

IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS PATOGENICOS

(Prova da Plasmocoagulação)

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz

EÇA PIRES DE MESQUITA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

- I — Importância da identificação dos estafilococos patogênicos.
- II — Métodos de identificação dos estafilococos patogênicos.
 - A — Morfologia.
 - B — Pigmentação.
 - C — Liquefação da gelatina.
 - D — Coagulação do leite.
 - E — Provas de fermentação.
 - F — Prova do ágar violeta.
 - G — Prova de aglutinação.
 - H — Prova de bacteriofagia.
 - I — Prova de hemólise.
 - J — Prova de inoculação em animais.
- III — Prova da Plasmocoagulação.
 - A — Generalidades — Importância.
 - B — Técnica:

1) Generalidades	} Germes Meios de cultura Plasma
2) Fatores que influem na prova	
3) Condições de prova	
4) Técnica adotada.	
 - C — Resultados obtidos.
- IV — Conclusões — Referências.

I — IMPORTANCIA DA IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS PATOGÊNICOS

A identificação dos estafilococos patogênicos tem preocupado muito os pesquisadores em virtude da frequente necessidade de se estabelecer se um dado estafilococo determinou ou é suscetível de determinar um processo patológico.

A solução de um problema dessa ordem, indubitavelmente, é de suma importância, quer sob o ponto de vista clínico, quer sob o aspecto higieno-sanitário, ou ainda mesmo quando se trata da classificação bacteriológica desses germes.

Em 1926, Daranyi ocupou-se do estudo dos estafilococos patogênicos com a intenção de separá-los dos não patogênicos. Achava este autor que os estafilococos provenientes do meio ambiente eram frequentemente incriminados como patogênicos, dado o descuido com que se aplicavam os processos de identificação. Sem dúvida alguma, após o isolamento de um estafilococo do sangue, líquido, urina, das lesões da pele e anexos e dos processos inflamatórios em geral, é necessário uma prova rigorosa de laboratório para o estabelecimento de sua ação patogênica.

Como sabemos, da confirmação ou não desta ação do germe, vai depender uma resolução terapêutica que, deixada de ser tomada a tempo, poderia comprometer a vida dum paciente.

Por outro lado, a ocorrência frequente de estafilococos em produtos alimentícios constitue um problema importante de saúde pública, em vista das intoxicações alimentares que esses germes podem determinar por meio de sua enterotoxina, conforme verificaram Slocum e Linden. No serviço rotineiro de controle bacteriológico de carnes, conservas, leite e seus derivados, doces, etc., contaminados por estafilococos, percebe-se a necessidade absoluta de uma prova específica, simples e rápida, para diferenciar os patogênicos dos não patogênicos. Numa prova dessa natureza, assim julgamos, deve residir o critério simples e científico, para aprovar ou condenar, sob o ponto de vista bacteriológico, qualquer produto alimentício contaminado por estafilococo.

Com relação à classificação desses germes, evidentemente é mais importante o critério de patogenicidade que o de pigmentação das culturas. Em realidade, na prática, mais interessa ao médico e ao sanitarista saber se um dado estafilococo é patogênico ou não, do que se é *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus* ou *Sta-*

phylococcus citreus, uma vez que os estafilococos brancos podem ser patogênicos, embora os dourados o sejam com mais frequência.

A pigmentação, que tem sido o critério geral de classificação, parece não ter tanta importância, admitindo-se que um *Staphylococcus aureus* possa, em dadas condições, perder seu pigmento dourado.

Como critério de classificação é preciso considerar, pelo menos, uma propriedade específica e constante do germe, parecendo servir, neste caso, a prova da plasmocoagulação que adiante estudaremos.

Considerando a especificidade, a constância e a simplicidade desta prova, Fairbrother dividiu os estafilococos em *Staphylococcus pyogenes* e *Staphylococcus saprophyticus*, chamando a atenção para o fato de Bergey, no seu manual de 1939, não ter ainda considerado tal prova na classificação dos estafilococos.

II — MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS ESTAFILOCOCOS PATOGÊNICOS

Numerosos têm sido os métodos propostos para a identificação dos estafilococos patogênicos. Vamos passar em revista os principais, para depois estudarmos, no capítulo seguinte, o método que mais nos interessa, o da plasmocoagulação.

A. — MORFOLOGIA

A morfologia dos estafilococos tem certa importância para a verificação da sua ação patogênica.

Bier, em 1932, chama a atenção para este fato, achando que a morfologia bacteriana muito orienta na distinção entre os estafilococos saprófitas e patogênicos.

Os primeiros, também por ele chamados de saprococos, são em geral do tipo g (grosseiro) ou do tipo m (médio), enquanto que os chamados piococos, são em geral do tipo d (delicado).

Refere este autor que em 30 saprococos da pele, 11 foram do tipo g, 16 do tipo m e 3 do tipo d.

A morfologia, como vemos, é um caráter simples, mas um tanto falho, dependendo, ainda, de um fator individual, a avaliação do tamanho e forma das células bacterianas.

B. — PIGMENTAÇÃO

Numerosos autores relacionam a ação patogênica do estafilococo à pigmentação dourada das colônias.

O caráter de pigmentação das colônias, podemos dizer, é falho, quando relacionado à ação patogênica ou não do estafilococo, nisto concordando a maioria dos autôres.

Já tocámos neste assunto, quando dissemos do seu relativo valor na classificação.

Kemkes, em 1928, estudando 42 amostras de estafilococos plasmocoagulantes, verificou que dêstes, 4 *S. albus* provinham de furúnculos e abscessos e 3 *S. citreus* provinham respectivamente de furúnculo, abscesso e sinusite.

Bier, em 1932, observou que a maioria das amostras patogênicas é cromogênica, pois, em 30 amostras patogênicas, 27 eram douradas e apenas 3 brancas, enquanto que em 33 saprófitas, 26 eram brancas.

Chapman e outros, em 1934, verificaram que a pigmentação dourada, a hemólise positiva e a presença da ação plasmocoagulante dão o caráter de patogenicidade.

Cruickshank, em 1937, observou que, relacionada à hemolisina, a ação plasmocoagulante está presente em raças patogênicas, quer do tipo dourado, quer do tipo branco. Verificou que em 120 raças de *S. aureus*, apenas uma não foi plasmocoagulante, mas, por outro lado, de 50 raças de *S. albus* 20 foram plasmocoagulantes.

Fairbrother, em 1940, concluiu que a pigmentação não deve ser considerada o suficiente para se afirmar que um estafilococo é ou não patogênico.

Em 1942, Dienst e Augusta, usando ágar leite a 10%, observaram boa pigmentação das culturas, verificando que somente 3 em 36 amostras plasmocoagulantes eram *S. albus*.

C. — LIQUEFAÇÃO DA GELATINA

Em 1926, Daranyi, experimentou a prova da liquefação da gelatina, terminando por abandonar o método, pois concluiu que não dava resultados satisfatórios.

Em 1932, Bier, citando Daranyi, discordou dêste último, pois, em 30 amostras patogênicas, 29 liquefizeram a gelatina.

Vários autôres concordam com os resultados de Daranyi e outros estão de acôrdo com os achados no sentido oposto.

Achamos que a prova da liquefação da gelatina, embora possa auxiliar na identificação dos estafilococos patogênicos, é uma prova relativamente demorada e cujos resultados dependem, também, da qualidade da gelatina usada.

D. — COAGULAÇÃO DO LEITE

Daranyi observou que a coagulação do leite é uma prova muito eficaz, pois, de 30 raças que coagularam o leite, 29 provinham de focos patológicos. A coagulação do leite, segundo Daranyi, se revela de 1 a 7 dias na estufa, a 37°, sendo que algumas raças patogênicas coagulam nos 3 primeiros dias, enquanto que raças isoladas do meio ambiente coagulam, em geral, ao 7.º dia.

Há, ainda, os estafilococos saprófitas que não coagulam o leite, como também, há os patogênicos, fortemente hemolíticos e não coagulantes do leite.

A esterilização do leite deve ser feita por tindalização e há necessidade de um tubo contrôle, para se ter a certeza de que o leite não coagulou por si só, por um defeito de esterilização.

Em 1932, Bier critica as conclusões de Daranyi, dizendo ser a prova de coagulação do leite má, entretanto, em 30 raças patogênicas por êle estudadas, verificou coagulação do leite em 25.

Em 1937, Cruickshank obteve com 40 raças patogênicas — 40 provas positivas para coagulação do leite, enquanto que, em 30 raças não patogênicas, 9 coagularam o leite.

Em nossas experiências obtivemos os seguintes resultados:

De 36 estafilococos patogênicos	$\left\{ \begin{array}{l} 29 \text{ coagularam o leite entre 2 e 7 dias} \\ 7 \text{ não coagularam o leite (culturas n.ºs} \\ \text{3-4-8-21-23-26-43)}. \end{array} \right.$
De 7 estafilococos não patogênicos	

Diante de tais resultados, podemos concluir que a prova de coagulação do leite, além de não específica para o estafilococo, não revela uma propriedade constante dos estafilococos patogênicos, bem como pode ser positiva para os não patogênicos.

E. — PROVAS DE FERMENTAÇÃO

Com relação à fermentação dos carboidratos pelos estafilococos patogênicos, a maioria dos autôres têm dado algum valor apenas à manita e à lactose.

Bier, em 1932, dá pequeno valor à fermentação da manita, como elemento de diferenciação entre estafilococos patogênicos e saprófitas. Verificou que os estafilococos não patogênicos podem fermentar a manita, embora os patogênicos a fermentem com maior frequência.

Em 1937, Cruickshank, fazendo prova de fermentação com a manita e com a lactose, obteve positividade com todas as amostras plasmocoagulantes. Verificou, por outro lado, em 30 raças saprófitas, 23 de poder fermentativo para aqueles carboidratos (12 para a lactose e 11 para a manita), sendo que de todas estas raças saprófitas, nenhuma foi plasmocoagulante.

Em 1940, Fairbrother, estudando a fermentação da manita, concluiu que os estafilococos patogênicos fermentam-na até 3 dias, enquanto que os saprófitas a fermentam tardiamente.

Em 1941, Chapmann e Berens, concluíram que raramente a plasmocoagulação positiva existe em amostra não hemolítica e não fermentativa para a manita.

Trabalhando com 36 raças patogênicas e 7 raças saprófitas, obtivemos os seguintes resultados:

das 36 raças patogênicas, todas fermentaram a manita;

das 7 raças não patogênicas	$\left\{ \begin{array}{l} 4 \text{ fermentaram a manita — culturas n.ºs } 30-36-38-40. \\ 3 \text{ não fermentaram} \end{array} \right.$

Com relação à lactose, os resultados foram:

das 36 raças patogênicas	$\left\{ \begin{array}{l} 33 \text{ fermentaram a lactose} \\ 3 \text{ não fermentaram — culturas n.ºs } 12-14-31. \end{array} \right.$
das 7 raças não patogênicas	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \text{ não fermentaram a lactose} \\ 4 \text{ fermentaram — culturas n.ºs } 30-36-38-39. \end{array} \right.$

Como vemos, embora a fermentação da manita e da lactose possa ser um índice de que a raça de estafilococo é patogênica, a fermentação pelas raças não patogênicas tira muito do valor da prova.

F. — PROVA DO ÁGAR-VIOLETA

Chapman e Berens estudaram esta prova, comparando-a com a da hemólise e a da plasmocoagulação.

Consiste ela em se obter cultura do estafilococo em ágar-proteose-peptona com cristal violeta a 1:300.000. Depois de estudarem a técnica da prova, concluíram que somente as colônias com franjeado violeta são patogênicas. Apresenta esta prova o inconveniente de não ser muito prática, necessitando meio especial que deve ser preparado na ocasião do uso.

G. — PROVA DE AGLUTINAÇÃO.

Noguchi e outros empregaram esta prova para diferenciação entre estafilococos patogênicos e não patogênicos.

Koch e Fisher, citados por Daranyi, também usaram esta prova, verificando resultados pouco nítidos, sendo os cocos piogênicos muitas vezes inaglutinaveis.

Em 1940, Fairbrother, referindo-se à técnica de aglutinação segundo Cowan (1939), diz ser tal prova de resultados falhos. Dados os maus resultados não nos utilizámos desta prova.

H. — PROVA DE BACTERIOFAGIA

Em 1932, Bier estudou a sensibilidade dos chamados piococos ao bacteriófago H de Gratia, concluindo ser ela uma prova relativamente falha. Em vista do pequeno resultado que tem demonstrado, não a experimentámos.

I. — PROVA DA HEMÓLISE

E' o processo mais antigo de identificação dos estafilococos patogênicos, achando os autôres que êstes devem ter o poder de lisar hemátias. A prova é feita em placas de ágar-sangue e a sua execução não é tão fácil como parece.

Já se tem discutido qual a concentração em que as hemátias devem ser adicionadas ao ágar, e Daranyi, que estudou bastante o assunto, chegou a uma conclusão que nos parece contraditória. Assim, o citado autor, criticando Schottmüller por ter empregado ágar sangue em uma concentração excessiva (5 cc. de ágar para 2 cc. de sangue humano), diz também que a concentração muito baixa, 1 a 2%, torna fácil a hemólise para qualquer germe saprófita. Conclue, entretanto, aconselhando que se use ágar-sangue a 1% (sangue de coelho), o que nos parece uma perfeita contradição; dá à prova de hemólise um valor secundário.

Em 1932, Bier fez também provas de hemólise para estudar os estafilococos, usando ágar-sangue a 10% (sangue de carneiro). Verificou que de 30 amostras provenientes de pus, 26 foram hemolíticas e que de 33 amostras de pele apenas duas produziram hemólise. Chapman e outros acharam que a prova de hemólise é insuficiente para se afirmar ou negar se um germe tem ou não ação patogênica.

Cruickshank recomenda que a prova de hemólise seja feita com hemátias lavadas, afim de se evitar a influência da imunidade do animal.

Fairbrother é de opinião que esta prova é má: saprófitas podem dar positiva, e patogênicos negativa. Aproveitando nosso material, experimentámos também êste método de identificação dos estafilococos patogênicos. Num primeiro ensaio, verificámos que a prova é mais sensível quando se usam hemátias lavadas de coelho, ao invés de hemátias de carneiro. Em placas de ágar sangue de coelho a 5%, o germe foi semeado com fio de platina, em estria, levado à estufa a 37° durante 24 horas, permanecendo à temperatura ambiente até completar 48 horas, sendo a leitura feita em mms de área de hemólise.

Nossos resultados foram os seguintes:

das 36 raças patogênicas, 35 eram hemolíticas e apenas uma única não determinou hemólise, cultura n.º 31, isolada de salsicha que havia determinado grave intoxicação alimentar (enterotoxina). As 7 raças saprófitas não determinaram o mais leve grau de hemólise.

J. — PROVA DE INOCULAÇÃO EM ANIMAIS

Daranyi, citando vários autôres, considerou as diferentes técnicas de inoculação (venosa, intramuscular, subcutânea, etc.), resolvendo usar a técnica de inocular subcutaneamente na face interna da coxa de coelho. Com êste método, diz ter obtido melhores resultados.

Kemkes usou o método de inoculação intraarticular e obteve, também, resultados satisfatórios.

Chapman e Berens usaram o método clássico de inoculação de 1 cc. de cultura em caldo de 24 horas, endovenosamente, e obtiveram resultados falhos.

Cruikshank, usando o mesmo método, verificou que de 40 raças patogênicas, apenas 21 causaram morte de coelhos (pouco mais de 50%).

Para uma primeira prova de inoculação, lançámos mão de 10 coelhos adultos nos quais inoculamos endovenosamente 1 cc. de cultura em caldo comum (24 hs. a 37°).

Empregámos 10 raças patogênicas e obtivemos a morte apenas de 3 coelhos.

Das 10 raças patogênicas	{	3 determinaram morte de coelhos — culturas n.ºs 5-6 e 37. 7 não mataram os coelhos — culturas n.ºs 3-4-7-33-34-35 e 41.
-----------------------------	---	--

Outras vias experimentadas deram resultados menos satisfatórios ainda (subcutânea, ocular, intradérmica, etc.).

Com estas mesmas raças patogênicas resolvemos inocular camondongos, intraperitonealmente, com a dose de 0,5 cc. de suspensão de estafilococos em solução fisiológica.

Os resultados são os seguintes:

Das 10 raças	}	4 determinaram morte de camondongos — n.ºs 4-6-7-37.
patogênicas		6 não determinaram a morte — n.ºs 3-5-33-34-35-41.

Concluimos, depois da comparação feita entre os resultados da prova da plasmocoagulação com os da prova de inoculação que:

1.º — a julgar pela origem da raça estudada, a prova de inoculação em coelhos foi falha 7 vezes em 10;

2.º — admitindo-se o contrário, isto é, que as raças de fato não sejam patogênicas, teríamos que concluir que prova alguma poderia servir à identificação dos estafilococos patogênicos, senão a de inoculação em animais, pois que plasmocoagulação, hemólise, fermentação de açúcares e coagulação de leite foram positivas nos casos em que a inoculação foi negativa;

3.º — pode-se admitir ainda que a prova de inoculação resulte positiva quando o animal for suscetível e quando a virulência da cultura não estiver atenuada. Possivelmente as 3 raças que mataram o coelho se encaixam nesta hipótese.

4.º — somos partidários, pois, da opinião de que a prova de inoculação para ser bem julgada, deverá ser feita com animais isentos de imunidade para o estafilococo, o que não é tão fácil de obter. Da sua pouca segurança, podemos concluir pelo fato de que numerosos autôres a têm estudado e não têm obtido bons resultados. Relembremos, por exemplo, Cruickshank, que, com 40 raças isoladas de focos patológicos, apenas pouco mais de 50% (21 raças) determinaram a morte de coelhos.

Contra a prova de inoculação, falam ainda as suas variantes de técnica, em grande número: prova de inoculação subcutânea; inoculação intramuscular; inoculação intraarticular; inoculação endovenosa; inoculação intradérmica, etc.

III — PROVA DA PLASMOCOAGULAÇÃO

A. — GENERALIDADES — IMPORTÂNCIA

A prova da plasmocoagulação, segundo a maioria dos autôres, foi descoberta por Hans Much, em 1908. Loeb, em 1903, havia estudado a influência de certas bactérias na coagulação do plasma,

N.º	culturas	do leite						CUCHO	CAMOUROGO
1	Sicose	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
2	Úlcera gástrica	Citrina	O.	-	-	-	-		
3	Sicose	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
4	Sicose	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
5	Hemocultura	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
6	Hemocultura	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	morte em 48 hs.
7	Hemocultura	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++	morte em 12 hs.	sobrevive
8	Furúnculo	Branca	O.	+	+	+++++	+++++	morte em 12 hs.	morte em 24 hs.
9	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	
10	Antraz	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
11	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
12	Antraz	Branca	C. P.	-	+	+++++	+++++		
13	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
14	Furúnculo	Dourada	C. P.	-	+	+++++	+++++		
15	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
16	Hemocultura	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
17	Urina	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
18	Garganta	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
19	Urina	Branca	C.	+	+	+++++	+++++		
20	Col. I. A. L.	Citrina	O.	-	-	-	-		
21	Furúnculo	Branca	O.	+	+	+++++	+++++		
22	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++		
23	Furúnculo	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
24	Furúnculo	Branca	C.	+	+	+++++	+++++		
25	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++		
26	Furúnculo	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		
27	Furúnculo	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++		
28	Garganta	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
29	Abcesso	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
30	Queijo	Branca	C. P.	+	+	-	-		
31	Salsicha	Dourada	C. P.	-	+	-	+++++		
32	Sinusite	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
33	I. Butantã (Wood 3)	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++		
34	I. Buiantã (Wood 46)	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
35	I. Butantã (Sc 24)	Branca	C. P.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
36	Salsicha	Branca	C.	+	+	-	-	sobrevive	sobrevive
37	Hemocultura	Dourada	C. P.	+	+	+++++	+++++	morte em 24 hs.	morte em 48 hs.
38	Ambiente	Branca	C. P.	+	+	-	-		
39	Ambiente	Branca	C. P.	+	-	-	-		
40	Ambiente	Branca	O.	-	+	-	-		
41	Furúnculo	Branca	C.	+	+	+++++	+++++	sobrevive	sobrevive
42	Furúnculo	Dourada	C.	+	+	+++++	+++++		
43	Furúnculo	Dourada	O.	+	+	+++++	+++++		

LEGENDA: C = coagulação.
P = peptonização.
O = ausência de coagulação.

concluindo que o *S. pyogenes aureus* tem ação específica na coagulação do plasma e que isto se dava possivelmente pela ação de um ênzima.

Fazendo justiça, achamos que a prova da plasmocoagulação não deve ser chamada prova de Much, mas sim prova de Loeb-Much.

Much estudou a prova e sua técnica, porém, não lhe deu importância como prova de identificação para estafilococos patogênicos e não citou o trabalho de Loeb.

Posteriormente, Daranyi estudou muito bem a prova, comparou-a com outras (coagulação do leite, hemólise, fermentação de açúcares) e concluiu que somente coagulavam o plasma, os estafilococos provenientes de processos supurativos.

Kemkes também concluiu que a plasmocoagulação tem grande valor na identificação dos estafilococos patogênicos. A seguir, vêm os trabalhos de Gratia e Vanbreuseghen, que estudaram mais sob o ponto de vista do mecanismo de ação. Finalmente, vêm os autores americanos que a têm estudado sob o ponto de vista técnico, Wallston, Neter e Chapman, e têm concluído como sendo a melhor prova para a identificação dos estafilococos patogênicos. Entre nós, Bier estudou-a e, comparando-a com as demais provas, concluiu que é a melhor.

Nós estudamos a prova de plasmocoagulação sob o ponto de vista de sua técnica e procuramos compará-la com outras provas.

B. — TÉCNICA

1 — *Generalidades*: As técnicas empregadas são várias mas os resultados referidos pelos seus autores são semelhantes. Alguns usam sangue total oxalatado, outros usam-no citratado. Os autores modernos usam, na maioria dos casos, o plasma citratado ou oxalatado, plasma puro ou diluído com solução fisiológica. Experimentámos a técnica do sangue total e verificámos que a leitura se torna mais difícil, não sendo nítida a formação do coágulo. Procurámos usar o plasma citratado e êste deu ótimos resultados, principalmente quando diluído a 1 : 5 em solução fisiológica.

2 — *Fatores que influem na prova*: 1.º — *Germes*. Segundo alguns autores, os germes mortos têm ainda poder coagulante, embora fraco. Verificámos que os germes mortos, centrifugados e lavados não têm ação coagulante sobre o plasma, sendo a substância plasmocoagulante uma substância elaborada pelo estafi-

lococo e dependente de sua atividade biológica. Por outro lado, após cultivo do germe em meio adequado, a substância pode agir mesmo após aquecimento a 60° durante meia hora, com a morte do germe, portanto (prova de esterilidade); foi o que obtivemos principalmente com culturas de 5 a 10 dias em estufa a 37°.

Com relação à idade das culturas de estafilococo, sabe-se que o ótimo é a cultura em caldo comum, 24 horas, a 37°. As culturas conservadas no laboratório podem dar a prova positiva mesmo após anos. Kemkes encontrou uma raça com plasmocoagulação positiva, mesmo após 10 anos de seu isolamento de um furúnculo. Usamos também culturas conservadas há mais de 10 anos no laboratório e os resultados foram positivos. Em nossas provas usamos cultura em caldo comum durante 24 horas a 37°, mas obtivemos o mesmo resultado quando a cultura em caldo ficou vários dias à temperatura ambiente, sendo que uma das culturas deu reação positiva mesmo com a idade de 8 meses.

A quantidade de germes, dentro de certos limites, não influe na positividade maior ou menor da prova. Segundo Fisk deve-se usar V gotas (medidas com pipeta de Pasteur) de uma cultura em caldo de 24 hs. a 37°. Com esta técnica obtivemos bons resultados.

2.º — *Meio de cultura.* Como a maior parte dos autôres, empregamos o caldo comum para a prova, semeando o germe na véspera, deixando na estufa a 37° e fazendo a prova no dia seguinte. O uso de caldo glicosado impede o fenômeno de coagulação segundo a maioria dos autôres, o que foi também por nós verificado.

3.º — *Plasma, sangue e anticoagulantes.* Usamos o plasma com melhores resultados, por permitir leitura mais fácil, dando coagulação bem nítida. O sangue total também pode ser usado. Empregamos como anticoagulante o citrato de sódio a 3,8% na proporção de 1 :5. Fizemos prova com plasma de vários animais e obtivemos resultados com todos êles, menos com o plasma de cachorro. Achamos que o plasma de coelho se presta muito bem à prova, podendo ser conservado em geladeira, devendo ser diluído na ocasião de ser usado. Usamos plasma com mais de 1 mês de geladeira e obtivemos sempre os mesmos resultados. Com plasma conservado em geladeira por 6 meses, os resultados já se tornam incertos.

3 — *Condições de prova:* Usamos tubos de hemólise comum. Fizemos também provas em lâminas com círculo de parafina colocadas no interior de placa de Petri. Os tubos não devem ser muito estreitos, pois isto pode, com o crescimento do germe em superfície,

acarretar aprisionamento do plasma e dar lugar a erros de interpretação (falsas reações). A temperatura ótima de prova parece ser 37°, sendo que a 18-20° a prova se fez quase que com o mesmo resultado. Em geladeira também fizemos a prova e obtivemos resultado positivo após vários dias.

O tempo ótimo de leitura está entre 2 e 4 horas e nisto também concordamos com a maioria dos autores. Uma prova positiva somente depois de 24 horas, deve ser repetida para confirmação. Uma das amostras, em tôdas as provas, constantemente deu positiva, após 3 horas de estufa. O aspecto do coágulo é claro no dia da prova e opaco no dia seguinte, em vista do crescimento dos germes. Num corte de coágulo foi verificado pelo Dr. João Montenegro, a presença de rede de fibrina e de germes no seu interior, porém em maior número na periferia.

4 — *Técnica adotada*: Semear a amostra em caldo comum e deixar em estufa a 37° de um dia para o outro. Colocar em tubos de hemólise 0,5 cc. de plasma citratado e diluído a 1:5 em solução fisiológica, mais 5 gotas de cultura de 24 horas (com pipeta de Pasteur). Levar à estufa e fazer leitura cada hora até 4 horas. Ler também após 24 horas de estufa.

O resultado é expresso em +++++, quando a coagulação for total; ++++, o coágulo ocupa 2/3 do conteúdo do tubo; ++, o coágulo ocupa a metade; +, o coágulo ocupa 1/3 do conteúdo; —, não há formação de coágulo.

C. — RESULTADOS OBTIDOS:

Empregando a técnica acima descrita, fizemos a prova da plasmocoagulação com todas as culturas estudadas.

As 36 raças patogênicas determinaram, sem exceção, coagulação do plasma citratado.

Com as culturas n.ºs 3 e 37 repetimos a prova de plasmocoagulação, respectivamente, 49 e 45 vezes, em ocasiões diferentes e obtivemos sempre resultados idênticos.

IV — CONCLUSÕES

1 — Na identificação dos estafilococos patogênicos, os critérios de morfologia, liquefação da gelatina e prova de aglutinação, indubitavelmente, são falhos.

2 — As provas de coagulação do leite e de fermentação da lactose não apresentam especificidade, sendo positivas tanto para raças patogênicas como saprófitas.

3 — A prova da manita parece ter valor apenas quando negativa, porque os estafilococos não fermentadores dêste álcool são saprófitas.

4 — A pigmentação tem valor relativo na diferenciação dos estafilococos patogênicos e saprófitas; é um caráter inespecífico e variável.

5 — A prova de inoculação em animais só tem valor quando o animal for sensível e não apresentar imunidade específica; a cultura, por sua vez, deverá ter virulência exaltada. Tais condições tornam a prova de prática difícil no serviço rotineiro.

6 — A prova de hemólise com hemátias lavadas de coelho é de alta especificidade e sensibilidade, constituindo ótimo método auxiliar na identificação dos estafilococos patogênicos.

7 — A plasmocoagulação nos parece a prova ideal na identificação dos estafilococos, dada a sua especificidade, sensibilidade e simplicidade de execução. É da mesma opinião a maioria dos autôres que a têm estudado. Pretendemos experimentá-la em maior escala, até que possamos obter número tal de observações, que nos permita conclusão sob o ponto de vista estatístico.

SUMMARY

1 — Morphological appearance, gelatin liquefaction and agglutination tests are not satisfactory criteria for the identification of pathogenic staphylococci.

2 — The coagulation of milk and lactose fermentation are not specific, showing positive results both for pathogenic strains as well as for the saprophytic ones.

3 — The mannitol test seems to be of value only in the negative case, as the staphylococci, which do not ferment this alcohol, are saprophytic.

4 — Of little value is the pigment production as a means of differentiating pathogenic from saprophytic strains of staphylococci, this pigmentation being a non-specific and variable biological feature.

5 — Animal inoculation is valuable provided susceptible animals showing no specific immunity and strains of staphylococci of increased virulence are used. These conditions make the application of the test difficult in routine work.

6 — Hemolysis of washed rabbit red blood-cells is of a high specificity and sensibility, being an excellent auxiliary method in the identification of the pathogenic staphylococci.

7 — The coagulation of plasma seems to be an ideal test for the identification of the pathogenic staphylococci because of its specificity, sensibility and the simplicity of its performance. Most authors who have studied this subject are of the same opinion. We intend to try this test in a larger scale until such a number of observations are obtained that will lead us to conclusions of the statistical standpoint of this subject.

AGRADECIMENTOS

Ao terminar, agradecemos a todos os que nos auxiliaram neste trabalho, principalmente ao Sr. Cassiodoro W. Moreno, que conosco colaborou com muita dedicação.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BIER, O. — 1932 — *Rev. da Ass. Paul. de Med.*, 1: 413.
- 2 — CHAPMAN, G. H. e outros — 1934 — *Jour. Bact.*, 28: 343.
- 3 — CHAPMAN, G. H. e outros — 1935 — *Jour. Bact.*, 29: 437.
- 4 — CHAPMAN, G. H. e outros — 1941 — *Jour. Bact.*, 41: 431.
- 5 — CRUICKSHANK, R. — 1937 — *Jour. Path. & Bact.*, 45: 295.
- 6 — DARANYI, J. V. — 1926 — *Cent. f. Bakt. Paras. u. Inf. Krank.*, 99: 74.
- 7 — DIENST, R. B. e AUGUSTA, G. — 1942 — *Jour. Lab. & Clin. Med.*, 27: 663.
- 8 — FAIRBROTHER, R. W. — 1940 — *Jour. Path. & Bact.*, 50: 83.
- 9 — FISK, A. — 1940 — *Brit. Jour. Exp. Path.*, 29: 311.
- 10 — KEMKES, B. — 1928 — *Cent. f. Bakt. Paras. u. Inf. Krank.*, 1.^a parte, 109: 11.
- 11 — LOEB, L. — 1903 — *The Jour. Med. Res.*, 10: 407.
- 12 — MUCH, H. — 1908 — *Biochem. Z.*, 14: 143.
- 13 — NETER, E. — 1937 — *Jour. Bact.*, 34: 243.
- 14 — SLOCUM, G. G. e LINDEM, B. A. — 1939 — *Am. Jour. Publ. Health*, 29: 1326.
- 15 — TOPLEY, W. W. C. e WILSON, G. S. — 1937 — *The Principles of Bacteriology and Immunity*, 2.^a ed., Baltimore.
- 16 — VANBREUSEGHEN, R. — 1934 — *C. R. Soc. Biol.*, 116: 650, 344.
- 17 — WALLSTON, D. — 1935 — *Jour. Hyg.*, 35: 549.