam os outros autores que já trabalharam com o meio de Leifson.

É recomendável, pois, usar, juntamente com o meio de Leifson e de bismuto, outros meios, sendo que nos serviços de rotina do Instituto, os meios de agar-ácido rosólico (Calazans e Rangel Pestana) e agar-eosina-azul de metileno (Holt, Harris e Teague) têm dado bons resultados.

As colônias suspeitas nas placas são passadas no meio de tríplice açúcar de Krumwiede, semeando-se por picada no fundo do tubo e depois espalhando-se na superfície do meio. A produção da cor vermelha e de gás indica a fermentação anaeróbia e a fermentação sem mudança de cor e produção de gás a fermentação aeróbia.

Klinger modificou esse meio acrescentando o citrato de ferro para verificar a presença de gás sulfídrico, podendo assim diferenciar melhor os diversos germes. Verificamos, porém, não haver grande vantagem em seu emprego no serviço de rotina, dada a dificuldade de diferenciar os germes que produzem gás sulfídrico, pres-

tando-se, no entanto, para diferenciar a *Eberthella typhosa* das *Shigellas*.

Depois de 18 horas de incubação no meio de Krumwiede, verificada a sua fermentação e produção de gás, fazíamos um Gram para verificar a sua morfologia e pureza.

O germe isolado, bacilo Gram-negativo, era então semeado em caldo comum e deixado à temperatura de 20° por 18 horas, para verificar a motilidade. Usamos também os meios semi-sólidos, não havendo porém grande vantagem no seu emprego. Essa mesma cepa isolada era também passada em leite tornesolado, água peptonada para verificação de indol.

Como meio de identificação usamos o meio semi sólido de Hiss, modificado, cuja fórmula é a seguinte, aconselhado por Calazans e Pestana:

Água	1.000 cc.
Agar	8 grs.
Peptona	10 grs.
Extrato de carne	4 grs.
Cloreto de sódio	4 grs.
Gelatina	40 grs.
Ácido rosólico (Merck 1%)	5 cc.

A esse meio adicionávamos os seguintes carboidratos, na proporção de 1%: Dextrose, Lactose, Sacarose, Manita, Maltose, e Xilose, e depois de 18 a 48 horas, verificado o comportamento do germe. Em alguns casos essa verificação é levada a mais tempo, variando até 21 dias, empregando-se outros carboidratos para identificação do germe.

Ultimamente vinha também empregando o Instituto Bacteriológico esse meio, variando para o indicador, o qual foi substituído por Fenol vermelho em sol. a 0,02% na proporção de 1 cc.%, para facilidade dos serviços de rotina do Instituto.

Somos porém de opinião, conforme já foi verificado em trabalho publicado por um de nós, Rangel Pestana em colaboração com Calazans, que o emprego do ácido rosólico oferece vantagens nos serviços de rotina de exames de fezes, porque evita o crescimento dos Gram-positivos frequentemente encontrados em fezes e que funcionam na série como *Shigellas*, *Eberthellas* e *Salmonellas*.

Experimentamos também água peptonada com carboidrato e indicador, porém somos de opinião que nos serviços de rotina melhor

se presta o meio semi-sólido de Hiss, o qual deu sempre bons resultados no Instituto Bacteriológicos de São Paulo.

A identificação bioquímica era confirmada pela sorológica, quando não foi possível obter raças típicas ou soros específicos feitos com raças típicas.

Nas nossas identificações adotamos a classificação do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, quarta edição, 1934.

Das 9.810 fezes por nós examinadas, 6.719 eram de pessoas com perturbações intestinais e 3.091 provenientes de fezes enviadas para pesquisa de portadores.

Os quadros n.º 1 e 2 demonstram os resultados por nós obtidos em 9 anos de trabalhos (1932 a 1940).

No gênero *Shigella*, a *Shigella dysenteriae* (*Shiga*) foi encontrada 112 vezes e a *Shigella ambigua*, 53.

No grupo das *Shigellas para-dysenteriae*, das tres variedades admitidas por Bergey, foram encontradas as seguintes:

Hiss-Russel	764 cepas.
Flexner	256 cepas.

A variedade Strong não foi por nós encontrada durante o tempo de nossas pesquisas.

Vemos pois, que a espécie mais encontrada foi a *Shigella para-dysenteriae* variedade *Hiss-Russell*, 11,3% e depois a *Flexner*, com 3,8%, calculadas para o total de fezes examinadas (6.719).

A *Shigella dysenteriae* (*Shiga*) é mais rara, pois só a encontramos na proporção de 1,5%, calculada para o número de fezes examinadas (6.719).

No grupo *Shigella alkalescens* dispar incluímos todos os que não fermentaram a lactose e que funcionaram na série de Hiss do mesmo modo só se diferenciando pelo leite tornesolado. Sobre este grupo tencionamos, logo que nos seja possível, publicar os resultados de nossas pesquisas.

No grupo *Shigella Sonne*, estão reunidos todos os fermentadores da lactose, segundo a classificação de Bergey e que aguardam uma identificação mais demorada, e um estudo a respeito das espécies aí agrupadas.

No gênero *Salmonellas*, estão incluídos os bacilos gram-negativos, móveis, classificados, segundo Bergey, (1934) porem somente os que não dão indol, não liquefazem a gelatina e não fermentam a lactose, sacarose e salicina.

FEZES DE PESSOAS COM PERTURBAÇÕES INTESTINAIS

A N O	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	Shigella dysenteriae Shiga	Shigella ambigua	Shigella para dysenteriae tipo Hiss- Russell	Shigella para dysenteriae tipo Flexner	Shigella gru- po alkalescens e dispar	Shigella e grupo Sonne	Eberthella typhosa	Salmonellas
1932	74	405	479	13	6	41	4	1	1	1	7
1933	95	505	600	7	4	51	24	—	5	1	3
1934	165	551	716	38	3	87	27	—	3	4	3
1935	141	613	654	11	6	82	32	5	—	5	—
1936	172	637	809	5	7	91	39	10	—	10	3
1937	107	640	747	7	8	45	22	11	3	5	6
1938	150	591	741	6	5	86	32	14	3	—	4
1939	263	658	921	8	6	171	49	14	1	12	1
1940	189	763	952	17	8	110	27	16	1	9	1
	1.356	5.363	6.719	112	53	764	256	71	17	47	28

FEZES PARA PESQUISAS DE PORTADOS DE *EBERTHELLA TYPHOSA*

ANO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	<i>Eberthella typhosa</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> Shiga	<i>Shigella ambigua</i>	<i>Shigella paradysenteriae</i> tipo Hiss-Roussell	<i>Shigella paradysenteriae</i> tipo Flexner	<i>Shigella grupp</i> o <i>alkalacens</i> <i>dispar</i>
1932	55	207	262	55	—	—		—	—	—
1933	49	234	283	34	3	—		6	6	—
1934	66	221	287	52	—	1		13	—	—
1935	38	264	302	35	—	—		2	—	1
1936	82	277	359	79	1	—		1	1	—
1937	63	241	304	61	1	—		1	—	—
1938	67	324	391	63	—	—		3	—	1
1939	61	428	489	59	—	—		1	1	—
1940	123	291	414	110	1	2	1	1	1	7
	604	2.487	3.091	548	6	3	1	28	9	9

Nesse grupo estão incluídas principalmente as *Salmonellas paratypi*, *Salmonella Schottmüller*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella aertrycke* e outras espécies, as quais serão estudadas mais tarde segundo o esquema de Kauffmann.

Como já salientamos mais acima, não estão incluídos nesse grupo, por darem indol, a *Salmonella morgani*, a qual passou a ser *Proteus morgani* na classificação de Bergey (1940), a *Salmonella columbensis* (*Bacterium columbensis*) descrita também como a denominação de *Salmonella pauloensis*; esses germes muito comuns, entre nós, são frequentemente encontrados em fezes e água.

As *Salmonellas* são entre nós, muito raras, pois em 9.810 exames de fezes, somente isolamos 34, sendo que 6 foram em fezes de portadores de germes.

Nas fezes de portadores, encontramos 548 exames positivos para a *Eberthella typhosa*, seguindo-se a *Shigella para-dysenteriae*, variedade *Hiss-Russel*, com 28.

RESUMO

Das experiências feitas comparativamente com os meios de enriquecimento, caldo de hipossulfitos, segundo modificações de Schäffer e Kauffmann e a solução de glicerina, verificaram os autores que o melhor método de preservação e enriquecimento é o da glicerina, pois com este obtiveram 42,1% de resultados positivos, enquanto que com o meio de Schäffer, 31,1%. A glicerina comparada com o meio de Kauffmann, deu 31,4% de resultados positivos para a glicerina e 14,5% para o meio de Kauffmann. A glicerina experimentada comparativamente com o meio de selênio F. de Leifson, revelou-se melhor para o isolamento da *Eberthella typhosa*, pois obtiveram com a glicerina 12,2% de resultados positivos, enquanto que com o meio F. somente 10,3% de resultados positivos.

Foi verificado o efeito da temperatura nos métodos de glicerina, tendo sido observado que a temperatura de 20° é melhor que a de 37°.

Uma segunda semeadura após 24 horas é de grande vantagem, pois verificaram um aumento de 12,2% nos resultados obtidos.

Como meio de isolamento foi usado Drigalsky, Endo, o meio de bismuto de Wilson e Blair, agar desoxicolato de sódio-citrato (Leifson), agar e eosina e azul de metileno de Teague e Churman, e o meio de agar ácido rosólico, aconselhado por Rangel Pestana e Ca-

lazaras. O meio de agar-desoxicolato-citrato é estudado comparativamente com os meios de agar-ácido rosólico (Calazaras e Pestana) e agar-eosina-azul de metileno (Holt, Harris e Teague).

Conclue-se ser o meio de agar-desoxicolato-citrato um bom meio para o isolamento dos tipos de *Shigella para-dysenteriae* Hiss Rousell e Flexner, sendo entretanto necessário o emprego de outros meios diferenciais para que não sejam falhos os resultados do diagnóstico bacteriológico das disenterias.

Como meio de identificação usaram o tríplice açúcar de Krumwiede, e a modificação aconselhada por Klinger. Recomendam o meio semi-sólido de Hiss, cuja fórmula modificada é usada no Instituto Bacteriológico de São Paulo, adicionado de carboidratos para a identificação dos germes isolados, preferido como indicador o ácido rosólico.

A identificação adotada foi a classificação do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, quarta edição, 1934.

Das 9.810 fezes examinadas, 6.719 eram de pessoas com perturbações intestinais e 3.091 provenientes de fezes enviadas para pesquisa de portadores.

Os quadrados n.º 1 e 2 demonstram os resultados obtidos pelos autores em 9 anos de trabalho (1932 a 1940).

No gênero *Shigella*, a *Shigella dysenteriae* (Shiga) foi encontrada 112 vezes e a *Shigella ambigua*, 53.

No grupo das *Shigellas para-dysenteriae*, das três variedades admitidas por Bergey, foram encontradas as seguintes:

Hiss Rousell	764 cepas.
Flexner	256 cepas.

A variedade Strong não foi encontrada pelos autores, durante o tempo em que foram feitas as pesquisas.

A espécie mais encontrada foi a *Shigella para-dysenteriae* variedade Hiss-Rousell, 11,3% e depois a Flexner, com 3,8%, calculadas para o total de fezes examinadas (6.719).

No grupo *Shigella alkalescens dispar*, foram incluídas todas as espécies que não fermentaram a lactose e que funcionaram na série de Hiss do mesmo modo, só se diferenciando pelo leite tornesolado.

No grupo *Shigella Sonne*, estão reunidos todos os fermentadores da lactose, segundo a classificação de Bergey e aguardam uma identificação mais demorada e um estudo a respeito das espécies aí agrupadas.

No gênero *Salmonella*, estão incluídos os bacilos gram-negativos, móveis, classificados segundo Bergey (1934), porém, somente os que não dão indol, não liquefazem a gelatina e não fermentam a lactose, sacarose e salicina.

Nesse grupo estão incluídas principalmente a *Salmonella paratyphi*, *Salmonella Schottmülleri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella aertrycke* e outras espécies, as quais serão estudadas mais tarde, segundo o esquema de Kauffmann.

Não estão incluídos nesse grupo por darem indol, a *Salmonella morganii*, a qual passou a ser *Proteus morganii* na classificação de Bergey, (1940), a *Salmonella columbensis* (*Bacterium columbensis*) descrita também com a denominação de *Salmonella pauloensis*; esses germes muito comuns, são frequentemente encontrados em fezes e água.

As *Salmonellas* são muito raras, pois em 9.810 exames de fezes, somente isolaram os autores, 34, sendo que 6 foram em fezes de portadores de germes.

Nas fezes de portadores, encontraram os autores, 548 exames positivos para a *Eberthella typhosa*, seguindo-se a *Shigella paradyenteriae*, variedade *Hiss-Roussell*, com 28.

ABSTRACT

From the tests made using comparatively the media of enrichment, hyposulfite broth, with the modifications introduced by Schäffer and Kauffmann, and a glycerine solution, the authors verified that the best method of preservation and enrichment is that of glycerine, as this gave 41,1% positive results, while with the Schäffer's medium there were obtained only 31,1% positive results. When confronting the glycerine with the Kauffmann's medium, there were obtained 31,4% positive results for the first and 14,6% for Kauffman's medium.

The glycerine tested comparatively with the Leifson's Selenite F. enrichment medium gave better results for the isolation of *Eberthella typhosa*, as there were obtained 12,2% positive results when using the glycerine, while there were found to be only 10,3% positive results for the F. medium.

The influence of the temperature was observed when using the glycerine methods, there having been noticed that the temperature of 20°C. showed better results than that of 37°.

A second plating after 24 hours is of great advantage, as this gave an increase of 12,2% in the results obtained.

As isolation medium there were used Drigalsky, Endo, the Wilson and Blair's bismuthe medium, desoxycholate-citrate agar (Leifson), eosin-methylene-blue agar of Teague and Clurman and the rosolic-acid agar medium recommended by Rangel Pestana and Calazans. The desoxycholate-citrate agar medium is studied comparatively with the rosolic-acid agar medium (Calazans and Pestana) and eosin-methylene blue agar (Holt, Harris and Teague).

The authors conclude that the desoxycholate-citrate agar is a good medium for the isolation of *Shigella paradysenteriae* Hiss-Roussell and *Flexner* types, it being even necessary to use other differential media in order that the results of the bacteriological diagnosis of the dysenteries may not be incomplete.

For identification there was used Krumwiede's triple sugar medium, and the modification by Klinger. The semi-solid medium of Hiss, the modified formula of which is used in the "Instituto Bacteriológico de São Paulo" (Bacteriological Institute in São Paulo), carbohydrates being added for the identification of isolated germs, is recommended, the rosolic acid being preferred as indicator.

For the identification there was used the classification given in "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*", 4th. edition, 1934.

Of the 9.810 feces examined, 6.719 were from with intestinal disturbances, and 3.091 from stools sent for the examination of carriers.

Tables n.º 1 and 2 show the results obtained by the authors during 9 years of work (from 1932 to 1940).

Of the genus *Shigella*, *Shigella dysenteriae* (Shiga) was found in 112 instances and *Shigella ambigua* in 53.

In the group of *Shigella para-dysenteriae*, out of the three varieties admitted by Bergey, there were found the following:

Hiss-Roussell	764 strains
Flexner	256 strains

The authors did not find the *Strong* variety during all the time in which the examination were made.

The *Shigella para dysenteriae*, *Hiss-Roussell* variety, was the most frequent, 11,3% following the *Flexner* with 3,5%, calculated for the total of examined feces (6.719).

In the *Shigella alkalescens-dispar* group there were included all the species that do not ferment lactose and which in the Hiss series behaved in the same manner, differing only by the tornesoled milk. In the *Shigella Sonne* group, there were joined all those fermenting lactose, according to Bergey's classification, waiting still for a better identification and a study of the species there included.

In the genus *Salmonella*, Gram-negativ bacilli, mobile, are included, classified according to Bergey (1934), but only those which do not produce indol, not liquifying gelatine and do not ferment lactose, saccharose and salicine.

In this group there are included principally the *Salmonella paratyphi*, *Salmonella Schottmülleri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella interides*, and *Salmonella aertrycke*, and other species, which shall be studied later according to Kauffmann's scheme.

There were not included in this group, as they produce indol, the *Salmonella morganii*, *Proteus morganii* in Bergey's classification (1940), *Salmonella columbensis* (*Bacterium columbensis*), described also under the denomination of *Salmonella pauloensis*. These germs are very common, frequently found in stools and in water.

The *Salmonella* are very rare, as in 9.810 feces examinations the authors have isolated these in only 34 instances, 6 of which were found in stools of carriers.

In the feces of carriers the authors had 548 positive examinations for *Eberthella typhosa*, there following the *Shigella paradysenteriae*, Hiss-Roussell variety, with 28 positive results.

REFERÊNCIAS

- BERGEY — 1934 — Manual of Determinative Bacteriology, 4th. edition.
 CALAZAN, S. C. e RANGEL PESTANA, B. — 1932 — *Memmor. Inst. Butantan*, vol. 7.
 COLEMAN, M. — 1940 — *Am. Jour. Publ. Health*, 30: 39.
 CONRADI, H. e DRIGALSKI, von — 1902 — *Zeitschr. f. Hygiene*, 39: 283.
 ENDO, S. — 1904 — *Centralbl.f. Bakt., Orig.* 35: 109.
 GILBERT, R., COLEMAN, M. B. e ZIMMER, M. — 1926 — *Amer. Jour. Publ. Health*, 16: 743.
 GRAY, J. D. H. — 1931 — *Jour. Path. and Bact.*, 34: 335-342.
 HAVENS, L. C. e MYFIELD, C. R. — 1933 — *Jour. of Inf. Dis.*, 52: 157.
 HAVENS, L. C. e RIDGWAY — 1928 — *Jour. of Inf. Dis.*, 43: 345.
 HAVENS, L. C. — 1935 — The Bacteriology of Typhoid, Salmonella, and Dysentery Infections and Carriers States.

- HARDY, A. V. e WATT, J., De CAPITO, J. M. e KOLODNY, M. H. — 1939 — *Publ. Healt Rep.* 46: 287.
- HARDY, A. V. e WATT, J. — 1938 — *Am. Jour. of Publ. Health*, 28: 730.
- HOLT, HARRIS, J. e TEAGUE, O. — 1916 — *Jour. of Inf. Dis.*, 18: 596.
- HORMAECHE, E. e SURRACO, N. L. — 1941 — *Arch. Uruguayos de Med. Cirurg. y Especialidades*, 486.
- IRONS, J. V., BOLS, S. W., de SHAZO, T. HEWLETT, L. — 1939 — *Jour. of Lab. and Clin. Med.*, 25: 81.
- KAUFFMANN, F. — 1931 — *Zentr. f. Bakt.*, 119-148.
- KAUFFMANN, F. — 1930 — *Zentr. f. Bakt.*, 158-160.
- KRUMWIEDE, C. e PRATT, J. — 1914 — *Jour. Exp. Med.*, 19: 501.
- KRUMWIEDE, C. e KOHN, L. — 1917-18 — *Jour. Med. Reser.*, 37: 225.
- LEIFSON, E. — 1936 — *The Am. Jour. of Hygiene*, 24: 423.
- LEIFSON, E. — 1935 — *Jour. Path. and Bact.*, 40: 581.
- MAYFIELD, C. R. — 1933 — *Jour. of Inf. Dis.*, 52: 157.
- MULLER, L. — 1923 — *Comp. Rend. Soc. Biologie*, 434.
- PAULON, M. — 1937 — *Am. Jour. Med. Sc.*, 193: 688.
- RUYS, C. — 1940 — *Brit. Med. Jour.*, 606.
- SHÄFFER, W. — 1935 — *Centr. f. Bakt.*, 1: 485.
- TEAGUE, O. e CLURMAN, A. W. — 1916 — *Jour. of Inf. Dis.*, 18: 653.
- TABET, F. — 1938 — *Jour. of Path. and Bacteriology*, 46: 181.
- WILSON, W. J. — 1938 — *Jour. of Hyg.*, 38: 507.
- WILSON, W. J., and BLAIR, E. M. — 1931 — *Jour. of Hyg.*, 31: 138.