

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

VOL. II • DEZEMBRO DE 1942 • NÚM. 2



AV. DR. ARNALDO, 3
SÃO PAULO - BRASIL

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é publicada sob a forma de fascículos, que serão reunidos em volume, e não tem data certa de aparecimento.

Será enviada, mediante solicitação, às instituições científicas interessadas, ou por permuta com publicações congêneres.

Toda a correspondência referente à Revista deve ser dirigida ao Diretor do Instituto Adolfo Lutz:

DR. J. P. DE CARVALHO LIMA

Avenida Dr. Arnaldo, 3

Caixa Postal, 27-A

São Paulo — Brasil

DEPARTAMENTO DE SAUDE DO ESTADO DE
SÃO PAULO

REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAUDE PÚBLICA

VOL. II

DEZEMBRO DE 1942

N.º 2



SÃO PAULO — BRASIL
AVENIDA DR. ARNALDO, 3

SUMÁRIO

	PÁGINA
CINQUENTENÁRIO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Laboratório Central de Saúde Pública	181
J. P. DE CARVALHO LIMA e LÚCIA DE QUEIROZ TELES — Demonstração de cápsulas bacterianas	191
LUÍS DE SALES GOMES e MANOEL DE BRITO E SILVA — Aglutininas heterófilas na linfogranulomatose de Nicolas-Favre	212
LUÍS DE SALES GOMES — Nota a propósito de <i>Salmonella pauloensis</i>	231
S. C. CALAZANS e MARIA ARANTES — Antígenos adicionados de lanolina e sua aplicação na produção de soros aglutinantes	236
AUGUSTO DE E. TAUNAY — Comparação entre a centrifugação de uma hora e o emprego de clorofórmio e alumen de potássio no diagnóstico das meningites tuberculosas	245
AUGUSTO DE E. TAUNAY e MARIA JOSÉ FARACO — Comportamento da " <i>Shigella alkalescens</i> "	248
ETTORE RUGAI — Meios de cultura econômicos preparados pela digestão triptica da carne, segundo Hottinger	253
BRUNO RANGEL PESTANA e MARIA JOSÉ FARACO — Exame bacteriológico de fezes	269
NICOLAU ROSSETTI — <i>Achorion gallinae</i> (Méglin-Sabrazès, 1890-93) — Caso de infestação humana espontânea	288
HASSIB ASHCAR — Contribuição ao estudo morfo-biológico do <i>Penicillium notatum</i>	309
FLORIANO DE ALMEIDA, CARLOS DA SILVA LACAZ e OLGA DE BARROS — Leveduras humanas (Visão geral do assunto) ..	326
JOÃO MONTENEGRO — Neuromas da mucosa do apêndice	362
A. FRANCIA MARTINS — Sobre o padrão bacteriológico do leite em São Paulo — Leite de Granjas	369
ANTONIO CARLOS SEIXAS — O leite, molhagem e seu padrão	390
RENATO F. RIBEIRO e C. FONSECA — Interferência da vitamina D na reação de Carr-Price	413
RUTH DE LIMA CORRÊA — Bebidas não alcoólicas ou refrigerantes	416
RENATO FONSECA RIBEIRO, LÚCIA ACHÉ e J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR — Em torno do teor de nicotina nas folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> e nos cigarros	423
R. FONSECA RIBEIRO, L. ACHÉ e J. B. FERRAZ DE MENEZES JR. — Da conveniência de uma legislação sobre fiscalização do tabaco e de sua inclusão no Código Sanitário	433

CINQUENTENÁRIO DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Laboratório Central de Saúde Pública

O dia 18 de julho de 1942, assinala a passagem do cinquentenário do Instituto Adolfo Lutz (Laboratório Central de Saúde Pública).

Criado pelo Decreto n.º 11.522, de 26 de outubro de 1940, o Instituto Adolfo Lutz representa a fusão do tradicional Instituto Bacteriológico de São Paulo e do antigo Laboratório de Análises.

Os dois estabelecimentos científicos, nascidos no mesmo dia, há cinquenta anos, exerceram com brilho, separadamente, as atribuições de laboratórios de Saúde Pública. Hoje, reunidos, completam-se e desempenham papel saliente na defesa da saúde pública de São Paulo e do Brasil.

Para comemorar essa data, realizou-se, no salão de conferências do Instituto, uma sessão solene à qual esteve presente todo o seu corpo técnico e administrativo. O Diretor, Dr. J. P. de Carvalho Lima, após breves palavras alusivas à data e à vida do estabelecimento, concedeu a palavra ao Dr. Bruno Rangel Pestana, ex-assistente do Instituto Bacteriológico e atualmente chefe da Sub-divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, que proferiu o seguinte discurso:

“Quis o Diretor que o mais antigo do Instituto Bacteriológico e chefe da Subdivisão de Bromatologia e Química, que é o Laboratório de Análises, vos dissesse hoje algumas palavras para comemorar o cinquentenário da fundação desses dois estabelecimentos científicos, agora reunidos neste majestoso Laboratório Central de Saúde Pública, que, em homenagem ao grande mestre, recebeu o nome de Instituto Adolfo Lutz.

Proclamada a República procuraram os dirigentes dos destinos de São Paulo, cumprindo o programa de seu partido, cuidar da

Instrução e da Saude Pública. Sabiam os estadistas da velha República que São Paulo, para ser São Paulo, precisava de povo sadio e culto.

Construíram escolas. Contrataram mestres para ensinar novos métodos de pedagogia. Reorganizaram os serviços de hygiene.

A lei n.º 43, de 18 de julho de 1892, criou o Instituto Bacteriológico e o Laboratório de Análises. Para esses estabelecimentos, Vicente de Carvalho, então Secretário dos Negócios do Interior do governo de Cerqueira Cesar, mandou contratar, na Europa, dois notáveis cientistas, indicados pelo grande Pasteur: Felix Le Dantec, biologista, para dirigir o Instituto Bacteriológico; o químico Marcel Lachaud, recomendado tambem por Schützemberger, para montar e dirigir o Laboratório de Análises. Nos dois estabelecimentos se assentaram, desde então, as bases da defesa da saude pública em nossa terra.

Escrevendo ao governo, assim dizia Le Dantec, sobre o Instituto que ia organizar:

“Eu fiz o cálculo das despesas de instalação, não de um laboratório no qual trabalharei, mas tambem de um laboratório onde farei alunos. Tenho a intenção de dar um curso de técnica microbiológica, análogo àquele que se faz no Instituto Pasteur de Paris, em 40 lições, e que torna o aluno capaz de trabalhar por si mesmo.

É preciso que se faça um outro curso: o de biologia geral (fermentação, doenças microbianas, resistência dos tecidos à invasão de micróbios, vacinação, imunidade, etc.), que o ponha ao corrente da parte da ciência moderna, util ao fim que eu vos proponho.”

Tinha o Mestre a preocupação da Escola, programa que Adolfo Lutz adotou e desenvolveu.

Instalados os Laboratórios do Instituto Bacteriológico, os seus valiosos serviços começaram a justificar sua criação.

Cesário Mota, o estadista ilustre que substituiu Vicente de Carvalho, ao tratar, em seu relatório, da cólera que apparecera em São Paulo, assim diz:

“Não obstante as medidas de pronto tomadas, que só a suspeita aconselha, a máxima energia e afincio nos meios de combate só a convicção os podia dar. Essa convicção a tivemos pelo exame bacteriológico das dejeções dos enfermos, o qual revelou a existencia do verdadeiro *bacilo vírgula*.

Desde então atacou-se o mal como a um inimigo terrivel e conhecido. Foi o Instituto quem nô-lo revelou; só este fato é bas-

tante para fazer o seu elogio e justificar a sua existência. Importantíssimo foi o serviço prestado este ano por esse Instituto”.

E da medida pronta e rápida tem dependido, em grande parte, o não haverem os surtos de moléstias infecciosas tomado vulto, como ainda recentemente aconteceu com a peste.

A peste, sempre que aparece, obriga o Instituto Bacteriológico a manter o seu pessoal atento, trabalhando a qualquer hora do dia ou da noite, para que se faça rápido diagnóstico e, conseqüentemente, breve seja o início do tratamento no Hospital de Isolamento e prontas as medidas de profilaxia.

Já vos contaram a história da “Primeira Escola de Medicina Experimental do Brasil” e os seus quinhentos trabalhos publicados sobre febre amarela, febre tifóide, disenteria, lepra, malária, Leishmânia, difteria, tifo exantemático e outras moléstias humanas e de animais, sobre zoologia e outros assuntos, que atestam o valor dos estudos e pesquisas realizadas por Lutz e seus discípulos.

Durante 50 anos de existência, em que passaram pelo Instituto Bacteriológico diversos cientistas, guardou sempre aquela casa a mesma orientação científica traçada pelos seus fundadores.

Foram seus diretores Felix Le Dantec, Adolfo Lutz, Carlos Meyer, Teodoro Baima, Antônio de Ulhoa Cintra, Alexandrino Pedroso e Carvalho Lima, que ainda hoje dirige esta casa.

Queremos aqui, prestar uma homenagem ao sábio mestre e seus discípulos que ajudaram a construir este patrimônio científico. No cumprimento do dever, eles nunca recuaram, mesmo quando vaiados ou quando lhes arremessaram pedras. A maledicência não os atingia, mesmo quando a classe médica, tendo por chefes o cirurgião mais ilustre e o clínico mais distinto, exigia a demissão do diretor do Instituto, a bem do serviço público, porque condenara, no interesse da saúde do povo de São Paulo, vacas leiteiras tuberculosas.

Não temiam a morte. Sempre prontos, a qualquer hora do dia ou da noite, não mediam sacrifícios, infectando-se às vezes, em serviço, como aconteceu a Vital Brasil, com a peste e a Carvalho Lima, com a febre tifóide.

Aos que pagaram com o sacrifício da vida o seu devotamento à ciência e ao cumprimento do dever — J. A. Roxo, vítima da febre tifóide; Bonilha de Toledo, da febre amarela; Alexandrino Pedroso, da meningite cérebro espinhal e Teodoro Baima, da gripe — o nosso comovido preto de admiração e saudade.

Não posso deixar de recordar também, os companheiros que ainda vivem, trabalhando noutro sector, e que contribuíram para o aumento do nosso patrimônio científico — Vital Brasil, Adolfo Lindenberg, Afonso Splendore, Pereira Barreto, Eduardo Rodrigues Alves, Ulhoa Cintra, Sebastião Calazans, José Bernardino Arantes e Simeão Bonfim.

Não esquecerei o nosso mestre e amigo, Prof. Ficker, que, com honestidade e notável capacidade científica, orientou a nova fase do Instituto Bacteriológico.

Aos técnicos que cooperaram com dedicação e trabalho, Savério, Pupo, Getulino e Faraco, e que hoje vivem no sossego de seus lares; aos desconhecidos, que, na sombra do anonimato, auxiliaram as pesquisas e a defesa da saúde pública no Instituto Bacteriológico e no Laboratório de Análises — as nossas homenagens.

Mas não era só o desprendimento da vida que engrandecia os que trabalhavam nos antigos Laboratórios. Era também o desprendimento material. Nunca tiveram, como não teem hoje, a preocupação do dinheiro. Mal pagos, jamais deixaram de cumprir o seu dever, abrindo mão, muitas vezes, de dinheiro para melhorar a biblioteca, como aconteceu com Baima, a quem o governo do Paraná quis premiar; com Batista de Andrade, que comprava aparelhos e reativos e com Henrique Schaumann, que desistiu dos ordenados a que tinha direito em favor do edificio que se destinava aos Laboratórios de Análises Químicas e Bromatológicas.

Os terrenos situados à rua Pires da Mota, onde foi construído o prédio, para o qual contribuiu Schaumann, foram desapropriados pelo decreto 337, de 17 de fevereiro de 1896, e destinados à construção do Instituto Pasteur e Roux, onde seriam instalados os Laboratórios de Análises Bromatológicas.

Somente no governo de Altino Arantes, sendo Secretário do Interior Oscar Rodrigues Alves e diretor do Serviço Sanitário Artur Neiva, é que se construiu o prédio onde funcionou o Laboratório de Análises.

O antigo Laboratório de Análises iniciou as suas atividades em 5 de julho de 1893, em prédio situado à rua General Osório, 127, sendo diretor Marcel Lachaud, que tinha como auxiliares Pinto de Moura e Caramurú Pais Leme.

Iniciou-se a campanha contra os fraudadores, repressiva e preservativa, conforme estabelecera Lachaud em seu programa de ação, pois ao Diretor do Laboratório cumpria também a polícia sanitária,

na classe dos ingestas, fazendo as competentes apreensões e respectivas análises.

Lachaud já pedia, em 1893, a assistência técnica tão reclamada hoje pelos industriais de gêneros alimentícios. Dizia em seu relatório: “um governo cioso dos seus deveres e das responsabilidades que sobre si pesam, precisa ser bastante prudente e escrupuloso afim de evitar que sejam feridas pelas medidas de repressão contra abusos cometidos por outros, as indústrias nascentes, que devem merecer todo o apôio, a bem de sua prosperidade e em benefício da riqueza pública, para a qual podem concorrer de modo eficaz como fruto de renda.

O comerciante poderá fazer as análises e estudo das mercadorias que recebe para fixar a identidade com as amostras, com o fim de verificar se a mercadoria foi fraudada. No caso de fraude, os falsificadores teriam que pagar o preço da análise, mais a multa.”

Estabeleceu-se, pela primeira vez, as características dos gêneros alimentícios mais comuns: água, leite, vinhos, aguardentes, licores, cerveja, conservas, banha, manteiga, doces e confeitos.

Tratando do leite, assim se referia o sábio francês: “A maioria dos leites vendidos nas ruas da Capital é adicionada de água, sendo aplicada a lei nos casos somente em que se encontra uma proporção de água em excesso.

É a primeira e a mais comum das fraudes que temos a verificar, consistindo ela em diminuir o valor intrínseco de um alimento bem conhecido e estimado de todos, pela adição de um outro de muito menos valor, conservando-se porem, o mesmo preço, com o que tira o vendedor um grande lucro.

Esta fraude é muito comum em São Paulo, como já provou este Laboratório, com as análises realizadas em diversos produtos entregues ao consumo desta cidade; em quase todos os casos, o leite, por exemplo, vendido frio e apresentado como puro, é adicionado de água na proporção de até mesmo duas partes desta para uma daquele.

Alem disso, nestes casos muito simples sob o ponto de vista higiênico, muito perde o país, porque o leite sendo o alimento por excelência, de certos doentes e de muitas crianças, poderá acarretar uma falta de nutrição, que se tornará prejudicial à saúde.

O que aconteceria se tolerássemos essa fraude?

Aquele que obtivesse, diariamente, maior resultado que os seus concorrentes pelo seu modo de proceder, poderia facilmente estender seu comércio, e a porção de leite misturado aumentar-se-ia por essa razão.

Naturalmente, mais cedo ou mais tarde, o imitariam os concorrentes sabedores de seus resultados.

E assim se iria aumentando a quantidade de água ajuntada, até que se tornasse impossível ir mais longe, sem que se despertasse a atenção dos clientes."

Cinquenta anos são passados e a situação é a mesma.

A lei só pode ser aplicada nos casos em que se encontra uma porção de água em excesso, porque, hoje, água em pouca quantidade é permitida pelo padrão estabelecido e assim se vai aumentando a sua quantidade até que se torne impossível avançar mais sem se despertar a atenção.

Schaumann, revendo as características dos gêneros alimentícios principais, continua a clamar contra a fraude, principalmente contra os xaropes de frutas (framboesa e groselha), que, na maioria, são preparados com éteres artificiais e coloridos com tinta de anilina.

Examinando as conservas, principalmente as de tomates, achou que todas as amostras eram coloridas artificialmente.

Em cinquenta anos de existência numerosas análises foram feitas, sendo inutilizadas toneladas de gêneros alimentícios condenados e milhares de litros de vinhos com matéria corante.

Contribuiu o laboratório para orientar a parte técnica no que diz respeito a gêneros alimentícios, quando foi feito o Regulamento da Alimentação Pública, aprovado pelo decreto 10.395, de 26 de julho de 1939, o que representa grande passo dado na fiscalização de tais gêneros.

Partindo para a Europa Lachaud, substituiu-o Henrique Schaumann na direção, o qual, seguindo também para a Europa, onde foi trabalhar no Instituto de Moléstias Tropicais de Hamburgo, foi substituído por Caramurú Pais Leme, até 1896, quando, então, foi nomeado para diretor, Antônio Carlos de Campos Sales.

Em virtude da reorganização do Serviço Sanitário com a Lei n.º 432, de 3 de agosto de 1896, passou o Laboratório de Análises a denominar-se Laboratório de Análises Químicas e Bromatológicas, exigindo-se que para o cargo de diretor somente pudesse ser nomeado profissional médico.

Substituiu-se um químico por um médico, erro esse que contribuiu, em grande parte, para a fossilização do estabelecimento por faltar a cabeça dirigente; o mal não foi maior, porque, criado o lugar de chefe-químico, foi nomeado Pedro Batista de Andrade, a cuja memória prestamos as nossas homenagens. “É aquele que, com amor e dedicação — como nos relata Cendí Guimarães — no laboratório do Estado foi logo elevado ao posto de auxiliar-técnico do diretor, cargo que ocupou até 1929. A aparelhagem era modesta, mas ele punha em prática o que sempre ensinou aos alunos, isto é, que o químico precisa ser ao mesmo tempo, eletricitista, vidreiro e mecânico; improvisava o que lhe faltava e, no velho Laboratório da rua dos Andradas, realizou uma soma enorme de trabalhos que, em meio de melhor ressonância, teria feito dele uma glória prezada e amparada. Horário de serviço era para ele o dia todo; inúmeras vezes foi a esposa arrancá-lo de lá noite fechada, porque, trabalhando, esquecia as horas das refeições e de sono.”

Aos que trabalharam sob a chefia do mestre, e já falecidos, o nosso preito de saudades; aos que ainda vivem: Araujo Lima, Rocha e Borba, como os mais velhos da casa, e que tantos serviços prestaram à Saúde Pública, as nossas homenagens.

Recordarei também Adelino Leal, que, como auxiliar-técnico e, depois, como chefe de laboratório prestou valiosos serviços de abril de 1923 a 9 de julho de 1936, quando foi aposentado. Moço, quando assumiu a chefia do Laboratório, deu-lhe nova organização, melhorando a sua técnica e aperfeiçoando os métodos de exame; dele, quase todos os químicos que aqui trabalham foram discípulos.

Reorganizado, novamente, o Serviço Sanitário pelo Decreto n.º 3.876, de 11 de julho de 1925, aprovado pela lei n.º 2.121, de 30 de dezembro do mesmo ano, novo erro se cometeu, estabelecendo-se como dependência da Inspeção do Policiamento da Alimentação Pública o Laboratório de Análises, sendo, então, suprimido o cargo de Diretor do Laboratório, que passou a ser exercido pelo Dr. Nicolino Morena, diretor da Inspeção do Policiamento da Alimentação Pública, até 27 de outubro de 1940. Então, pelo decreto 11.522, veio a fazer parte do Laboratório Central de Saúde Pública, o Instituto Adolfo Lutz.

Hoje, que comemoramos o cinquentenário da fundação do Instituto Bacteriológico e do Laboratório de Análises, ora fundidos no Instituto Adolfo Lutz, temos uma casa majestosa dada por Cardoso de Melo Neto, então Interventor Federal, Cantídio de Moura Campos, Secretário da Educação e Saúde e Sebastião

Calazans, Diretor do Departamento de Saude do Estado, e que nos foi entregue, instalada e aparelhada, por Ademar de Barros, interventor federal, tendo como Secretário da Educação Mário Lins, e como Diretor do Departamento de Saude, Humberto Pascale.

Tinha eu receio que, no novo edifício, o mal das casas novas, que tanto tem prejudicado nossos Institutos, também nos invadissem.

Apesar da grandiosidade desta casa, o ambiente é o mesmo de cordialidade e simplicidade dos antigos laboratórios, conforme salientou Sales Gomes em a nossa primeira reunião. É que aqui se trabalha e se estuda e o exemplo dos nossos antepassados é seguido. Não se contam horas e nem se medem sacrifícios para proceder a uma análise, efetuar um exame, fazer uma autópsia, preparar um meio de cultura ou lavar um frasco e copiar um exame. Realiza-se um exame por minuto.

A nossa revista, com três números publicados em menos de dois anos, conta 32 trabalhos documentando a produção científica desta casa.

As reuniões quinzenais mostram o interesse que desperta a ciência e a pesquisa.

Aumenta-se a biblioteca e o aparelhamento necessário é fornecido para que os trabalhos sejam efetuados.

Tudo isso, senhor diretor, devemos em grande parte à vossa ação; não medindo sacrifícios, fazeis o possível para nada faltar aos nossos trabalhos e para que esta instituição possa brilhar.

Mas não é só o conforto e o aparelhamento; em um Instituto científico, para progredir é necessário que os que nele trabalham tenham entusiasmo e amor à ciência. É preciso que lhe votem toda sua fé. Eu bem sei o que isso custa de fadigas e contrariedades, dores morais e abnegação, mas quando o resultado é alcançado, que importa a paga da moeda indiferente, a ingratidão e a calúnia? A beleza da vida está na ação.

Continuemos, pois, a trabalhar, mas não nos esqueçamos que um erro ou engano poderá acarretar a morte de um ente querido ou levar miséria à família de um negociante ou industrial.

Lembra-vos sempre que não é só o nosso nome que entra em jogo. Esse só a nós interessa. Mas o nome do Instituto, esse interessa à coletividade.

Não esqueçamos o conselho do mestre quando dizia que "o bacteriologista precisa de muito critério e prudência afim de não

desacreditar a ciência por asserções precipitadas, como aconteceu entre nós”.

O sentido da responsabilidade e a sua compreensão, são qualidades essenciais ao biologista e ao químico. Sem dúvida, em um estabelecimento científico bem organizado, cada um responderá pelo seu serviço, por mínimo que seja. Essa responsabilidade particular, em nada diminui a dos chefes. Todo o funcionário é obrigado a dar conta dos seus atos aos superiores, ao público e, sobretudo, à sua consciência.

Professando este apostolado, continuemos a trabalhar, unidos e disciplinados sob as ordens do nosso Diretor, para não desmerecer a confiança daqueles cuja saúde somos obrigados a defender e para o renome do Instituto, no qual o nome de Adolfo Lutz representa um exemplo de amor à ciência, de trabalho e de abnegação.

DEMONSTRAÇÃO DE CÁPSULAS BACTERIANAS

J. P. DE CARVALHO LIMA

Diretor do Instituto Adolfo Lutz

LÚCIA DE QUEIROZ TELES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Relativamente à estrutura da cápsula bacteriana, em 1897 Zettnow¹ introduziu na bacteriologia os termos “endoplasma” e “ectoplasma” para significarem, respectivamente, a área interna das bactérias tomando facilmente os corantes comuns e a zona periférica só tomando os flagelares, isto é, corando-se com dificuldade e à custa de mordentes. Pelo referido sobre a resistência do ectoplasma aos corantes ordinários, muitos o tem correspondente ao que hoje se descreve como cápsula.

São frequentes, entre os que tem estudado a citologia das bactérias, discordâncias não só quanto à terminologia, mas quanto a certos detalhes estruturais. Contudo, de modo geral, concorda-se em se admitirem zonas endoplásmica e ectoplásmica; há mais discussão no que toca à existência de membrana limitando o ectoplasma externamente. Embora negada por muitos, provas de que existe tem sido registadas, baseadas largamente na descrição de células alteradas por fenômenos osmóticos. Demonstraram Fischer² e outros que bactérias imersas em solução hipertônica sofrem plasmólise, isto é, retração do protoplasma, pondo, então, em evidência a membrana celular. Fora desta condição as limitações óticas tem dificultado observar-se a membrana. Mesmo assim, Wámoscher³, em 1930, estudou por dissecação com micro-manipulador, a estrutura de várias bactérias, entre as quais membros do grupo coli-tífico-dissentérico, concluindo terem membrana ou camada externa de grande elasticidade que lhes possibilita resistirem à pressão e à tensão. Este resultado satisfaz opiniões anteriormente emitidas como a seguinte, de Henrici⁴: “o protoplasma livre teoricamente apresentaria forma esférica; portanto, a forma rígida bacilar de muitas

bactérias provavelmente indica ser ele limitado por alguma membrana”.

Tem-se, geralmente, a membrana como o próprio ectoplasma que sofreu condensação superficial. Macé⁵ diferencia nesta membrana uma camada periférica, gelatinosa, que, quando exageradamente desenvolvida constituiria a cápsula.

De maneira geral é a cápsula considerada espessamento da camada externa da célula bacteriana. Tida, por muitos, como parte integrante da célula, parece datar dos trabalhos de Meyer⁶, em 1912, outro significado que se lhe tem atribuído: ser produto de secreção. Também assim a considerou Zettnow⁷, em 1918.

Toenniessen⁸, relatando seus estudos sobre o bacilo de Friedländer, hoje *Klebsiella pneumoniae*, adotou, em 1912, a expressão “ectoplasma” significando cápsula. Porém, 1 ano depois, descreveu zona larga às vezes vista ao redor desse germe e considerou-a como cápsula ou parte dela. Denominou-a “Schleimhülle”. No ano seguinte, em 1914, definiu-se mais descrevendo na *Klebsiella pneumoniae*: endoplasma, ectoplasma circundando-o e cápsula, camada externa a que chamou “Schleimhülle” ou “Gallert-hülle” e que seria não parte vital da célula bacteriana, mas produto de secreção. Finalmente, em 4.^a publicação, 7 anos depois, substituiu o termo “Schleimhülle” por “Aussenhülle”, acrescentando ser desprovida de membrana periférica. Condenou chamar-se cápsula ao que se vê, por processos especiais de coloração, circundando o endoplasma fortemente corado, pois consiste, diz ele, de ectoplasma e “Aussenhülle”. Acentuou que apenas “Aussenhülle” é cápsula.

Muito se tem discutido a opinião de Toenniessen.

Churchman e Emelianoff⁹ criticaram-na, em 1933, objetando que, se se tomar “Aussenhülle” como cápsula não se pode considerar capsulados o *Bacillus anthracis* e o *Clostridium welchii*, pois não possuem, necessariamente, “Aussenhülle”, nem a maioria das amostras de *Diplococcus pneumoniae* III S, que, muitas vezes, apesar de apresentarem estruturas consideradas por todos os bacteriologistas como cápsulas típicas, não revelam “Aussenhülle”. Comprovam, com ilustrações muito nítidas, a ocorrência de “Aussenhülle” em suas preparações de *Klebsiella pneumoniae* e *Diplococcus pneumoniae* III S, definindo-a como zona secundária não constante,

de forma irregular, sem periferia definida. Não a consideram com aparência de estrutura organizada, mas de camada de material amorfo aderente à superfície da cápsula.

Thompson¹⁰, em 1935, diz que, pelas ilustrações, em os trabalhos de Toenniessen, vê-se, claramente, ser a cápsula o que ele designou como "ectoplasma".

Parece, assim, estabelecer-se, aos poucos, não significar a "Aussenhülle" cápsula.

No que diz respeito à função da cápsula, já em 1895 Babes¹¹ considerava-a meio de defesa do germe. Preisz¹², em 1904 e 1911, e Eisenberg¹³, em 1912, mostraram, no *Bacillus anthracis*, correlação entre formação de cápsula e virulência; Bordet¹⁴, em 1910, verificou resistência dos germes capsulados à fagocitose e Bail¹⁵, em 1915, registou serem menos suscetíveis a soros bactericidas do que os não capsulados.

Muita importância se tem dado à cápsula, nos últimos tempos, principalmente após os resultados colhidos do estudo de sua composição química. Depois de haver Kramár¹⁶, em 1922, dividido as cápsulas, conforme sua composição, em dois grupos: um, contendo só polissacarídeos; outro, polisacarídeos e proteína, e ter sugerido ser a cápsula do *Bacillus anthracis* constituída de proteína, multiplicaram-se os trabalhos. Como conclusão admitem-se, atualmente, nesse germe: na cápsula, proteína de grande valor antigênico; na porção somática, polissacarídeo incapaz de estimular a produção de anticorpos. Ao contrário, nos pneumococos importantes trabalhos de Avery¹⁷ e colaboradores, a partir de 1923, mostraram, nas formas lisas normais, serem polissacarídeos os componentes capsulares, aceitando-se, hoje, existir em cada tipo de pneumococo um polissacarídeo capsular específico responsável pela especificidade-tipo. É bastante conhecida a reação de Neufeld para a tipagem do pneumococo diretamente do escarro, baseada na precipitação do carboidrato intracapsular por antissoro específico e que se manifesta por característico entumescimento. Verificou-se, ainda, coincidir no pneumococo a variação da forma lisa à rugosa com a perda de cápsula (consequentemente do polissacarídeo específico) e perda parcial ou total de virulência. Daí considerar-se virulência e comportamento antigênico dos pneumococos como determina-

dos pelos constituintes antigênicos capsulares. Igualmente, na *Klebsiella pneumoniae* alguns desses autores e também Julianelle¹⁸ mostraram existirem tipos sorológicos bem distintos, sendo a especificidade-tipo determinada por polissacarídeo presente na cápsula, ao passo que a proteína da porção somática caracterisaria esse germe como espécie. Nele, entretanto, Toenniessen considera ser a formação de cápsula não necessariamente associada com virulência por ter isolado variante não capsulada e altamente virulenta. Também na *Pasteurella pestis*, Sokhey¹⁹, em 1940, concluiu existirem cápsulas tanto em germes virulentos como em avirulentos.

Quanto à prioridade em observação de cápsula, segundo Thompson, já em 1881 Loewenberg notara zonas claras circundando a *Klebsiella ozaenae*. Churchman e Emelianoff atribuem, entretanto, a Friedländer a primeira demonstração de cápsula em germes patogênicos. Há mais razão para esta afirmativa pelo seguinte. Em 1881 ainda não havia sido descrito germe do grupo de bacilos capsulados. O primeiro o foi em 1882, por von Frisch²⁰, e isolado de casos de rinoscleroma. No ano seguinte, Friedländer²¹ cultivou dos pulmões de indivíduos que tinham morrido de pneumonia o germe que hoje traz seu nome. Só passados dez anos foi registada por Loewenberg²² e Abel²³, independentemente, a cultura de microorganismo isolado de secreção nasal de indivíduos portadores de ozena. Entretanto, diz White²⁴ ter a cápsula sido descrita primeiro por Pasteur, em 1881, como "auréola".

Surgiram, aos poucos, publicações sobre a existência de cápsula em certos germes e ausência em outros, admitindo-se, então, um grupo "capsulado" e um "não capsulado".

Há, entretanto, forte corrente considerando todas as bactérias capsuladas mas diferindo quanto ao tamanho da cápsula, que só em algumas seria suficientemente desenvolvida e estável para ser de fácil demonstração e de valor diferencial. Cabe a Migula²⁵, em 1896, a primazia da admissão de cápsula em todas as bactérias. Entre seus partidários, Boni²⁶, em 1900, afirmou ter demonstrado cápsula em todos os germes e em qualquer meio, tendo, aliás, sido seu processo criticado como contendo causas possíveis de erro. Carpano²⁷ atribue à falta de técnicas perfeitas a impossibilidade de se por em evidência a cápsula, estrutura constante.

Cresce na literatura, dia a dia, o registo de cápsula em germes considerados não capsulados. Foram já citadas espécies dos

gêneros: *Bacillus*, *Diplococcus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Eberthella*, *Proteus*, etc.. Convem, entretanto, lembrar as palavras prudentes de St. John-Brooks²⁸: há processos que podem levar à demonstração de falsas cápsulas.

A cápsula é definida como invólucro que, pela sua resistência aos corantes básicos da anilina, que são os corantes por excelência das bactérias, aparecem em preparações coradas por processos comuns geralmente como zona clara circundando a célula bacteriana; por métodos especiais incluindo o emprego de mordentes apresenta-se corada. Sabe-se ser de tamanho variável, vendo-se na mesma preparação cápsulas grandes e pequenas, e influir decididamente o meio sobre o grau de seu desenvolvimento. Babes²⁹, Gruber e Futaki³⁰, Preisz³¹, Bail³², Sauerbeck³³, Eisenberg³⁴ mostraram sua formação máxima em tecidos animais. Em culturas, quanto maior o conteúdo do meio em proteína inalterada ou levemente alterada, maior desenvolvimento da cápsula. Churchman e Emelianoff consideram-na estrutura bacteriana frequente, talvez constante, capaz de se avolumar ou encolher e provida de membrana periférica.

Diversos tem sido os termos empregados para significarem a cápsula: ectoplasma, membrana bacteriana entumescida, auréola, halo, zona de retração, zona clara, zona capsular, etc..

Para a demonstração de cápsulas recorre-se a métodos de coloração negativa, isto é, apresentando a cápsula como zona incolor entre a porção somática do germe fortemente corada e o fundo da preparação também corado, ou a métodos de coloração positiva, nos quais a cápsula se cora, mas em tonalidade mais fraca ou em cor diversa da que toma a porção somática.

São inúmeros esses processos e neles tem predominado o emprego do corante violeta de genciana, como se vê nos de Guarnieri³⁵, Welch³⁶, Nicolle³⁷, Buerger³⁸, Rübiger³⁹. Johnne⁴⁰ preferiu violeta de metila; Ribbert⁴¹, violeta dália; Mac Conkey⁴², mistura de fucsina, verde metila e violeta dália; Cooper⁴³, azul de metileno; Huntoon⁴⁴, fucsina; Anthony⁴⁵, cristal violeta. Friedländer⁴⁶ recomendava cristal violeta ou violeta de genciana, indiferentemente; Hiss⁴⁷, violeta de genciana ou fucsina.

Parecem datar de 1910 os métodos de coloração negativa de cápsula, com a introdução de tinta Nanquim, por Rulison⁴⁸; seguiram-no, apresentando técnicas um tanto modificadas, Gins⁴⁹, Gózon⁵⁰, Baker⁵¹, Butt, Bonyng e Joyce⁵².

Entre os processos de coloração diferencial destacam-se os de Rosenow⁵³ e de Muir⁵⁴, empregando violeta de genciana e eosina; Smith⁵⁵, esses corantes seguidos de azul de metileno; Wherry⁵⁶, Churchman e Emelianoff, Sokhey, os corantes Romanowsky, segundo Wright.

Muitos desses processos são, entretanto, complicados e morosos. Certamente atendeu a razões de eficiência e de ordem prática a Comissão de Técnica Bacteriológica da Sociedade de Bacteriologistas Americanos⁵⁷ salientando os de Hiss e de Anthony.

Hiss descreveu dois processos para coloração de cápsula. O primeiro consiste em se fixar a preparação pelo calor e corar durante alguns segundos com solução aquosa, saturada, de violeta de genciana diluída ao dobro de seu volume com água destilada. Em seguida, lavar com solução aquosa a 0,25% de carbonato de potássio. O segundo manda corar a quente com solução aquosa de violeta de genciana ou fucsina (5 cc. de solução alcoólica saturada para 95 cc. de água destilada) e lavar com solução aquosa a 20% de sulfato de cobre.

Anthony dispensa fixação, aplicando a frio, durante 2 minutos, solução aquosa a 1% de cristal violeta como corante e, como decolorante solução de sulfato de cobre idêntica à do segundo processo de Hiss.

Interessava-nos processo rápido para a demonstração de cápsulas bacterianas em culturas, o que é reconhecidamente mais difícil que em exames diretos. Estudando, com amostra de *Klebsiella pneumoniae*, as vantagens e desvantagens dos três acima, entre os dois de Hiss obtivemos melhores resultados com o primeiro, o do carbonato de potássio: lindas cápsulas grandes, levemente coradas, bem distintas (Fig. 1). Aliás, no segundo processo (Fig. 2) a superioridade apontada pelo autor refere-se a preparações montadas em bálsamo. Também o de Anthony muito nos satisfaz (Fig. 3). As cápsulas, ora incolores, ora coradas com maior ou menor intensidade, são perfeitamente distintas; bem menores que no processo de Hiss.

A matéria corante empregada por Anthony é, incontestavelmente, superior à de Hiss. É sabido serem, entre os corantes básicos da anilina, mais intensos em ação os violetas e os vermelhos, principalmente os primeiros; destes, o cristal violeta, por ser produto bem definido, oferece vantagem sobre violeta de genciana, de composição variável.

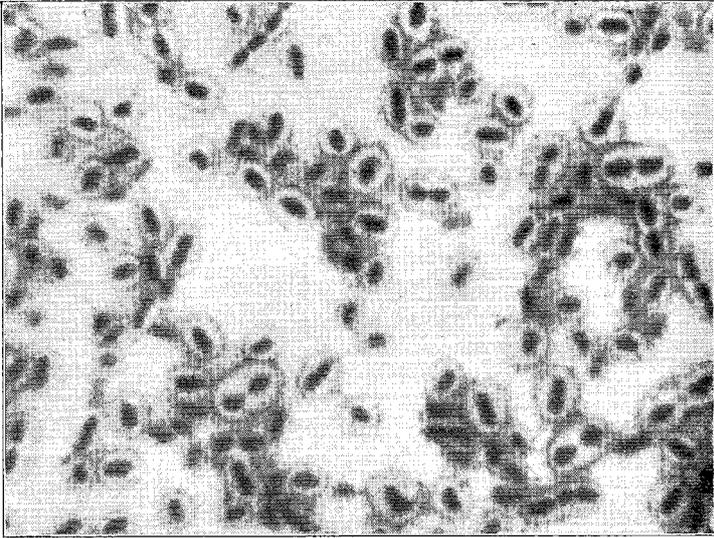


FIG. 1 — 1.º processo de Hiss (x 2600)

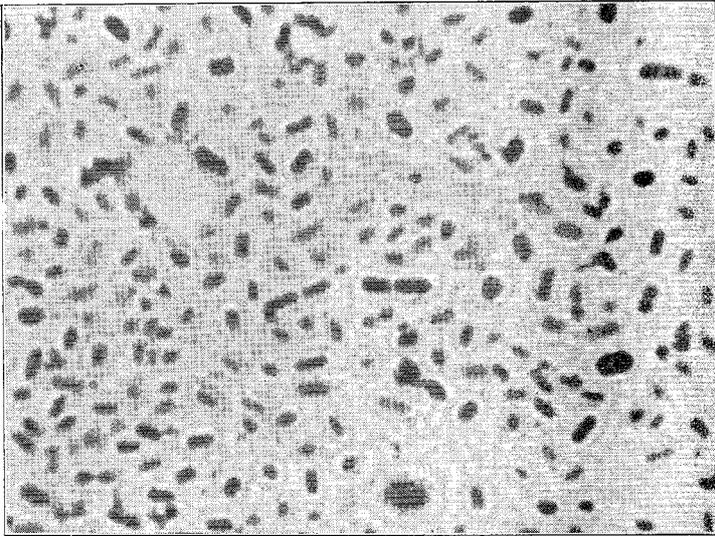


FIG. 2 — 2.º processo de Hiss (x 2600)



Em ambos os processos o veículo empregado em a solução corante poderia ser melhor. As soluções aquosas conservam-se mal, não se opondo suficientemente ao desenvolvimento de bactérias em seu interior e, também, facilitando ao corante depositar-se; por serem necessariamente usadas em a maioria das colorações, previnem-se tais inconvenientes empregando-se soluções aquosas recentemente preparadas, geralmente partindo-se de soluções alcoólicas em estoque.

Ora, a demonstração de cápsula não se faz com tanta frequência; portanto, a solução aquosa para tal finalidade raramente pode ser recente.

Ocorreu-nos tentar processo mais prático: empregar solução alcoólica de cristal violeta que, vantajosa quanto ao veículo e quanto à composição não variável do corante, ofereceria a vantagem adicional de dispensar prévia fixação, por ser o álcool fixador. Teem as soluções alcoólicas reduzida aceitação por serem pouco eletivas em razão da intensidade e, sobretudo, uniformidade de colorações que fornecem. Para o nosso objetivo seriam, ao contrário, muito eficazes dada a resistência da cápsula aos corantes; diferenciar-se-ia, perfeitamente, da porção somática fortemente corada.

Experimentamos, então, solução alcoólica de cristal violeta em diversas porcentagens e uma série de descorantes em diluições também variadas: carbonato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de amônio, sulfato de cobre, ácido acético, ácido clorídrico, ácido nítrico. Melhores resultados obtivemos com a solução corante a 5% e, como descorante, solução aquosa de carbonato de potássio a 0,5%. Empregamos cristal violeta de Grübler e carbonato de potássio, para análise, de Merck. Culturas em gelose-sangue, incubação 24 hs. a 37°C..

Do seguinte modo podemos fixar a técnica do processo:

1. Fazer esfregaço fino; como diluente, a água de condensação do meio de cultura.
2. Corar, 1-2 minutos, por solução a 5% de cristal violeta em álcool absoluto.
3. Esgotar; descorar com solução aquosa a 0,5% de carbonato de potássio.
4. Secar com papel de filtro.

As cápsulas, ora incolores, ora coradas, são perfeitamente nítidas e muitas bem maiores que as do método de Anthony (Fig. 4). Como já registaram muitos autores, em algumas a periferia é incolor como o resto da cápsula; em outras é bem corada e o restante da cápsula incolor. Para alguns, como Churchman e Emelianoff, a periferia corada representa a membrana capsular; para outros, entre os quais Hiss, depende, em parte, de precipitação do corante no exterior das cápsulas. Rulison procura explicar o fenômeno dizendo que as bactérias repousam um tanto acima do nível geral da preparação, facilitando, assim, reunir-se o corante ao redor delas.

Melhores aspectos são obtidos onde há escassez de material, principalmente nas bordas da preparação, o que já foi, também, observado por Wherry, Huntoon e outros.

Quanto à "Aussenhülle", é perfeitamente evidenciada pelo nosso método. Não a obtivemos pelos de Hiss e de Anthony. Confirmamos os dizeres de Churchman e Emelianof quanto a ser zona não constante, de forma irregular e sem periferia definida, que circunda a cápsula e parece material amorfo (Fig. 5). Notamos, ainda, quando presente a "Aussenhülle", esparso pelo campo, irregularmente, material idêntico ao que a constitue. A "Aussenhülle" não toma o corante, a não ser em concentrações muito elevadas. Pudemos apurar isso empregando quantidades fixas de decorante e variáveis de corante, como se vê abaixo:

Solução corante a 0,5%	Germes mal corados; cápsulas levemente perceptíveis em alguns; "Aussenhülle" ausente (Fig. 6).
Solução corante a 3%	Germes bem corados; cápsulas incolores, sem periferia corada; "Aussenhülle" ausente (Fig. 7).
Solução corante a 5% (Concentração ótima)	Germes bem corados; cápsulas distintas, ora incolores, ora coradas, periferia corada em muitas (Fig. 4); "Aussenhülle", quando há, incolor (Fig. 5).
Solução corante a 10%	Germes fortemente corados; cápsulas coradas (Fig. 8); "Aussenhülle", quando há, corada.

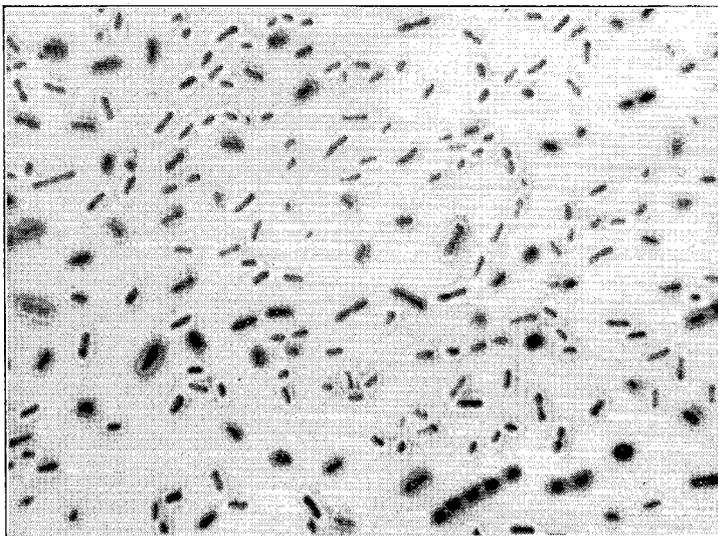


FIG. 3 — Processo de Anthony (x 2600)

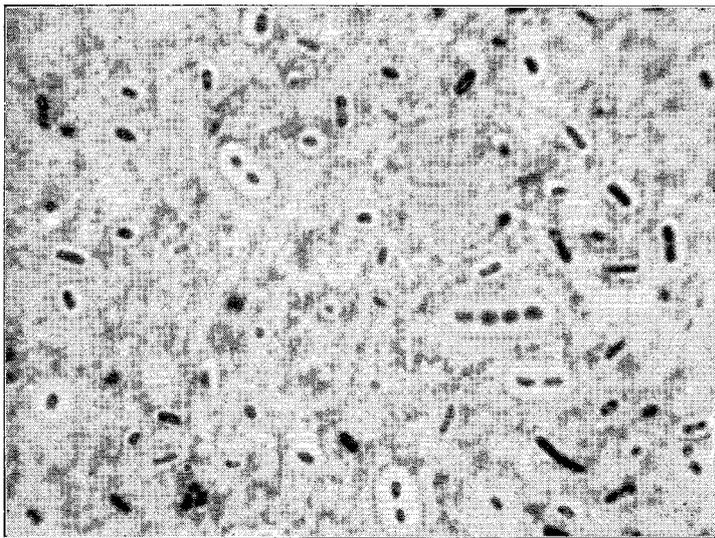


FIG. 4 — Processo dos Autores. Solução corante a 5%, concentração ótima. (x 2600)



Quando a "Aussenhülle" se cora pode passar despercebida porque a tonalidade vai se esmaecendo na periferia, simulando difusão do corante.

Tivemos confirmação destes resultados empregando, inversamente, quantidade fixa de corante e quantidades variáveis de descorante. Idem com quantidades fixas de corante e descorante, mas tempo variável de coloração.

Para fins de controle experimentamos nosso processo com *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, pela maioria dos autores tidos como não capsulados. Não revelaram cápsula; apenas, em alguns elementos, reduzidíssima orla clara, que se costuma observar até pelo método de Gram. Talvez pelo fato de ser a luz mais facilmente transmitida na zona periférica das bactérias.

Confessamos não haver, ainda, apurado as razões da falha já por muitos registrada: às vezes não se consegue boa preparação; outras vezes, entre preparações feitas na mesma ocasião e partindo-se da mesma cultura, algumas são plenamente satisfatórias enquanto outras apresentam raras e pequenas cápsulas. Tal diversidade se observa, também, em campos diversos da mesma lâmina. Hiss notou que o processo de Welch falha, às vezes; Anthony cita falhas no de Hiss e, referindo-se ao seu próprio processo, diz que praticamente não falha; Wadsworth⁵⁸ aponta os resultados irregulares dos métodos de Friedländer, Ribbert, Roux, Muir, Mac Conkey. Agasse-Lafont⁵⁹ lembra a necessidade de se prepararem diversas lâminas para se ter uma satisfatória.

Entre os fatores já lembrados como responsáveis pela irregularidade de resultados, Sokhey diz ter notado influência da temperatura ambiente; acha que a umidade do ar condensando-se sobre a lâmina pode interferir com a ação do corante e afirma serem resultados uniformes só obtidos em quarto de ar condicionado. É interessante terem diversos de nossos menos satisfatórios resultados coincidido com os dias de mais baixa temperatura.

No decorrer de nossas investigações notamos influência dos ácidos: acético, fênico, nítrico e clorídrico sobre o entumescimento capsular. Certamente essa a razão do emprego dos ácidos: acético e fênico em a maioria dos processos de demonstração de cápsula. Também o cloreto de sódio influencia favoravel-

mente. Considerando estes fatores, atribuímos as lindas cápsulas obtidas em o processo de Hiss ao fato de ser o corante violeta de genciana mistura de cloridratos de violeta de metila. Com tais observações pretendemos melhorar o processo que hoje apresentamos para demonstração de cápsulas bacterianas em cultura.

RESUMO

Interessados os A.A. em processo rápido para a demonstração de cápsulas bacterianas em culturas e considerando:

- 1.º — serem as soluções corantes aquosas satisfatórias só quando recentemente preparadas;
- 2.º — não ser a demonstração de cápsulas tão frequente em laboratório, de modo que a solução corante raramente pode ser recente;
- 3.º — oferecer vantagem o emprego de corante de composição não variável;

fizeram investigações, e, após uma série de experiências, propõem novo processo para demonstração de cápsulas em culturas, rápido e tendo como corante solução alcoólica de cristal violeta.

Registam a ocorrência, não constante, de "Aussenhülle" em suas preparações de *Klebsiella pneumoniae*.

Tendo notado, no decorrer de seus trabalhos, a influência de certos agentes químicos sobre o entumescimento da cápsula, o que, sem dúvida, contribue para ser melhor observada, pretendem aperfeiçoar o método que no momento apresentam.

SUMMARY

Being the AA. interested in a rapid method for the demonstration of bacterial capsules in cultures and considering that:

- 1 — the aqueous staining solutions are not satisfactory unless recently prepared;

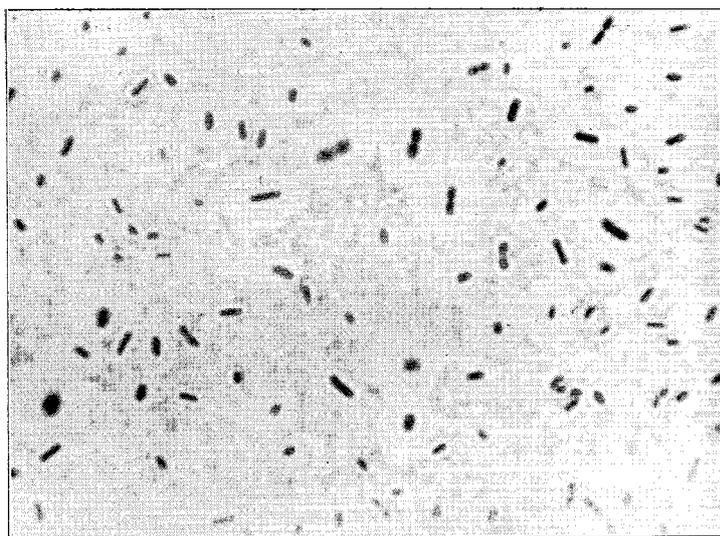


FIG. 5 — "Aussenhülle", processo dos Autores (x 2600)

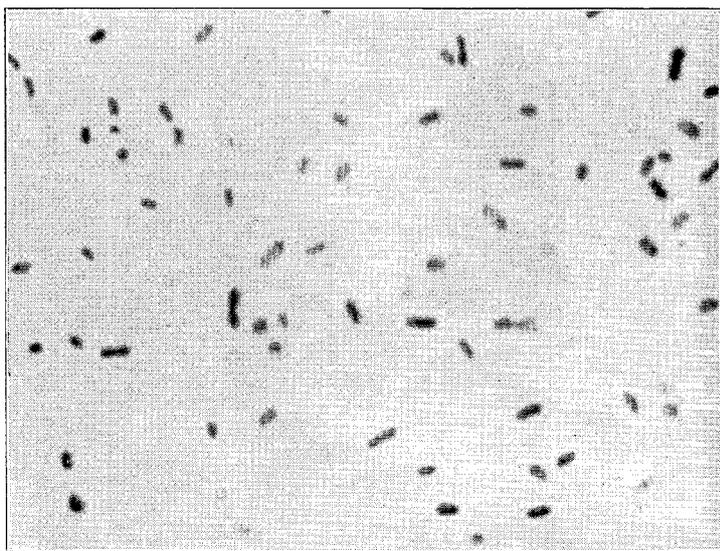


FIG. 6 — Processo dos Autores. Solução corante a 0,5%, concentração insuficiente. (x 2600)



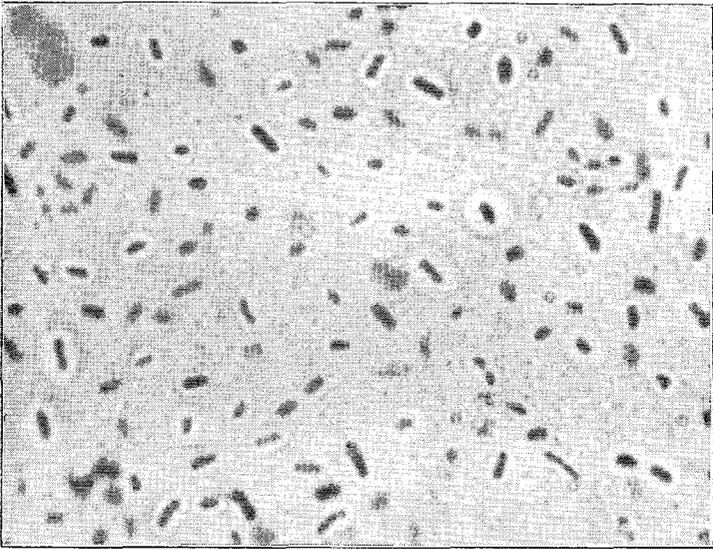


FIG. 7 — Processo dos Autores. Solução corante a 3%, concentração insuficiente. (x 2600)

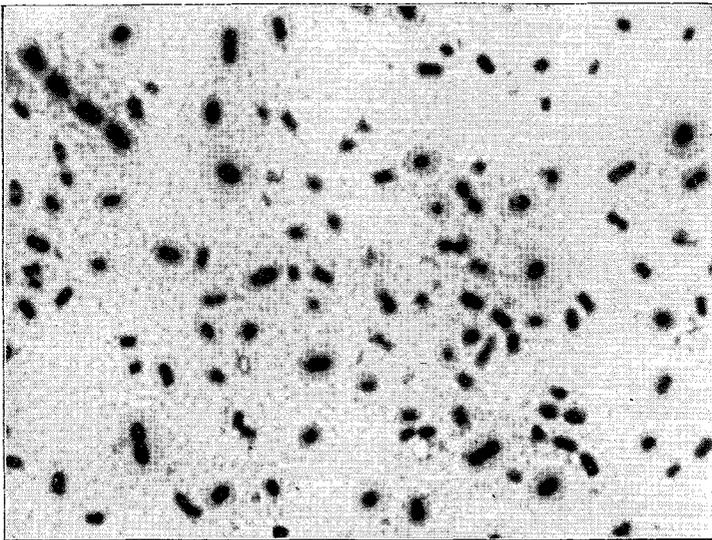


FIG. 8 — Processo dos Autores. Solução corante a 10%, concentração excessiva. (x 2600)



- 2 — the demonstration of capsules is not a frequent laboratory work, so that the aqueous staining solutions only at times may be recent;
- 3 — the most reliable stains are those of invariable composition;

an attempt was made in such a way and, after a series of tests, a new staining technic for the demonstration of capsules in cultures is proposed. It is simple and use is made of an alcoholic solution of crystal violet.

As far as the "Aussenhülle" is concerned, it was found to occur, not constantly, in the preparations of *Klebsiella pneumoniae* under observation.

In the course of experiments the A.A. have noted a marked action of certain chemicals on the capsular swelling; then, they intend to improve the method described in this paper.

REFERÊNCIAS

- 1 — ZETTNOW, 1897, *Zeit. f. Hyg.*, 24, 72-92.
- 2 — FISCHER, 1894, "Untersuchungen über Bakterien" (Berlin).
- 3 — WAMOSCHER, L., 1930, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 111, 422.
- 4 — HENRICI, A. T., 1923, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 20, 293.
- 5 — MACÉ, E., 1912, "Traité Pratique de Bactériologie", 6.^a ed., 1, 11-42.
- 6 — MEYER, A., 1912, "Die Zelle der Bacterien" (Jena).
- 7 — ZETTNOW, 1918, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 85, 17.
- 8 — TOENNIESSEN, E., 1912, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 65, 23-25; 1913, 69, 391-412; 1914, 73, 241-277; 1921, 85, 225.
- 9 — CHURCHMAN, J. W. e EMELIANOFF, N. V., 1933, *Journ. Exp. Med.*, 57, 485-510.
- 10 — THOMPSON, R., 1935, "Agents of Disease and Host Resistance", F. P. Gay, 148-170.
- 11 — BABES, V., 1895, *Zeit. f. Hyg.*, 20, 412-437.
- 12 — PREISZ, H., 1904, *Zbl. Bakt.*, 35, 280-293, 416, 537-545, 657-665; 1911, 58, 510-565.
- 13 — EISENBERG, P., 1912, *Zbl. Bakt.*, 63, 305-321.
- 14 — BORDET, J., 1910, *Zbl. Bakt., I. Abt., Ref.*, 45, 417-437.
- 15 — BAIL, O., 1915, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 75, 159-173.

- 16 — KRAMÁR, E., 1922, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 87, 401-406.
- 17 — AVERY, O. T. & Colaboradores, 1923, *Jour. Exp. Med.*, 38, 73-79, 81-85; 1924, 40, 301-316; 1925, 42, 347-353, 355-365, 367-376, 709-725.
- 18 — JULIANELLE, L. A., 1926, *Jour. Exp. Med.*, 44, 113-128, 683-696, 735-751.
- 19 — SOKHEY, S. S., 1940, *Jour. Path. & Bact.*, 51, 97-103.
- 20 — VON FRISCH, 1882, *Wien med. Woch.*, 32, 970.
- 21 — FRIEDLÄNDER, C., 1883, *Fortschr. Med.*, 1, 715.
- 22 — LOEWENBERG, 1894, *Ann. Inst. Pasteur*, 8, 292-317.
- 23 — ABEL, R., 1896, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 21, 89-155.
- 24 — WHITE, B., 1938, "The Biology of Pneumococcus", 32.
- 25 — MIGULA, W., 1896, *Deutsch. tierärztl. Woch.*, 4, 28.
- 26 — BONI, I., 1900, *Zbl. Bakt., I. Abt.*, 28, 705-707.
- 27 — CARPANO, M., 1913, *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.*, 70, 42-50.
- 28 — ST. JOHN-BROOKS, R., 1930, "A System of Bacteriology", Medical Research Council, 1, 104-114.
- 29 — BABES, V., 1895, *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 20, 412-437.
- 30 — GRUBER, M. & FUTAKI, K., 1907, *Münch. med. Wschr.*, 54, 249.
- 31 — PREISZ, H., 1907, *Zbl. Bakt.*, 44, 209-210.
- 32 — BAIL, O., 1908, *Zbl. Bakt.*, 46, 488-502.
- 33 — SAUERBECK, E., 1909, *Zbl. Bakt.*, 50, 289-295; *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 63, 313-318.
- 34 — EISENBERG, P., 1903, *Zbl. Bakt.*, 34, 739-764; 1908, 45, 44-49, 134-159, 638-659; 1909, 49, 465-492.
- 35 — GUARNIERI, 1888, *Atti. d. v. Accad. med. di Roma*, Ser. II, 4, 114.
- 36 — WELCH, 1892, *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, 13, 128.
- 37 — NICOLLE, M., 1895, *Ann. Inst. Pasteur*, 9, 664-670.
- 38 — BUERGER, L., 1905, *Jour. Exp. Med.*, 7, 497-546.
- 39 — RÄBIGER, Cit. em 1920, "Technique Microbiologique et Sérothérapique", A. Besson, 7.^a ed., 255.
- 40 — JOHNE, Cit. em 1920, "Technique Microbiologique et Sérothérapique", A. Besson, 7.^a ed., 255.
- 41 — RIBBERT, 1885, *Deut. Med. Woch.*, 9, 136.
- 42 — MAC CONKEY, 1898, *Lancet*, 2, 1262.
- 43 — COOPER, M. L., 1925, *Jour. Inf. Dis.*, 36, 439-443.
- 44 — HUNTOON, F. M., 1917, *Jour. Bact.*, 2, 241-244.
- 45 — ANTHONY, JR., E. E., 1931, *Science, New Series*, 73, 319-320.
- 46 — FRIEDLÄNDER, C., 1885, *Fortschr. Med.*, 3, 757.
- 47 — HISS, P. H., 1901-05, *Jour. Exp. Med.*, 6, 317-345.
- 48 — RULISON, E. T., 1910, *Jour. Amer. Med. Ass.*, 54, 1426-1427.
- 49 — GINS, H. A., 1911, *Zbl. Bakt.*, 57, 472-478.
- 50 — GÓZONY, L., 1913, *Zbl. Bakt.*, 68, 594-597.

- 51 — BAKER, S. L., 1920, *Brit. Jour. Exp. Path.*, 1, 127-128.
- 52 — BUTT, E. M., BONYNGE, C W. e JOYCE, R. L., 1936, *Jour. Inf. Dis.*, 58, 5-9.
- 53 — ROSENOW, E C., 1911, *Jour. Inf. Dis.*, 9, 1-8.
- 54 — MUIR, R., 1915-1916, *Jour. Path. & Bact.*, 20, 257-259.
- 55 — SMITH, 1902, *Boston Med. and Surg. Jour.*, 147, 659-667.
- 56 — WHERRY, W. B., 1905, *Jour. Inf. Dis.*, 2, 577-588.
- 57 — SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1936, "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria", V₃₄-7.
- 58 — WADSWORTH, A., 1906, *Jour. Inf. Dis.*, 3, 610-618.
- 59 — AGASSE-LAFONT, E., 1929, "Les applications Pratiques du Laboratoire a la Clinique", 4.^a ed., 73.

AGLUTININAS HETERÓFILAS NA LINFOGRANULOMATOSE DE NICOLAS — FAVRE

LUÍS DE SALES GOMES

Chefe da Sub-divisão de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz

MANOEL DE BRITTO E SILVA

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

As investigações de Forssmann¹ sobre a produção de hemolisinas anti-carneiro, fortes e específicas, independente da ação antigênica dos glóbulos de sangue deste animal, deve-se principalmente o conhecimento dos então chamados *anticorpos heterogenéticos*, aos quais Friedemann² posteriormente deu a denominação mais expressiva e hoje usual de *anticorpos heterófilos*. Estes anticorpos seriam, pois, segundo a definição de Davidsohn³, os capazes de reagir com antígenos inteiramente diversos e filogeneticamente não relacionados com a sua produção.

Os estudos iniciais sobre o assunto restringiam-se porem às lisinas, até que Fukuhara e Ando⁴, imunizando coelhos com glóbulos sanguíneos e com órgãos heterófilos, obtiveram, em títulos comparativamente altos, não lisinas, mas aglutininas para *B.typhosus*, *B.paratyphosus B.*, *B.psittacosis*, etc. ao mesmo tempo que com relação ao *Vibrião cholérico*, *B.coli*, *B.paratyphosus A.*, etc., nada notavam.

Trou-Hia-Hsu⁵, sem dúvida, fixou fatos mui interessantes sobre a matéria com o achado de que as aglutinações dos glóbulos de carneiro, quando em face de soros imunes heterólogos, estavam condicionadas ao envelhecimento dos glóbulos utilizados nas provas. A aglutinação começaria a revelar-se com glóbulos que estivessem guardados pelo menos 2 a 3 dias, ao passo que era negativa com glóbulos recentemente colhidos. Observou ainda que as aglutininas heterófilas são suscetíveis de ser fixadas por glóbulos de sangue de carneiro, frescos, velhos ou mesmo fervidos, e também com rim de cobaio.

Kritchvesky⁶, a seguir, focaliza o alto teor aglutinante do soro de coelho imunizado com eritrócitos de galinha, não só para os glóbulos desta ave, mas também para glóbulos de carneiro.

Outros autores como Friede e Gruenbaum⁷ e Kolmer e Toyama⁸, abordaram também o assunto, tendo encontrado, os primeiros — aglutininas heterófilas para eritrócitos de gato, em soro de coelho injetado com sangue de carneiro, verificando os últimos — que sais de arsênico e de mercúrio, dados em pequenas doses, podem aumentar a produção de aglutininas para eritrócitos e para *B.typhosus*.

Estudos posteriores trazidos à publicidade nestes últimos três lustros, muito concorreram no sentido de melhor esclarecer tão palpitante capítulo da imunologia.

Deicher⁹ encontra aglutininas heterófilas em indivíduos injetados com soro de cavalo e de carneiro e, depois de estudá-las com relação a glóbulos de carneiro, de cavalo, de coelho, de cobaio e de boi, chega à conclusão de que elas não pertencem aos anticorpos do tipo Forssmann, e que aglutininas e moléstia do soro nenhuma relação têm entre si.

A conclusão contrária, entretanto, chega Davidsohn¹⁰. Este autor, não só mostra a elevação do teor em hemolisinas e aglutininas no sangue de indivíduos injetados com soro normal ou imune de cavalo, elevação essa ainda muito mais sensível nos pacientes atacados de moléstia do soro, como também demonstra, com provas de absorção feitas com rim de cobaio, a natureza rigorosamente heterófila desses anticorpos que, evidentemente, representam a resposta à introdução de um antígeno heterófilo (soro de cavalo) no organismo humano.

Impressionados com tais estudos é que, depois, Paul e Bunnell¹¹ resolveram procurar anticorpos heterófilos em estados clínicos com sintomatologia mais ou menos semelhante à moléstia do soro. Assim, é que, examinando soros de doentes com reumatismo poliarticular agudo, veio-lhes às mãos, por mero acaso, o soro de um doente de mononucleose infecciosa, material este que logo despertou-lhes a atenção pelo seu alto teor em aglutininas para glóbulos de carneiro. A seguir, mais três amostras são estudadas, apresentando a mesma particularidade, isto é, alta concentração de aglutininas heterófilas. Casos clínicos os mais variados são, então, investigados com relação à presença de anticorpos dessa natureza. Nenhuma moléstia, porém, a não ser a moléstia do soro (aliás de fácil exclusão) apresentava, como a mononucleose infecciosa, altos títulos aglutinantes para glóbulos de carneiro.

Destarte, apareceu, como auxílio precioso ao diagnóstico clínico e hematológico, nem sempre fácil, da mononucleose infecciosa, a reação sorológica de Paul e Bunnell¹¹.

Bailey e Raffel¹², porem, demonstram a capacidade dos glóbulos de boi em absorver as aglutininas para glóbulos de carneiro encontradas nos soros de pacientes com mononucleose infecciosa; e sugerem que o uso dessa prova seja adicionado à Reação de Paul e Bunnell. Logo após estes autores, Stuart, Fulton, Ash e Gregory,¹³ verificam que os anticorpos para eritrócitos de carneiro, encontrados na mononucleose infecciosa, distinguem-se dos anticorpos humanos normais, pois que são absorvidos por eritrócitos de boi, conforme foi observado por Bailey e Raffel¹², não o sendo porem pelo rim de cobaio.

À técnica desses autores, logo depois, ajuntou Davidsohn¹⁴, outra modificação, tendente aliás a eliminar causas de erro representadas não só pelas aglutininas normais, como também pelas aglutininas encontradas em indivíduos injetados com soro de cavalo e sujeitos à moléstia do soro. E sugeriu então que, nos soros positivos, fosse feita a prova de absorção, ao mesmo tempo, com absorventes para as aglutininas do tipo Forssmann (rim de cobaio) e com absorventes para as aglutininas heterófilas da moléstia do soro e da mononucleose infecciosa (glóbulos de boi).

O rim de cobaio absorveria 50 a 70% e os glóbulos de boi 100% das aglutininas da mononucleose infecciosa, enquanto que as aglutininas heterófilas da moléstia do soro, seriam absorvidas totalmente por ambos os antígenos. Por outro lado, as aglutininas para glóbulos de carneiro, existentes em título médio de 1:20 no soro de pessoas normais, seriam totalmente absorvidas pelo rim de cobaio e parcialmente (média de 55%) pelos glóbulos de boi, por isso que elas se filiam ao chamado tipo heterófilo de Forssmann.

Alguns autores, como por exemplo Kagan¹⁵, pretendem que os títulos aglutinantes para glóbulos de carneiro, em pessoas normais, sejam muito mais altos do que se supõe.

Entretanto Stuart¹⁶ e colaboradores, mostraram que estes desencontros nos resultados publicados por esses autores, têm sua origem provável, na falta de uniformidade na designação do título final de diluição do soro e, também, na grande variação da concentração final dos glóbulos de carneiro empregados nas provas.

Além disso, não seria de se desprezar na leitura das reações, a influência das chamadas "cold agglutinin", que os citados autores

focalizam como uma outra causa provável da diversidade dos resultados. Estas "frigo-aglutininas" (como as chamaremos), geradas quando da permanência dos tubos da reação, na geladeira, concorreriam para falsear os resultados das provas, as quais, sob sua influência, poderiam atingir títulos mais altos do que os reais. A interferência delas, elevando os títulos, desapareceria, entretanto, com a precaução de, antes da leitura, manterem-se os tubos das reações cerca de 2 horas à temperatura de 37°C..

Finalmente, Barrett¹⁷, em recente publicação, entre outros fatos que assinala, insiste na influência considerável que a variação térmica pode exercer sobre o título aglutinante do sôro.

NOTA À MARGEM

De passagem, devemos referir que, há vários anos, vimos acompanhando com especial interesse os estudos sobre a diagnôse da mononucleose infecciosa, quer em seu aspecto hematológico, quer sorológico. Esse interesse deu ensejo a que um de nós (M. Britto e Silva)^{18,19} em números anteriores desta REVISTA, publicasse um estudo sorológico de casos da moléstia observados esparsamente em nosso meio, e uma ligeira observação de casos residuais duma epidemia da moléstia verificada em 1940, na cidade de Mogi-Mirim, neste Estado.

Posteriormente, na segunda quinzena de Março, do ano em curso, (1942), justamente no período de transição estivo-outonal, tivemos, nós ambos, oportunidade de também esclarecer com provas de laboratório feitas neste Instituto, suspeitas clínicas dos distintos colegas do Hospital de Isolamento "Emilio Ribas", acerca de uma moléstia que, na ocasião, reinava epidemicamente em São Paulo, e que, na opinião de uns, seria gripe, na de outros, febre tifóide, paratifóide, etc..

Das provas de laboratório para logo realizadas, em materiais de cerca de 30 doentes que haviam sido removidos de vários pontos da cidade para o Hospital "Emilio Ribas", verificou-se tratar-se hematológica e sorologicamente de casos de mononucleose infecciosa. A primeira notícia dada então a respeito dessa epidemia de mononucleose infecciosa, foi a da Diretoria do Departamento de Saude do Estado, mandada publicar pelo Governo do Estado em todos os órgãos de imprensa da Capital, na data de 1/4/1942, e que era vasa-da no seguinte teor:

"Está grassando atualmente nesta Capital, sob forma epidêmica, uma moléstia infecciosa mais comum nos moços. Os principais sintomas iniciais são: arrepios de frio, forte dor de cabeça e febre.

Após um período febril de 14 dias em média, dá-se o aparecimento de enfartamento ganglionar. Além desta forma clínica há outra em que se observa unicamente a febre, que se prolonga por 2 semanas ou mais, acompanhada ou não de náuseas e perturbações intestinais.

Para o lado da pele, principalmente do tronco, observam-se por vezes máculas roseoliformes mais ou menos discretas. Baço quasi sempre aumentado de volume.

A Secção de Epidemiologia e Profilaxia Gerais tem sido reclamada frequentemente para remoções, como casos suspeitos de febre tifóide.

Dos doentes removidos para o Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", onde foram cuidadosamente observados sob o ponto de vista clínico, e pelo "Instituto Adolfo Lutz" nas pesquisas de laboratório, verificou-se que não se trata de febre tifóide e sim de casos de "Mononucleose infecciosa".

Esta moléstia já vem sendo observada esporadicamente nesta Capital, tendo agora tomado caráter epidêmico.

Sob forma epidêmica tem sido observada em vários países, e, entre nós, ha dois anos verificou-se um surto na cidade de Mogi-Mirim.

O diagnóstico é geralmente firmado pelo leucograma, podendo ser auxiliado pela reação de Paul, Bunnell e Davidsohn.

A mortalidade é nula."

Ao fim de 40 ou 50 dias, porem, o surto epidêmico de Mononucleose infecciosa cedeu, e, ao seu breve relato, neste trabalho, emprestamos tão somente um cunho accidental.

LINFOGRANULOMATOSE DE NICOLAS-FAVRE E AGLUTININAS PARA ERITRÓCITOS DE CARNEIRO

É claro que, apresentando sua excelente contribuição à diagnose sorológica da mononucleose infecciosa, em 1932, Paul e Bunnell¹¹ não deixaram de realizar, como parte integrante das suas observações, numerosas contra-provas em casos normais e em casos apresentando condições patológicas as mais diversas.

Nos soros de uns e de outros, porem, não encontraram títulos de aglutininas para eritrócitos de carneiro, mais expressivos, que os representados pelas diluições de soro a 1:16 e (em raríssimos)

a 1:32. Os casos clínicos experimentados foram os mais variados possíveis: tuberculose (15 casos), sífilis (6), reumatismo articular (12), infecções estreptocócicas (13), angina de Vincent (2), abscesso do fígado (1) infecções mistas (11), asma brônquica (4), condições mistas (11), anemia perniciosa (4), púrpura hemorrágica (2), leucemia linfática (2), leucemia mielógena (2), moléstia de Hodgkin (1).

A estas contra-provas, outras foram posteriormente juntadas por Bunnell²⁰, contendo os seguintes estados patológicos em que, também, as aglutininas heterófilas não eram encontradas em títulos superiores aos acima indicados: agranulocitose, leucemias linfática e mielógena (aguda e crônica), timoma maligno, linfo-adenose benigna, adenite sífilítica e tuberculosa. Ao todo, mais de 2.000 casos representando 76 condições clínicas diferentes, foram, por fim, examinados sorologicamente.

O fato de, em tão extensa lista, não constarem casos de linfogranulomatose de Nicolas-Favre — moléstia infecciosa, etiologicamente definida num vírus eminentemente linfotrope, cuja ação se reflete sobre todo o sistema retículo-endotelial — foi que nos induziu às pesquisas de que damos a seguir um relato pormenorizado.

TÉCNICA

Adotamos nas nossas investigações, uma técnica eclética, isto é, inspirada principalmente nos trabalhos de Davidsohn¹⁴, e de Stuart e colaboradores¹⁶.

Título do soro em aglutininas anti-carneiro — Série de 12 tubos de hemólise. No 1º tubo põem-se 0,4 cc. e nos seguintes 0,25 cc. de soluto fisiológico. Aos 0,4 cc. de sol. fisiológico do 1º tubo, junta-se 0,1 cc. do soro a examinar, inativado previamente a 56°C., 30'. Mistura-se bem a diluição do tubo nº 2. Mesma operação de mistura e de transferência de 0,25 cc. da mistura do tubo nº 2 para o nº 3, etc., até o tubo nº 12. Neste tubo nº 12, existem a mais, 0,25 cc. da diluição, que devem ser despresados. Um 13º tubo será acrescentado à série, como *controle*, devendo este conter apenas 0,25 cc. de soluto fisiológico, sem nenhum soro.

As diluições assim preparadas vão de 1:5 (1º tubo) a 1:10.240 (12º tubo).

Glóbulos de sangue desfibrinado de carneiro, previamente lavados por centrifugação 4 vezes em soluto fisiológico esteril, e, com

este soluto, recompostos em seu volume inicial, são deixados em repouso na geladeira durante 24-48 horas.

Prepara-se uma suspensão destes glóbulos a 2% em soluto fisiológico, distribuindo-se 0,1 cc. desta suspensão em cada um dos 12 tubos que contêm 0,25 cc. das diluições do soro e, também, no tubo 13 (test).

As diluições do soro passarão então a 1:7 no 1º tubo, 1:14 no segundo tubo e assim por diante, sempre em títulos dobrados. Por outro lado, os glóbulos de carneiro terão agora, em cada tubo, sua concentração diminuída de 2% para 0,57%.

Depois de bem agitados, são os tubos levados à geladeira até o dia seguinte.

Da geladeira, são passados para uma estufa regulada a 37°C., onde permanecerão 2 horas, após as quais dá-se início à leitura das aglutinações, tão rapidamente quanto possível.

Leitura dos resultados: — Os tubos são moderadamente agitados (4 a 5 vezes), observando-se, a olho nú, até em que tubo ainda existem flóculos aglutinados. Dos dois tubos seguintes ao último em que a aglutinação é ainda visível a olho nú, retira-se uma gota que é ligeiramente distendida sobre lâmina e examinada com fraco aumento ao microscópio.

Os resultados das aglutinações podem ser representados por sinais da maneira seguinte:

Macroscópica	{	+++ : Hematias em um só floco com fracionamento mínimo.
	{	++ : Floco que se fraciona em numerosos outros flóculos.
Microscópica	{	+ : Grupos de 10-15 hematias, invisíveis a olho nú.
	{	± : Grupos de 5-8 hematias

DOENTES

Os doentes que forneceram sangue para as provas de aglutinação dos eritrócitos de carneiro, apresentavam, uns, a forma inguinal clássica da Moléstia de Nicolas-Favre, outros, complicações dela, como sejam retite estenosante, fístulas ano-retais, etc.. A febre era sintoma freqüente nos doentes que tinham bubão inguinal.

Todos os doentes reagiram fortemente ao antígeno de Frei (pús inguinal humano) injetado intradermicamente, sendo esta reação realizada com duas amostras de antígeno humano de diferentes procedências.

Se o doente apresentava adenite purulenta, fazia-se o controle bacteriano do pús inguinal, semeando-se o material em meios comuns (agar, caldo) e em meio com sangue de coelho, próprio para *H. ducreyi*. Utilizado sob a forma de antígeno de Frei para diagnóstico, o pús, deu, sempre que experimentado, ótimos resultados em numerosos outros casos de quarta moléstia venérea.

Nenhum dos doentes portadores de gânglios inguinais enfiados ou purulentos, apresentava lesões ulcerosas do penis. Contudo, às vezes, a reação intra-dérmica de *Ito-Reenstierna* ("Piraducrey") era praticada, afim de eliminar pequenas dúvidas. Porém, mostrou-se ela sempre negativa.

Houve dois doentes portadores de infecção mista: quarta moléstia venérea e úlcera mole. Nestes, ambas as reações intradérmicas foram fortemente positivas, tendo-se ademais, encontrado o bacilo de Ducrey nas lesões ulcerosas existentes.

Houve igualmente um caso misto de poradenite inguinal e lues (primo-infecção venérea). Este caso apresentava supuração ganglionar na região inguinal esquerda e enfartamento à direita.

O tempo de moléstia era variavel nos nossos doentes: os portadores de gânglios inguinais enfiados ou supurados (geralmente homens) estavam doentes entre 20 dias e 3 mēzes; e os que apresentavam refite, com ou sem estenose, fistulas ano-retais, etc., (geralmente mulheres), sofriam do mal desde 6 mēses até 15 anos.

Estes doentes, em sua maioria, não haviam ainda feito qualquer tratamento. Alguns dentre os mais antigos, entretanto, já tinham feito uso do iodeto de sódio na veia. Nenhum porem, havia tomado em época mais ou menos próxima, injeções de soro de cavalo ou de outro animal.

Os leucogramas de quasi todos os casos aqui relatados, não forneceram a mais leve sugestão referente a mononucleose infecciosa. Ao contrário disso, muitos deles, apresentavam um quadro hematológico visinho do normal.

Todos os pacientes eram suspeitos clinicamente de Moléstia de Nicolas-Favre e, ao procurarem o laboratório, dependiam somente do resultado da *reação intradérmica de Frei* para confirmação diagnóstica. Estas reações foram praticadas por um de nós no Laboratório do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

RESULTADOS

Nossos resultados baseiam-se em 75 provas de aglutinação de eritrócitos de carneiro, feitas em soros de doentes de linfogranulomatose de Nicolas-Favre, sob vários aspectos clínicos.

Os quadros que damos mais adiante, indicam pormenores referentes à idade, sexo, tempo de moléstia, Reação de Frei, e, finalmente, aos títulos aglutinantes dos soros desses doentes.

Reduzindo-se, à sua frequência e porcentagem, os títulos dos 75 soros representados nos referidos quadros, verificam-se os seguintes números:

PROVAS NA LINFOGRANULOMATOSE DE NICOLAS-FAVRE

<i>Título</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
1:7	1 vez	1,33
1:14	6 vezes	8,00
1:28	11 "	14,66
1:56	9 "	12,00
1:112	17 "	22,66
1:224	14 "	18,66
1:448	7 "	9,33
1:896	5 "	6,66
1:1792	2 "	2,66
1:3584	2 "	2,66
1:7168	1 vez	1,33

Título médio de aglutinação: 1:296.

Para contra-provar a técnica posta em prática nas nossas pesquisas, dosámos as aglutininas anti-carneiro de 75 pessoas normais. Destes 75 soros normais, 50 foram colhidos de indivíduos que, seguramente, não tinham febre na ocasião e que nem a haviam tido pelo menos 60 dias antes da colheita do sangue. Nunca haviam tomado qualquer injeção de soro, e repartiam-se entre crianças, médicos e técnicos de laboratório. Os 25 soros restantes, foram escolhidos, sem distinção, dentre os enviados ao Instituto pelos Centros de Saude, afim de neles serem procedidas as reações sorológicas para lues.

Registamos abaixo, em frequência e porcentagem, os títulos alcançados por esses soros normais:

PROVAS EM INDIVÍDUOS NORMAIS

<i>Diluição</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>
Negativo	3 vezes	4,00
1:7	7 "	9,33
1:14	14 "	18,66
1:28	33 "	44,00
1:56	16 "	21,33
1:112	2 "	2,66
1:224	0 "	0,00

Título médio de aglutinação: 1:30.

DISCUSSÃO

a) *Da parte técnica* — Muitas têm sido ultimamente as sugestões propostas por investigadores, no sentido de concorrer para o aperfeiçoamento da parte propriamente técnica da soro-aglutinação heterófila para glóbulos de carneiro.

Assim é que uns, procuram estabelecer títulos médios normais mais exatos; outros, computam pequenos detalhes de diluição de soro e de concentração de glóbulos; outros ainda, visam a parte econômica relativa ao material empregado; e outros, finalmente, procuram eliminar causas indiretas capazes de falsear os títulos.

Baseados em muitas dessas sugestões, foi que optámos pela técnica atraz indicada. Experimentada em soros normais, ela nos deu títulos aglutinantes médios, isto é, mais ou menos equidistantes das médias exageradamente altas de certos autores, e das muito baixas de outros. Além disso, em casos reconhecidos de moléstia do soro e de mononucleose infecciosa, temos aplicado esta técnica com ótimos resultados quanto à sua sensibilidade.

A propósito das variações a que ficam expostos os resultados, quando diferentes concentrações de glóbulos são usadas, devemos dizer que, tais variações, não foram por nós praticamente notadas ao empregarmos, comparativamente, suspensões de glóbulos a 2% e a 1%. Essas suspensões correspondiam, nos tubos, respectivamente, às concentrações finais de 0,57% e 0,285% de glóbulos. É possível que, somente concentrações variando em limites mais largos do que estes, possam exercer influência na variação do título aglutinativo de um mesmo soro.

N.º	Doente	Idade - sexo	Forma clinica	Tempo de molestia	R. de Frei	Título aglutinante para glóbulo de carneiro										
						1/7	1/14	1/28	1/56	1/112	1/224	1/448	1/896	1/1792	1/3584	1/7168
1	J. S.	31	fem.	Retíte estenosante	—	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
2	A. D.	35	fem.	» »	11 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
3	E. A.	40	fem.	» »	14 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
4	M. A.	38	fem.	» »	±8 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
5	J. S.	36	fem.	» »	±8 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
6	M. F.	28	mas.	Adenite fistulada.....	4 m.	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
7	G. F.	26	mas.	Adenite inguinal	1 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
8	T. A.	42	mas.	Cicatriz inguinal antiga.	Ad. inguin.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
9	N. B.	23	mas.	Adenite bilateral.....	12 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
10	M. X.	33	fem.	Retíte estenosante	30 d.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
11	R. E. J.	36	fem.	Retíte estenosante	4 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
12	M. B.	38	fem.	Retíte.....	8 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
13	F. S.	30	fem.	Adenite esq.....	1 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
14	R. A.	25	fem.	Ulceração inguinal crônica	12 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
15	B. O.	43	mas.	Adenite supurada.....	45 d.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
16	B. M.	45	mas.	Adenite bilateral fistulada	12 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
17	A. S.	30	fem.	Retíte estenosante	5 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
18	A. C.	47	fem.	Retíte estenosante	6 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
19	J. R. S.	31	fem.	Adenite bilateral supurada	2 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
20	A. G.	28	fem.	Retíte estenosante	2 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
21	B. S.	27	fem.	Retíte estenosante	2 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
22	J. F. D.	23	mas.	Adenite supurada	3 a.	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
23	E. C.	30	mas.	Adenite inguinal esquerda	2 m.	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
24	M. M.	21	mas.	Adenite bilateral.....	1 m.	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
25	R. O.	38	mas.	Adenite supurada	1 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
26	S. L.	34	fem.	Ulceração vag. crônica.....	3 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
27	A. P.	20	mas.	Adenite supurada.....	—	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
28	C. B.	27	mas.	Adenite supurada.....	40 d.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
29	A. G.	28	fem.	Retíte estenosante	25 d.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
30	L. C.	33	mas.	Adenite ing. dir. supurada	2 a.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
31	B. C.	22	mas.	Adenite supur. bilateral.....	1 m.	+++	+++	+++	++	++	+	±	±	±	±	±
32	D. G.	24	mas.	Adenite bilateral	3 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
33	L. R.	27	fem.	Retíte esten. fistulada.....	20 d.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
34	M. S.	29	fem.	Ret. fist. ano. - ret.....	8 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
35	J. A. O.	19	mas.	Adenite supurada	1 a.	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
36	M. D.	31	fem.	Estenose retal	3 m.	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+
37	D. M.	50	fem.	Retíte estenosante	9 m.	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—
38	P. D.	24	mas.	Adenite bilateral.....	alguns anos	+++	+++	+++	++	++	+	±	±	±	±	±
39	J. F.	48	mas.	Adenite direita.....	25 d.	+++	+++	+++	++	++	+	±	±	±	±	±

N.º	Doente	Idade - sexo	Forma clínica	Tempo de molestia	R. de Frei	Titulo aglutinante para glóbulo de carneiro -											
						1/7	1/14	1/28	1/56	1/112	1/224	1/448	1/896	1/1792	1/3584	1/7168	
40	M. T.	35	fem.	Retite estenosante	4 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
41	V. Z.	23	fem.	Físt. ano-retais	2 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
42	M. A.	48	fem.	Retite e ulc. vag.	15 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
43	T. M.	26	mas.	Lesão prep. e aden.	30 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
44	O. S.	25	mas.	Adenite ing. cicatrizada	Ha 1 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45	B. S.	34	fem.	Estenose ret. e uretr.	1 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
46	M. S.	23	mas.	Adenite bilateral	3 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
47	Gustavo	23	mas.	Adenite supurada esq.	1 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
48	M. T.	28	mas.	Adenite bilat. supur.	2 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
49	M. F.	19	mas.	Adenite bilateral	8 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50	D. R.	26	mas.	Cicatriz inguinal	Ha 4 a. teve Frei	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
51	L. L.	27	fem.	Estenose retal	1 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
52	J. B.	46	mas.	Retite	6 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
53	M. L.	24	mas.	Adenite supur. dir.	1 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
54	M. G.	23	mas.	Prisão de ventre	3 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
55	P. C.	43	mas.	Adenite supur. esq.	4 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
56	A. P.	21	mas.	Adenite supur. bilat.	35 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
57	J. D.	19	mas.	Adenite supur. esq.	30 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
58	I. G.	30	fem.	Fístulas peri-anais	8 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
59	O. C.	30	fem.	Retite	vários anos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
60	D. D.	23	mas.	Aden. ing. dir. supur.	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
61	H. L.	26	mas.	Adenite bilateral	1 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
62	J. P.	17	mas.	Adenite ing.	20 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
63	O. S.	30	mas.	Adenite bilateral	12 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
64	C. L.	25	mas.	Adenite ing. esquerda	60 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
65	L. S.	28	mas.	Lesão margem do anus	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
66	O. D.	22	mas.	Adenite ing. esquerda	20 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
67	T. J.	18	mas.	Adenite ing. sup.	25 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
68	F. G.	32	fem.	Dór uterina com cofri- mento	3 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
69	E. A.	28	mas.	Adenite ing. dir.	3º d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
70	B. B.	26	mas.	Adenite ing. dir.	30 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
71	M. V. S.	38	mas.	Adenite ing. esq.	18 d.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
72	J. M.	20	mas.	Adenite ing. esq.	3 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
73	C. P.	38	fem.	Retite	2 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
74	F. F.	18	mas.	Adenite ing. bilat.	3 m.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
75	M. G.	31	mas.	Perturbação intest. - Ci- catriz ing. antiga	Teve bubão ing. sup. ha 9 a.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

A ação das frigo-aglutininas (*cold agglutinin* de Landsteiner²¹) para cuja existência e reversibilidade em face do calor, neste tipo de provas, Stuart¹⁶ e colaboradores chamam a atenção, foi também por nós comparativamente examinada. Dessa pesquisa, pudemos constatar que, realmente, estas aglutininas geradas à baixa temperatura, podem concorrer para falsear o título do soro, elevando-o quasi sempre de uma diluição, e, às vezes, até de duas. Aliás, na técnica utilizada por nós, os falsos resultados devidos às frigo-aglutininas, desapareciam em face da incubação dos tubos a 37°C..

b) *Dos resultados* — Passando a considerar agora a questão dos títulos limites para soros humanos normais, vemos que este é, precisamente, um dos pontos mais controvertidos nas provas de hetero-aglutinações com eritrócitos de carneiro. Essa controvérsia filia-se, como vimos, à influência exercida por fatores vários, decorrentes todos de técnicas as mais diversas.

Para ilustrar o que acabamos de referir, transcrevemos aqui um quadro muito demonstrativo emprestado ao excelente trabalho de Stuart¹⁶ e colaboradores, e por onde se terá uma idéia nítida da diversidade dos valores normais atribuídos por alguns autores:

COMPARAÇÕES DOS TÍTULOS DE AGLUTININAS PARA GLÓBULOS DE CARNEIRO EM SOROS NORMAIS, SEGUNDO VÁRIOS INVESTIGADORES (STUART E COLABORADORES)

DEICHER		DAVIDSOHN		BUNNELL		STUART e col.		KAGAN	
Dil.	Neg. e Pos.	Dil.	Neg. e Pos.	Dil.	Neg. e Pos.	Dil.	Neg. e Pos.	Dil.	Neg. e Pos.
	%		%		%		%		%
Neg. muitos		Neg. — 7		Neg. — 40,7		Neg. — 0,00		Neg. — 0,00	
1:4 poucos		1:3,5 — 20		1:8 — 23,3		1:5 — 3,00		1:7 — 0,00	
		1:7 — 24		1:16 — 22,2		1:10 — 23,00		1:14 — 0,55	
		1:14 — 30		1:32 — 9,0		1:20 — 46,33		1:28 — 20,29	
		1:28 — 18		1:64 — 4,0		1:40 — 20,66		1:56 — 23,39	
		1:56 — 1		1:128 — 0,8		1:80 — 6,00		1:112 — 30,43	
						1:160 — 0,66		1:224 — 11,59	
						1:320 — 0,33		1:448 — 1,45	
								1:896 — 4,34	

Entretanto, se examinarmos detidamente este quadro, fazendo-se naturalmente abstração dos resultados que ocupam, de um

e de outro lado, seus extremos, vemos que ele sugere títulos limites de normalidade visinhos às diluições de 1:112. Atingiram, no máximo, essa diluição, 1 a 2% dos soros normais — o que representa uma causa de erro por assim dizer desprezível, principalmente se considerarmos as possíveis pequenas faltas decorrentes da seleção, mesmo rigorosa, de casos normais.

Vimos que o título de 1:112 foi atingido apenas por 2,66% dos nossos soros normais — o que aliás está mais ou menos de acordo com a maioria dos autores.

Passando entretanto, a considerar os soros colhidos de linfogranulomatosos, temos que eles atingiram, nesse mesmo título (1:112), a alta porcentagem de 22,66%. E' pois razoavel, que se deva pensar, que muitos desses 22,66% de soros tenham suas aglutininas aumentadas, mercê de uma influência estranha, isto é, no caso, mui provavelmente a moléstia de Nicolas-Favre, ou melhor, o seu virus.

Levando-se portanto, em consideração a diluição de 1:112, teremos, para os soros de linfogranulomatosos de Nicolas-Favre, a respeitavel porcentagem de 64,00% de positividade.

Se, porem, desprezarmos como normal essa diluição (1:112), e só considerarmos bôa a diluição seguinte, isto é, 1:224, obteremos então, para os soros dos doentes, uma porcentagem de positividade equivalente a 41,33% — o que não deixa de ser, ainda assim, bastante expressivo.

Não menos expressivas são, tambem, as médias dos títulos de aglutinação verificadas nos soros. Para os soros normais essa média correspondeu à diluição de 1:30, enquanto que para os soros dos doentes ela elevou-se à consideravel diluição de 1:296.

Devemos, de resto, focalizar um aspécto muito interessante das nossas observações: é o que se refere aos altos títulos por nós encontrados nos soros dos casos crônicos da moléstia. Referímo-nos aos doentes nº 10, 21, 40, 41, 42, 45, 51 e 73. Nestes 8 casos, os títulos aglutinantes variavam de 1:224 a 1:1792. O tempo de moléstia distribuia-se, entre eles, da maneira seguinte:

<i>Tempo de moléstia</i>	<i>Casos</i>
1 ano	2
2 anos	2
3 anos	1
4 anos	2
15 anos	1

Estes dados, destacados do conjunto das nossas observações, levam-nos a pensar numa possível interferência, lenta e contínua, do vírus da moléstia, na gênese dessas aglutininas heterófilas. Isso explicaria, talvez, a razão do encontro de tais aglutininas mesmo em alguns doentes já em franco estágio crônico da moléstia.

Estamos longe de pensar, entretanto, que o nosso achado de aglutininas heterófilas, em altos títulos, na Moléstia de Nicolas-Favre, possa invalidar a Reação sorológica de Paul e Bunnell¹¹, à qual, posteriormente, ajuntou Davidsohn¹⁴ provas de absorção que lhe deram ainda maior segurança diagnóstica.

Mas, por outro lado pensamos que, paralelamente à moléstia do soro, a hipótese da Linfogranulomatose de Nicolas-Favre deverá ser também considerada sempre que, praticando-se a 1.^a fase da reação para o diagnóstico da Mononucleose infecciosa, depararmos com altos títulos de aglutinação. Aliás, uma breve indagação anamnésica do doente, por si só, orientaria perfeitamente o clínico na interpretação da prova de laboratório.

Releva notar ainda que, no caso especial da Linfogranulomatose de Nicolas-Favre e de suas complicações, as crianças ficariam praticamente afastadas, incidindo nos adultos entre 18 e 45 anos de idade, mais ou menos, a maior frequência da moléstia.

Finalizando, diremos que, prosseguem as nossas investigações no sentido de identificar o tipo dessas aglutininas heterófilas. Para isso já iniciámos as provas de absorção com rim de cobaia, com glóbulos de boi e com o próprio vírus poradênico.

Os resultados dessas provas serão oportunamente comunicados.

RESUMO

Depois de fazerem uma síntese dos trabalhos publicados desde 1911 sobre anticorpos heterófilos, referem-se os A.A. à aplicação prática desses trabalhos na diagnóstico da Mononucleose infecciosa (Reação de Paul — Bunnell — Davidsohn).

Em nota à margem do assunto, relembram provas por eles realizadas no Instituto Adolfo Lutz, no sentido de esclarecer a epidemia que grassou em São Paulo, este ano, nos meses de Março e Abril, e transcrevem o comunicado oficial sobre essa epidemia, fornecido na ocasião pelo Departamento de Saude do Estado.

Relatam, a seguir, pesquisas de aglutininas heterófilas para eritrócitos de carneiro, por eles realizadas nos soros de numerosos doentes de Linfogranulomatose de Nicolas-Favre.

Justificando suas pesquisas, dizem os A.A. que, entre 76 condições clínicas diferentes, examinadas por vários autores, e nas quais os títulos aglutinantes eram baixos, não constavam casos de moléstia de Nicolas-Favre. E, no entanto, esta moléstia é produzida por um vírus eminentemente linfótropo, cuja ação se reflete sobre todo o sistema retículo-endotelial, como acontece na Mononucleose infecciosa.

Examinando soros de 75 linfogranulomatosos (adenite inguinal, retite estenosante, etc.), diagnosticados todos sob o ponto de vista clínico e alérgico (Reação de Frei), encontraram os A.A., com frequência, nesses soros, aglutininas anti-carneiro em altos títulos.

Tomando como título positivo mínimo, a diluição de 1:112, obtiveram 64% de aglutinações positivas.

Tomando como título positivo mínimo, a diluição de 1:224, obtiveram, ainda assim, a expressiva porcentagem de 41,33% de aglutinações positivas.

O título máximo encontrado foi de 1:7168. O título médio de aglutinação dos soros de linfogranulomatosos, foi igual a 1:296.

Contra-provaram sua técnica com 75 soros normais, dos quais apenas 2,66% atingiram o título de 1:112. Nenhum atingiu o título de 1:224. O título médio de aglutinação dos soros normais, foi igual a 1:30.

Demoram-se os A.A. em considerações sobre a parte técnica e sobre os resultados obtidos, focalizando depois um aspecto interessante das suas observações: os altos títulos aglutinantes encontrados nos soros de alguns doentes crônicos. Em 8 destes casos crônicos, cujo tempo de moléstia variava de 1 a 15 anos, acharam títulos entre 1:224 e 1:1792. Estas observações parecem indicar uma possível ação, lenta e contínua, do vírus poradênico.

Os A.A. dizem que estão longe de pensar que o seu achado possa invalidar a Reação de Paul e Bunnell, à qual, posteriormente, juntou Davidsohn provas de absorção que lhe deram ainda maior segurança diagnóstica.

Mas, por outro lado, acham que, paralelamente à moléstia do soro, a hipótese da Linfogranulomatose de Nicolas-Favre deverá ser também considerada sempre que, praticando-se a 1.^a fase da

reação para o diagnóstico da Mononucleose infecciosa, depararmos com altos títulos de aglutinação. Aliás, uma breve indagação anamnésica do doente, por si só, orientaria perfeitamente o clínico na interpretação da prova de laboratório.

Salientam ainda que, no caso especial da Linfogramulomatose de Nicolas-Favre, as crianças ficariam praticamente afastadas, incidindo a maior frequência da moléstia, nos adultos entre 18 e 45 anos de idade.

Dizem finalmente os A.A. que, prosseguem suas investigações no sentido de identificar o tipo dessas aglutininas heterófilas. Para isso já iniciaram as provas de absorção com rim de cobaio, glóbulos de boi e com o próprio virus poradênico.

Os resultados dessas provas serão oportunamente comunicados.

SUMMARY

Having made a synthesis of the works published since 1911 on heterophile antibodies the A.A. point out the practical application of such works on the diagnosis of the infectious mononucleosis (Paul — Bunnell — Davidsohn Reaction).

The A.A. recall the tests done by them in the Instituto Adolfo Lutz, in a effort to throw light on an epidemic proved by them to be infectious mononucleosis, which occurred in São Paulo (Brasil), this year, in April and May, and quote the official note on such epidemic published at that time by the Public Health Department.

Next they report the researches on heterophile agglutinins for sheep erythrocytes which they did on the sera of a number of lymphogramulomatosis (Disease of Nicolas-Favre) patients.

Justifying their research, the A.A. say that amongst 76 different clinical conditions examined by various authors and in which the agglutination titres were low, there were not included cases of Nicolas-Favre diseases. Yet such disease is caused by an eminently lymphotropic virus which, therefore, affects the reticulo-endothelial system, as happens in the infectious mononucleosis.

Testing the sera of 75 lymphogramulomatosis patients (inguinal adenitis, stenosing rectitis, etc.), all of them diagnosed clinically and allergically (Frei's Reaction), the A.A. met with, frequently in these sera, anti-sheeps agglutinins in high titre.

Taking as positive reactions the agglutinations occurring in dilutions of 1:112 they obtained 64% positive agglutination. And

taking as positive reactions the agglutinations occurring in dilutions of 1:224, they still obtained the expressive percentage of 41,33% positive agglutination. The highest serum dilution with positive agglutination was 1:7168. The average titre of agglutination for the sera in lymphogranulomatosis was 1:296.

The technic was controlled with 75 normal sera out of which only 2,66% gave positive agglutination, in dilution as high as 1:112. None gave a positive reaction with dilution of 1:224. The average positive agglutination titre for normal sera was 1:30.

Next the A.A. deal with the technic and the results obtained laying stress on agglutination titres met with in the sera of some of the chronically diseased patients. In 8 of such chronic cases of lymphogranulomatosis whose disease lasted from 1 to 15 years, agglutination was between 1:224 and 1:1792. Such reactions seem to indicate a slow and progressive action of the poradenic virus.

Far from the A.A. to think that their findings might render useless the Paul and Bunnell's reaction, to which, lately, Davidsohn added the absorption test, giving it surer diagnostic value. But on the other hand they think that alongside the serum disease the hypothesis of lymphogranulomatosis of Nicolas-Favre ought to be considered when, on performing the first phase for the diagnosis of infectious mononucleosis, we meet high agglutination titres.

Usually a brief inquiry on the patients condition is sufficient to help interpretation of the laboratory tests.

Besides they lay stress on the fact that, concerning the lymphogranulomatosis of Nicolas-Favre, children are practically excluded since the disease occurs mainly between the ages of 18 and 45.

Finally the A.A. say that they are still trying to ascertain the type of these heterophile agglutinins. For that, they have already began the absorption tests with guinea-pig kidney, ox erythrocytes and the virus itself. The results of these researches will be published later on.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — FORSSMANN, J. — 1911, *Biochem. Ztschr.*, 37, 78.
- 2 — FRIEDEMANN, U. — 1917, *Biochem. Ztschr.*, 80, 333.
- 3 — DAVIDSOHN, I. — 1927, *Arch. of Path.* n.º 4, 776-806.

- 4 — FUKUHARA, Y. e ANDO, J. — 1914, *Ztschr. f. Imm. und. Exp. Therap.*, 22, 631
- 5 — TROU-HIA-HSU — 1922, *Ztschr. f. Imm. und Exp. Therap.*, 34, 507.
- 6 — KRITCHEVSKY, I. L. — 1923, *Ztschr. f. Imm. und Exp. Therap.*, 36, 1.
- 7 — FRIEDE, K. A. e GRUENBAUN, F. F. — 1925, *Imm. u. Exp. Therap.*, 44, 314.
- 8 — KOLMER, J. A. e TOYAMA, I. — 1918, *J. of Imm.*, 3, 326.
- 9 — DEICHER, H. — 1926, *Zeitschr. f. Hyg.*, 106, 561.
- 10 — DAVIDSOHN, I. — 1929, *The Journ. of Imm.*, 16, 259.
1930, *The Journ. of Imm.*, 18, 31.
1933, *The Journ. of Inf. Dis.*, 53, 219.
- 11 — PAUL, J. R. e BUNNELL, W. W. — 1932, *Am. Journ. of Med. Sc.*, 183, 90.
- 12 — BAILEY, G. H. e RAFFEL, S. — 1935, *J. Clin. Investigation*, 14, 228.
- 13 — STUART, FULTON, ASH e GREGORY — 1936, *Journ. Inf. Dis.*, 39, 70.
- 14 — DAVIDSOHN, I. — 1937, *The Journ. of the Amer. Med. Assoc.*, 108, 289.
- 15 — KAGAN, N. W. — 1931, *Ztschr. f. Imm. u. Exp. Ther.*, 72, 20.
- 16 — STUART, C. A. e col. — 1934, *Arch. of Internal Med.*, 54, 199.
- 17 — BARRETT, A. M. — 1941, *Journ. of Hygiene*, 41, 330.
- 18 — M. BRITTO E SILVA — 1941, *Revista do Inst. Adolfo Lutz*, 1, n.º 1, 160.
- 19 — M. BRITTO E SILVA — 1942, *Revista do Inst. Adolfo Lutz*, 2, n.º 1, 42.
- 20 — BUNNELL, W. W. — 1933, *The Amer. Journ. of Med. Sc.*, 186, 346.
- 21 — LANDSTEINER, K., e LEVINE, P. — 1926, *Journ. Imm.*, 12, 441.

NOTA A PROPÓSITO DE *SALMONELLA pauloensis*

LUIS DE SALLES GOMES,

Chefe de Sub-divisão do Instituto Adolfo Lutz

Em 1933, publicamos nos Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia¹, um trabalho sob o título “Nota sobre uma nova espécie do gênero “Salmonella” (Lignières), isolada de sangue, urina e fezes humanos”. Esse trabalho, em resumo, referia-se ao estudo simultâneo, sob os pontos de vista bio-químico e sorológico, de amostras de Salmonellas indologênicas que havíamos então isolado de sangue (2 amostras), de fezes (1 amostra) e de urina (1 amostra) de diferentes doentes.

Os hidratos de carbono usados por nós naquela ocasião, quanto não fossem de uma só origem, eram, entretanto, de boa procedência (Pfanstiehl, Mulford e Sp.Chem.Co.).

A orientação sistemática baseou-se principalmente, no “Manual of Determinative Bacteriology”, 3.^a edição, (1930) de D. H. Bergey.

As provas sorológicas de aglutinação, demonstraram a existência de afinidades imunológicas entre as diversas amostras estudadas, e, por outro lado, as provas de fermentação sobre hidratos de carbono, afastavam-nas de todas as espécies do gen. *Salmonella* registradas na referida 3.^a edição do “Manual Bergey”.

Em tais condições, das nossas observações concluímos o seguinte: “Por enquanto, em face do que foi estudado e exposto, parece que estamos em presença de uma nova espécie do gênero *Salmonella*, e para ela preferimos a denominação de *Salmonella pauloensis* (N.Sp.) por ter sido isolada e estudada nesta cidade de São Paulo”.

Não tendo em mãos, para um estudo comparativo bio-químico e sorológico, todas as espécies daquele gênero bacteriano, fomos obrigado a nos cingir, então, às indicações fornecidas por aquela edição do “Manual” que, na ocasião, era a última.

Infelizmente, porém, aconteceu que o "Manual" de sistemática bacteriológica saiu eivado de erros e omissões, tendo estes, parece, culminado na parte referente ao estudo do gênero *Salmonella* — o que, aliás, se poderá facilmente verificar, compulsando as duas edições sub-sequentes, de 1934 e de 1938.

Ora, estas falhas não podiam deixar de nos orientar por caminho errôneo, levando-nos assim à suposição de que "parecia estarmos em presença de uma nova espécie".

Retomando ultimamente o assunto para uma revisão, agora porém melhor amparado sob o ponto de vista material e melhor orientado pelo estudo paralelo feito com algumas amostras de *Salmonellas* conhecidas, devemos dizer que chegamos a conclusão diferente.

Nossa "*Salmonella pauloensis*", (amostra n.º 3 de sangue e amostra n.º 15 de fezes), portou-se, sob o ponto de vista bio-químico e sorológico, de modo idêntico a *Salmonella columbensis* (Castellani) ².

As provas de identificação só puderam, entretanto, ser realizadas, com as amostras n.º 3 (de sangue) e n.º 15 (de fezes) porque as demais, infelizmente, perderam-se (n.º 16, de sangue e n.º 12 de urina).

A amostra de *Salmonella columbensis* utilizada comparativamente nestas provas, é originária do Instituto Lister, de Londres (Dr. Krumwied) e foi-nos há já algum tempo gentilmente enviada, juntamente com outras, pelo distinto colega Dr. Arlindo de Assis.

As amostras *pauloensis* n.º 3 (sangue) e n.º 15 (fezes) apresentaram os seguintes caracteres bio-químicos comuns com *Salmonella columbensis*:

- 1) *Motilidade*: + (agar 37°, Caldo 20° e Neustadtl).
- 2) *Caldo*: Turvação difusa.
- 3) *Indol*: + (R.Ehrlich).
- 4) *Redução nitratos*: + (Ilosvay).
- 5) *Acetil-metil carbinol*: negativo (Voges-Proskauer)
- 6) *R.Vermelho-metila*: +
- 7) *H₂S*: + (Topley e Wilson)
- 8) *Liq.gelatina*: negativa
- 9) *Leite turnesolado*: Acidez inicial, alcalinidade final.
- 10) *Hidratos de carbono*:

- a) *ácido e gás*: dextrose, manita, maltose, xilose, arabinose, rannose, dulcita, salicina, dextrina, levulose, galactose, sorbita, trehalose, manose e glicerina.
- b) *ausência de fermentação*: lactose, sacarose, rafinose, inulina, adonita, inosita e amido.

Estas provas foram observadas durante 21 dias, sendo utilizado o meio semi-sólido de Hiss com indicador fenol vermelho.

Com exceção da glicerina (J. Wyman) e do amido (Merck), todos os hidratos de carbono empregados provinham da fábrica "Pfanstiehl".

Com relação à amostra de Salmonela n.º 15 (de fezes), deu-se um fato interessante, que convém seja aqui anotado. Descrita originariamente como movel, ela agora não apresentava movimento algum. Além disso, ao envéz de turvação difusa no caldo (24 h.), como outrora, verificava-se, agora, sedimentação quasi completa do germen.

Não foi porém difícil encontrar-se a causa dessas discordâncias. Devido ao fato de só ser repicada cada 3 meses na secção de conservação de culturas do Instituto, houve mutação desta amostra para a variante rugosa, o que consequentemente veio ocasionar as diferenças referentes à motilidade do germen e ao seu aspecto cultural em caldo. O aspecto característico das colônias em placas, veio, aliás, confirmar inteiramente essa suposição.

Outras culturas do mesmo germen, que tínhamos guardadas no nosso laboratório e que vinham sendo repicadas mensalmente durante cerca de 8 meses, nenhuma modificação, entretanto, sofreram, pois turvavam difusamente o caldo e os bacilos apresentavam-se perfeitamente móveis, como aliás foram vistos anteriormente, quando da primeira descrição.

As duas outras amostras de salmonelas (n.º 3 de sangue e *columbensis*) embora conservadas nas mesmas condições que a n.º 15 (fezes), isto é, sofrendo repicagens tri-mensais, não apresentaram porém, nenhuma mutação.

Provas sorológicas: Com as amostras em estudo foram preparados, em coelhos, soros aglutinantes. Os títulos desses soros (leitura após 24 h. a 37°C.) foram os seguintes:

Salmonella n.º 3 (sangue): 1:12.800.

Salmonella n.º 15 (fezes): 1:1.600.

Salmonella columbensis: 1:6.400.

Após absorção das aglutininas pelos germens homólogos, os títulos desses soros baixaram respectivamente a 1:200, 1:200 e 1:100.

As aglutinações cruzadas, feitas com as 3 amostras de germens acima indicadas e com os seus anti-soros previamente absorvidos, falam também em favor da sua identidade. Forte afinidade antigênica foi verificada, pois nenhuma das novas aglutinações, atingiu acima de 1:200.

De qualquer sorte, não deixa de ser interessante que, entre nós, se possa isolar do sangue de doentes em aparente estado tifóide ou paratifóide, e de fezes com o aspecto disenteriforme, a mesma espécie de salmonela encontrada em fezes de doentes em Colombo, na ilha de Ceilão, e descrita em 1914, por Castellani, com o nome de *Salmonella columbensis*.

Somos grato a D. Lúcia de Queiroz Telles e a D. Filomena de B. M. Jordão pela solicitude a nós dispensada no decorrer das provas deste trabalho.

SUMMARY

The A. made the review of one of his works published in 1933. Based mainly on the bio-chemical characteres, which he met in "Bergey's Manual" (3rd. ed. 1930), the A. described a probable new species of the genus *Salmonella* which he had isolated from human blood faeces and urine and for which he had proposed the name of *Salmonella pauloensis*.

However, as the result of numerous mistakes and omissions contained in the appointed edition of "Bergey's Manual", specially those of the chapter on the *Salmonella* genus, the A. was misled in his effort to make a systematic classification of the isolated germes.

Studying over, recently, two cultures isolated from blood and faeces, still preserved by the A. and comparing their behaviour with that of a sample of *Salmonella columbensis* (Castellani) originally from "Lister Institute" of London (Dr. Krumwied) the A. verified the perfect identity of the 3 samples from the bio-chemical stand point. Such identity was also observed from sorological view point when crossed absorption tests were made.

Finally the A. thinks that it is interesting the fact that in S. Paulo (Brasil) a *Salmonella* was isolated from the blood of patients apparently suffering from typhoid or paratyphoid fever and from faeces with dysenteriform aspect, identical with the species

of salmonella met with in faeces of patients from Colombo in Ceylan Island and discribed, in 1914, by Castellani under the name of *Salmonella columbensis*.

BIBLIOGRAFIA

- SALLES GOMES, L. de — 1933 — *Anais Paulistas de Med. e Cirurgia*, 27: 3.
CASTELLANI, A. — 1914 — *Centr. f. Bakt.*, 74: 197.
CASTELLANI, A. — 1917 — *Journ. Trop. Med. Hyg.*, 20: 181.
CASTELLANI, A. — 1920 — *An. Inst. Pasteur*, 34: 609.

ANTÍGENOS ADICIONADOS DE LANOLINA E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE SOROS AGLUTINANTES

S. C. CALAZANS

Assistente-chefe do Instituto Butantã

MARIA ARANTES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

O largo uso de antígenos adicionados de substâncias não específicas para a obtenção de soros antitóxicos data de alguns anos, sendo seu emprego iniciado após os trabalhos de G. Ramon¹ sobre este assunto em 1925. A idéia, porem, é antiga, pois já em 1889, Roux e Yersin², pouco tempo depois de terem descoberto a toxina diftérica observaram, em suas experiências, que o veneno elaborado pelo bacilo de Klebs-Löffler, que matava cobaias no período de 20 a 60 horas, tinha sua ação retardada quando tratado pelo cloreto de cálcio, o que levou os referidos autores a dizerem que "se a substância tóxica aderisse bastante ao corpo insolúvel, ela não se difundiria senão lentamente determinando, talvez, assim, a vacinação gradual do animal".

Em 1916 Le Moignic e Pinoy³ empregaram uma vacina antitífica constituída por germes mortos pelo calor, tendo como veículo a lanolina e o óleo de olivas. Visavam não só eliminar as reações local e geral, mas ainda realizar a vacinação antitífica com uma dose única, reunindo em uma só, a totalidade dos germes empregados nas 4 injeções então em uso.

Utilizando-se também de substância não específica, mas visando, apenas, o desenvolvimento dos germes no local da inoculação e a posterior difusão de sua toxina pelo organismo, Dochez⁴, em 1924, injetou gelose em estado fluido, subcutaneamente, em cavalos, e, na massa de agar acumulada no mesmo local, inoculou culturas de 18 a 20 horas do estreptococo da escarlatina, obtendo, com tal processo, soro antiescarlatinoso bastante ativo.

O emprego, porém, de substâncias não específicas na rotina do preparo de soros e vacinas só foi estabelecido depois das pesquisas memoráveis e fundamentais de G. Ramon¹ que revolucionaram por completo os antigos processos de imunização e hiperimunização.

Este grande e persistente pesquisador, a quem tanto deve a ciência e a humanidade, assinalou, depois de uma série de observações, "o aumento, por vezes considerável, do teor de antitoxina no soro dos cavalos que apresentavam acidentalmente um abcesso no ponto de injeção de uma dose de antígeno (toxina ou anatoxina)".

Atribuindo à referida reação inflamatória a melhoria do título dos soros, que vinha preparando, resolveu adicionar aos antígenos substâncias não específicas, mas capazes de produzirem *in loco* acentuada reação semelhante à obtida acidentalmente.

Fixou-se Ramon, no início, no emprego da tapioca pulverizada cuja aplicação passou a ser adotada largamente, sendo logo seguida pelo uso do cloreto de cálcio e das vacinas associadas. Por outro lado, Glenny, Pope, Waddington e Wallace⁵ adicionando alumen às toxinas notaram o aparecimento de um precipitado insolúvel que aumentava também grandemente o poder antigênico das mesmas.

Mais recentemente, Ramon, em estudos realizados com seus colaboradores Lemétayer e Richou⁶, mostrou ser a lanolina de grande utilidade na imunização e, em novas pesquisas ainda com Lemétayer⁷, expôs os resultados da imunização de carneiros e cavalos com a anatoxina tetânica envolta na referida substância. Com o emprego da lanolina os animais não só se imunizaram rapidamente como forneceram soro de alta dosagem.

Prosseguindo em seus estudos Ramon⁸ demonstra ainda o papel importante desempenhado pela lanolina no reforçamento do poder imunizante dos antígenos microbianos. Para isso comparou o poder antigênico de uma mesma raça de bacilo diftérico, inoculando em um grupo de coelhos, os germes contidos na décima parte de um tubo de cultura de 24 horas, suspensos em salina e, em outro grupo, a mesma quantidade de germes envolvidos na mistura oleosa. Com tal técnica, isto é, variando apenas o veículo em que foram suspensos os germes, foi possível conferir aos coelhos inoculados com antígeno oleoso uma forte imunidade, ao passo que no outro grupo, que recebera germes suspensos em soro fisiológico, a imunidade foi nula.

Levando adiante suas pesquisas no que diz respeito à imunização anti-bacteriana, Ramon invade o campo dos esporulados

aeróbios, estudando com Staub⁹ o interessante problema da vacinação anticarbunculosa que, apesar de marcar a genial descoberta de Pasteur, Chamberland e Roux, apresenta falhas e dificuldades tão conhecidas daqueles que se têm ocupado do seu preparo.

Depois de inúmeras experiências, conseguem esses A.A. preparar uma vacina de grande eficiência e apresentando risco mínimo, desprezível mesmo, empregando para isso uma quantidade de germes correspondente a 10 vezes a contida na primeira vacina de Pasteur. À referida vacina adicionava alumen, germes mortos ou lanolina. Com ela imunizaram, com sucesso, coelhos, carneiros, cabras, bois e cavalos, sendo a imunidade obtida bastante precoce e muito sólida, atingindo a proteção a 80% dos animais vacinados.

Imunizações feitas com germes da 1.^a vacina de Pasteur, em soro fisiológico, adicionada de tapioca ou de cloreto de cálcio não conferiram imunidade aos coelhos, posteriormente inoculados com a dose de prova.

Apresentando a referida vacina algumas desvantagens, foi a mesma aperfeiçoada, substituindo-se a lanolina pelo alumen (1 a 3%) ou a gelose a 2‰, ou ainda as duas substâncias juntas nas mesmas proporções citadas.

Outros pesquisadores seguem a Ramon. Weinberg e Guillaumie¹⁰ preparam pelo mesmo processo soro anti-gangrenoso em cavalos. Após a 2.^a injeção obtiveram soros aplicáveis na terapêutica e depois da 4.^a e 5.^a os soros atingiram títulos assás elevados, afirmando os A.A. ser muito precoce a formação de anticorpos.

Referindo-se ao método de Ramon, dizem esses autores: "o processo é excelente, quer o antígeno seja representado por uma anatoxina, quer por uma toxina fresca ou mesmo por micróbios vivos".

No Instituto Butantã, tanto no preparo de soros antipeçonhentos, a cargo do Dr. José Bernardino Arantes, como no serviço de preparo do soro anti-diftérico a cargo da Dra. Jandyra Planet, como na secção de soros anaeróbios ainda há pouco tempo dirigida pelo Dr. Büller Souto, e, atualmente, de novo sob a direção de um de nós, todas estas substâncias têm sido empregadas e com grande sucesso, tendo tais métodos sido iniciados em S. Paulo pelo saudoso amigo e colega Lemos Monteiro.

Nicolle e Laigret¹¹ substituíram a lanolina pela lecitina, preparando vacinas com virus amarílico, que foram aplicadas na profilaxia da febre amarela com resultados animadores (Oeste da África).

Velu e Zottner¹² o aplicaram na vacina contra a brucelose, Bell¹³ na vacina contra a coqueluche, aconselhando Ramon e Zoeller¹⁴ as vacinas associadas.

PRODUÇÃO DE AGLUTININAS NOS ANIMAIS INOCULADOS

Mutermilch¹⁵ notou que a inoculação de animais pela via raquidiana produzia soros aglutinantes de títulos nitidamente superiores aos obtidos pela via subcutânea, embora fosse empregada por esta última via uma quantidade de germes 20 vezes maior.

Tal fato sugeriu a Nélis¹⁶ a idéia de tentar a produção de soros aglutinantes de alto valor, pela via subcutânea, baseando suas experiências nos trabalhos de Ramon sobre o envolvimento dos antígenos pela lanolina.

Para isso inoculou Nélis várias séries de coelhos com dose única de bacilos paratíficos B, variando não só a quantidade e o modo de preparo do antígeno como ainda a via empregada.

No 1º grupo inoculou germes mortos pelo calor pela via subcutânea; no 2º a mesma suspensão de germes, diluída ao quinto, pela via meningéia; em uma 3.ª série de coelhos a mesma quantidade de germes do 1º grupo depois de centrifugado e o sedimento ressuspenso em mistura oleosa; e, finalmente, um 4º grupo, no qual se utilizou dos mesmos bacilos, porém, vivos e emulsionados na mistura lanolina-vaselina, após centrifugação.

Dos quatro processos acima citados revelou-se o melhor, pelos títulos obtidos e pela uniformidade dos resultados, o empregado neste último lote de animais.

Procurando estudar a curva da produção de aglutininas de modo a estabelecer aproximadamente sua maior elevação e, conseqüentemente, a ocasião mais indicada para a sangria dos animais produtores de soros aglutinantes, empreendemos uma série de experiências empregando as seguintes amostras de germes:

Eberthella typhosa 901 — Variação 0 — (Instituto Lister)
Salmonella Schottmülleri, Kauffmann
Salmonella paratyphi, Kauffmann
Shigella dysenteriae, "Parker" — (Instituto Lister)

As suspensões de germes foram preparadas com as culturas de 24 horas de 3 tubos de agar em salina, ressuspenso, após centrifu-

gação, em uma mistura de 2 partes de lanolina para 3 partes de vaselina líquida.

As primeiras inoculações foram feitas com os germes de 3 tubos de cultura adicionados de 3 cc. da mistura oleosa e as seguintes com 1 cc., sendo o intervalo entre as inoculações de 10 a 15 dias.

As injeções foram feitas sempre com germes vivos.

24 horas após a inoculação observamos hiperemia local, apresentando-se a região empastada no começo, tornando-se depois dura, para terminar com a formação de um nódulo que desaparece muito lentamente.

Os coelhos inoculados com a *E.typhosa* e as *Salmonellas Schottmülleri* e *paratyphi* nada apresentaram de anormal, a não ser a reação local.

Quanto à *Shigella dysenteriae*, além dessa reação inflamatória local, processaram-se fenômenos mais acentuados para o lado da pele, terminando com forte descamação. Em um dos coelhos houve mesmo a formação de um abscesso.

No que diz respeito aos germes altamente tóxicos como o bacilo Shiga, torna-se necessário inocular menor quantidade de germes para se evitar a morte dos animais durante o período de inoculação. Um ou meio tubo de cultura viva em 3 cc. de lanolina já pode ser empregado para o início da imunização, o que representa, sem dúvida, dose enorme comparada com as quantidades de germes mortos comumente empregadas.

É a lanolina adicionada ao antígeno que impede a ação tóxica dos germes como se vê no quadro abaixo.

COELHOS IMUNIZADOS COM A *S. DYSENTERIAE* (PARKER)

Coelhos	Quantidade de antígeno	Mistura lanolina-vaselina	Resultados	
1	3 tubos agar	1 cm. ³	s.g.	+ 6 dias
2	3 tubos agar	1 cm. ³	s.g.	sobrevive
3	3 tubos agar	3 cm. ³	s.g.	+ 10 dias
4	3 tubos agar	5 cm. ³	s.s.	sobrevive
5	Quinta parte de 3 tubos de agar	3 cm. ³	s.s.	"

s.g. = sintoma grave; s.s. = sem sintoma; + = morte.

O coelho nº 2, vinte e cinco dias depois de completamente restabelecido, foi novamente inoculado com a mesma quantidade da primeira injeção, suportando-a perfeitamente bem.

Os títulos obtidos após 4 inoculações foram os seguintes:

Germes	SANGRIAS			
	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a
<i>E. typhosa</i> 901	1/800	1/6.400	1/14.000	1/32.000
<i>S. Schottmülleri</i>	1/8.000	1/20.000	1/51.000	1/32.000
<i>S. paratyphi</i>	1/4.000	1/32.000	1/80.000	1/36.000
<i>Shigella dysenteriae</i> "Parker"	1/800	1/3.200	1/12.000	1/12.800 (*)
<i>Shigella dysenteriae</i> "Parker"	1/800	1/3.200	1/6.400 (*)	1/3.200 (*)
<i>Shigella dysenteriae</i> "Parker"	1/400	1/1.600	1/3.200 (*)	1/3.200 (*)

(*) = aglutinação microscópica.

Do quadro acima deduz-se que os títulos máximos foram obtidos nas 3.^a e 4.^a sangrias, isto é, após a 3.^a e a 4.^a inoculações.

Com os processos geralmente empregados nos laboratórios as sangrias costumam ser feitas depois de sete inoculações, não sendo tão altos os títulos obtidos, havendo ainda certa dificuldade em se obterem sôros aglutinantes, quando se trata de germes muito tóxicos.

DISCUSSÃO

A que se deve atribuir a ação das substâncias não específicas sobre o aumento da capacidade dos antígenos na produção de anticorpos?

Ramon a atribue à lenta reabsorção dos antígenos e à reação inflamatória local determinada pelos mesmos.

Para Weinberg e Guillaumie¹⁰, que compartilham da opinião de Ramon, o aumento do poder imunizante dos antígenos é devido "à reabsorção lenta e contínua do antígeno em consequência do seu envolvimento pela lanolina, e à forte reação local e geral do orga-

nismo, fator comum a todos os processos de imunização, mas que se manifesta, em geral, de uma maneira mais violenta, quando se emprega o processo da lanolina”.

Thibault¹⁷, em interessantes pesquisas, estudou as modificações histológicas determinadas pela inoculação subcutânea, em cobaias, de 4 misturas diferentes, a saber:

- 1.º — Caldo
Solução fisiológica
- 2.º — Anatoxina tetânica
Solução fisiológica
- 3.º — Solução fisiológica
Lanolina
Óleo de olivas
- 4.º — Anatoxina tetânica
Lanolina
Óleo de olivas

Suas conclusões baseadas no estudo histológico de cortes da zona inoculada foram as seguintes: a anatoxina injetada subcutaneamente em cobaias não determina reação histológica característica, pois a reação se assemelha à produzida pelo caldo simples que é banal, leve e efêmera, ao passo que as modificações produzidas pelas misturas oleosas são profundas, com grande proliferação do tecido conjuntivo, criando uma lesão duravel semelhante ao parafinoma ou ao vaselinoma.

Norman¹⁸, em 1934, empreendeu uma série de experiências nas quais estudou a influência das emulsões finamente divididas de óleos e gorduras sobre as toxinas bacterianas. Empregou para isso substâncias de origem vegetal, animal e mineral, como o óleo de oliva, parafina e o creme de leite, emulsionadas com goma acácia, estudando sua influência sobre a ação das toxinas produzidas pelos bacilos tetânico, diftérico, perfríngico e V. séptico.

Conclue o autor que as toxinas são adsorvidas pelas partículas oleosas e depois lentamente cedidas ao organismo e que quanto mais finas as emulsões, maior a proteção contra as doses letais das toxinas empregadas; a adição de substâncias que tornem as emulsões estáveis, garante a proteção contra as toxinas, assinalando por outro lado que o creme de leite não tinha nenhuma ação protetora. Referiu-se ainda às experimentações que vinha fazendo a respeito da possibilidade de imunização de animais por esse processo.

Walsh e Frazer¹⁹, independentemente do autor anterior, investigaram problemas semelhantes, inoculando em coelhos grandes doses de toxinas misturadas a emulsões de óleo de fígado de bacalhau e óleo de olivas, chegando às mesmas conclusões que Norman. Trabalhando com tuberculina verificou que a mesma, misturada com emulsão de óleo de olivas não produzia reação alguma em doentes de tuberculose que reagiam nitidamente com quantidades muito menores da mesma tuberculina, inoculada sem a referida proteção oleosa.

Em colaboração com Falchetti, Ramon²⁰ investigou o efeito da inoculação dos esporos do bacilo do carbúnculo envolvidos ou não na mistura óleo-lanolina.

De suas pesquisas concluíram os autores que os germes adicionados de lanolina se desenvolvem *in loco*, não passando nem para o sangue, nem para os órgãos internos, mas produzem, sem dúvida, uma substância que, modificada pelos elementos inflamatórios locais, confere ao organismo a imunidade contra a infecção.

Por outro lado sabe-se que a infecção carbunculosa no homem é tanto menos grave quanto maior é a reação que se processa no ponto de inoculação.

No cão, animal refratário ao carbúnculo, observa-se no local da injeção a formação de abcesso onde a fagocitose é intensa.

Nos animais sensíveis à infecção carbunculosa, pelo contrário, o que se nota é a formação de abundante exsudato gelatinoso, muito pobre em leucócitos e rico em germes que invadem rapidamente o organismo.

De tudo que acima ficou exposto, devemos concluir pois que é na intensa reação inflamatória local, na qual se observa o aparecimento de forte leucocitose, que deve residir a exaltação do poder imunizante dos antígenos pelas substâncias não específicas.

CONCLUSÕES

1. Os títulos aglutinantes mais elevados foram verificados após a terceira e quarta inoculações.

2. A função da lanolina é tornar lenta a absorção dos antígenos, favorecendo a formação precoce de anticorpos.

3. É necessário observar um intervalo maior entre a primeira e a segunda inoculação quando se tratar de germes de poder tóxico elevado.

4. É condição essencial para a primeira inoculação empregar pequena quantidade de germes ou germes atenuados.

5. O processo empregado permite imunizar, com germes vivos e virulentos, pequenos animais de laboratório para diferentes finalidades.

SUMMARY

1. The highest agglutinant titers were observed after the third and fourth inoculations.

2. The lanoline exerts a retarding effect on the absorption of the antigens, favouring the premature formation of antibodies.

3. When working with highly toxic germs, it is necessary to separate the first and second inoculations by a longer interval.

4. It is absolutely necessary to use small quantities or attenuated germs for the first inoculation.

5. By this method it is possible to immunize, with living and virulent germs, small laboratory animals for different purposes.

REFERÊNCIAS

- 1 — RAMON, G. — 1925, *C. R. Soc. Biol.*, XCIII, 506; 1925, *C. R. Acad. Sciences*, CLXXXI, 157.
- 2 — ROUX, E. e YERSIN — 1889, *A. Inst. Pasteur*.
- 3 — MOIGNIC e PINOY — 1916, *C. R. Soc. Biol.*, 29, p. 201 e 352.
- 4 — DOCHEZ, A. R. — 1924, *J. A. M. A.*, 82, 729 ou 1924, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 21, 194.
- 5 — GLENNY, A. T., POPE, C. G., WADDINGTON, H. e WALLACE, U. — 1926, *J. Path. and Bacteriology*, XXIX, 38.
- 6 — RAMON, G., LEMÉTAYER, E. e RICHOU, R. — 1934, *C. R. Soc. Biol.*, 115; 1027; *ibid.*, 116, 823; 1935, *Revue d'Immunologie*, 1, 199.
- 7 — RAMON, G. e LEMÉTAYER, E. — 1935, *C. R. Soc. Biol.*, 119, 248.
- 8 — RAMON, G. — 1934, *C. R. Soc. Biol.*, 117, 952; 1934, *R. C. Acad. des Sciences*, 199, 985.
- 9 — RAMON, G. e STAUB, A. — 1936, *Revue d'Immunologie*, 2, 401.
- 10 — WEINBERG, M. e GUILLAUMIE, M. — 1935, *C. R. Soc. Biol.*, 119, 719.
- 11 — NICOLLE, CH. e LAIGRET — 1935, *C. R. Acad. des Sciences*, 201, 312 e 372.
- 12 — VELU, H. e ZOTTNER, G. — 19.., *C. R. Soc. Biol.*, 118, 225 e 1137.
- 13 — BELL, J. A. — 1941, *Public Health Reports*, 56, 31, 1535.
- 14 — RAMON, G. e ZOELLER, C. — 1926, *Bul. Acad. de Med.*, I, n.º 5, 95.
- 15 — MUTERMILCH S. — 1926, *C. R. Sos. Biol.*, 95, 945, 1018.
- 16 — NÉLIS, P. — 1938, *C. R. Soc. Biol.*, CXXVII, 6, 487.
- 17 — THIBAUT, P. — 1936, *Revue d'Immunologie*, 2, 508.
- 18 — NORMAN MYERS, G. — 1934, *The Jour. of Hygiene*, 34, 250.
- 19 — WALSH, V. G. e FRAZER, A. C. — 1934, *British Med. Jour.*, I, 557.
- 20 — RAMON, G. e FALCHETTI, E. — 1935, *C. R. Soc. Biol.* 119, 1077.

COMPARAÇÃO ENTRE A CENTRIFUGAÇÃO DE UMA HORA E O EMPREGO DO CLOROFÓRMIO E ALUMEN DE POTÁSSIO NO DIAGNÓSTICO DAS MENINGITES TUBERCULOSAS

AUGUSTO DE E. TAUNAY

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

É o achado do bacilo de Koch no líquido céfalo-raquidiano o ponto principal no qual se baseia o diagnóstico bacteriológico das meningites tuberculosas. Todo esforço deve ser feito no sentido de experimentar novos métodos que facilitem tal diagnóstico, porque até agora não existe nenhum processo de valor absoluto.

Tivemos como fito principal, no presente trabalho, comparar os resultados obtidos com os processos de rotina deste Instituto em relação com aqueles nos quais empregamos o alumen de potássio e o clorofórmio como métodos de enriquecimento.

Habitualmente centrifugamos o líquido céfalo-raquidiano a 3.000 rotações por minuto pelo espaço de uma hora. Com o sedimento fazemos algumas preparações que depois de coradas pelo método de Gabbet são examinadas, considerando-se o exame como negativo somente depois de percorrer cuidadosamente todas as preparações. A parte restante do sedimento, depois de misturado com parte do líquido que foi decantado, é semeada em meios de Löwenstein, agar sangue de coelho e agar chocolate, sendo os tubos guardados na estufa durante três meses, findo os quais, se não houver crescimento de colônias típicas do bacilo de Koch, a cultura é dada como negativa. Em todo líquido em que há formação de uma rede de fibrina costumamos fazer preparações da mesma, que são coradas pelo mesmo processo e também cuidadosamente examinadas.

Bruno Rangel Pestana (1) demonstrou a vantagem de se empregar tal técnica, motivo pelo qual continuamos a usá-la com bons resultados como veremos mais adiante. J. Hanks e H. Feldman (2) em trabalho recente aconselham o emprego do alumen de potássio e do clorofórmio que, aumentando a concentração dos bacilos de Koch, facilitam seu achado, seja pela cultura ou pelo exame direto. A

técnica usada por nós foi a mesma descrita pelos autores citados, a qual vamos transcrever:

EMPREGO DO CLOROFÓRMIO PARA EXAME DIRETO

- 1.º — Para cada 2 cc. de líquido céfalo-raquidiano, juntar 0,05 cc. ou 4 gotas de clorofórmio agitando a mistura fortemente durante 10 minutos.
- 2.º — Centrifugar em alta rotação cinco minutos, separar o líquido que sobrenada.
- 3.º — Fazer esfregaços com todo sedimento que será fixado pelo calor. Corar pela fucsina fenicada, decorar. Conforme a densidade dos esfregaços empregar como contraste o azul de metileno ou ácido pícrico.

MÉTODO DA FLOCULAÇÃO PELO ALUMEN PARA CULTURA

- 1.º — Para 2 cc. de líquido céfalo-raquidiano juntar 0,25 cc. de uma solução esteril de alumen de potássio a 1%. Agitar fortemente durante dez minutos.
- 2.º — Centrifugar durante cinco minutos e depois separar o líquido que sobrenada.
- 3.º — Semear o sedimento em 3 a 5 tubos contendo meios de cultura apropriados. No nosso caso foi feita a semeadura em meio de Löwenstein.

Em 34 casos suspeitos de meningite tuberculosa nos quais comparamos os resultados obtidos pela centrifugação de uma hora com os do enriquecimento pelo clorofórmio, os resultados foram os seguintes:

Positivos no clorofórmio	3 — 8,8%
Positivos na centrifugação de uma hora	14 — 41,1%
Negativos	17 — 50,0%

Em 13 dos 17 casos negativos pudemos confirmar o diagnóstico de meningite tuberculosa pela cultura.

Em 27 culturas positivas para o bacilo de Koch os resultados foram os seguintes:

Culturas positivas usando alumen de potássio	3
Culturas positivas com o método de rotina ..	3
Culturas positivas com os dois métodos	21

De um modo geral os resultados são idênticos, mas se considerarmos que usamos somente o meio de Löwenstein para o material no qual foi feito o enriquecimento pelo alumen, devemos dar preferência para esse processo. A concordância foi devida unicamente ao emprego dos meios de agar sangue de coelho e agar chocolate.

Se compararmos separadamente os resultados positivos com o meio de Löwenstein no qual semeamos o líquido céfalo-raquidiano após centrifugação de uma hora e o sedimento obtido pela floculação do alumen verificamos o seguinte:

Culturas positivas com sedimento da centrifugação de uma hora	4
Culturas positivas com sedimento da floculação do alumen	9
Culturas positivas em ambos	11

o que dá uma positividade de 62% para o primeiro método e de 83% para o segundo.

Assim sendo consideramos não haver vantagem em se empregar o clorofórmio como método de enriquecimento na pesquisa direta do bacilo de Koch no líquido céfalo-raquidiano. A floculação pelo alumen traz sem dúvida uma vantagem grande, mas achamos que o sedimento obtido deve ser semeado em diferentes meios de cultura para que seu emprego apresente real vantagem.

Agradecemos a D. Lídia C. de Carvalho e D. Lígia Penteado que nos auxiliaram na parte técnica deste trabalho.

RESUMO

Foi feita a comparação entre a centrifugação de uma hora, o enriquecimento pelo clorofórmio e a floculação pelo alumen de potássio no diagnóstico das meningites tuberculosas.

O emprego do clorofórmio não apresentou vantagem. A floculação pelo alumen de potássio mostrou-se superior à centrifugação direta quando se deseja semear o material a ser examinado.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BRUNO RANGEL PESTANA, 1941, *Rev. do Instituto Adolfo Lutz*, vol. 1, n.º 1, pg. 40.
- 2 — JOHN H. HANKS e HARRE A. FELDEMAN, 1940, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 25, pg. 886.

COMPORTAMENTO SORÓLOGICO DA “*SHIGELLA ALCALESCENS*”

AUGUSTO DE E. TAUNAY

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

e

MARIA JOSÉ FARACO

Tecnica de laboratório do Instituto Adolfo Lutz

A *Shigella Alcalescens* sendo um germe frequentemente encontrado nas fézes e as vezes de difícil caracterisação sorológica, por serem em geral germes pouco aglutinogênicos e mesmo pouco aglutináveis nos auto-soros, como assinalam diversos autores. Arlindo de Assis (1) em trabalho recente fazendo reações de aglutinação de algumas amostras, verificou ainda comportamento variavel dentro do próprio grupo, admitindo a possibilidade em se fazer uma classificação sorológica semelhante a do grupo Flexner.

Ao prepararmos soros aglutinantes necessarios ao nosso trabalho, deparamos com alguns fatos que nos induziram a fazer diversas reações de aglutinação, usando técnicas diferentes com o fim de verificar qual seria a melhor. Preparamos 4 soros aglutinantes em coelhos usando as seguintes amostras: *Shigella Alcalescens* 1601 — Andrews e Towne recebida do Instituto Lister, *Shigella Alcalescens* 53 e 648 fornecidas pelo Dr. Arlindo de Assis e *Shigella Alcalescens* 129 isolada em nosso laboratório.

Os animaes foram injetados em dias alternados sendo a primeira inoculação no peritonio e as restantes na veia, num total de oito, usando-se germes mortos para as quatro primeiras. Cinco dias após a última inoculação foi feita sangria exploradora constatando-se que sómente os sôros dos animais injetados com a raça A 53 apresentavam bom título aglutinante quando as reações eram feitas na estufa a 37°. Modificando a temperatura ou tratando pelo calor ou álcool, mas fazendo-se a reação na mesma temperatura, os

resultados foram completamente outros, como pode-se verificar pelo quadro abaixo.

<i>Amostras usadas</i>	<i>Germes autoclavados aglutinação 37°</i>	<i>Germes vivos aglutinação 56°</i>	<i>Germes vivos aglutinação 37°</i>	<i>Antígeno alcoólico aglutinação 37°</i>	<i>Germes formolados aglutinação 56°</i>
Sh. al 1.601	6.400	6.400	50	6.400	100
Sh. al 53	6.400	6.400	3.200	6.400	6.400
Sh. al 648	6.400	6.400	100	3.200	1.600
Sh. al 129	3.200	1.600	0	1.600	0

NOTA — Os numeros representam os titulos dos soros.

Diante destes resultados, com 28 amostras de *Sh. alcalescens* existentes em nosso laboratório analisamos o que se passava quando modificavamos a técnica empregada na reação. Para cada amostra bacteriana fizemos aglutinações com germes vivos, cultura em gelóse de 24 horas, nas temperaturas de 37° e 56° em estufa. Germes autoclavados uma hora a vapor fluente, tratados pelo álcool conforme a técnica descrita por Bien (2) para o bacilo tífico, aglutinação em estufa a 37° e com germes mórto pelo fórmol a 0,2%, aglutinação em estufa a 56°. O tempo de incubação foi sempre de 24 horas e a leitura feita em boas condições de iluminação usando-se lente quando necessário. As suspensões bacterianas continham de 400 a 500 milhões de germes por centimetro cubico e as diluições do soro variaram de 1/50 a 1/1600.

O quadro demonstra os resultados obtidos com os diferentes tipos de reação:

TÍTULOS DAS AGLUTINAÇÕES COM AS DIFERENTES
MODALIDADES DE REAÇÕES

N.º	Especies	Germes autoclavados aglutinação 37º				Germes vivos aglutinação 56º				Germes vivos aglutinação 37º				Antígeno alcoolico aglutinação 37º				Antígeno formado aglutinação 56º			
		A-1601	A-53	A-648	A-129	A-1601	A-53	A-648	A-129	A-1901	A-53	A-648	A-129	A-1601	A-53	A-648	A-129	A-1601	A-53	A-648	A-129
1	D -- 667	1600	1600	1600	100	800	800	400	200	0	0	0	0	1600	1600	1600	1600	100	1600	50	50
2	D -- 363	1600	1600	1600	400	400	1600	100	100	0	0	0	0	1600	1600	1600	800	100	100	400	0
3	D -- 299	1600	1600	800	800	800	1600	100	100	0	0	0	0	100	1600	1600	1600	400	100	100	50
4	D -- 746	1600	1600	400	1600	400	800	200	200	50	0	0	0	1600	1600	800	200	100	1600	400	0
5	D -- 441	800	1600	1600	800	200	1600	200	200	0	0	0	0	2600	1600	400	1600	100	1600	200	50
6	D -- 843	1600	1600	1600	400	400	1600	100	100	100	0	0	0	1600	1600	400	400	200	100	0	100
7	D -- 504	1600	1600	1600	400	800	1600	200	100	0	0	0	0	1600	1600	200	1680	—	—	—	—
8	D -- 90	1600	1600	1600	400	800	1600	490	400	0	0	0	0	800	800	100	400	200	200	0	100
9	D -- 470	800	1600	1600	400	200	1600	200	200	0	0	0	0	1600	1600	1600	1600	100	100	100	50
10	D -- 602	1600	1600	1600	800	800	1600	800	400	1600	1600	1600	490	200	1600	400	100	1600	1600	1600	800
11	D -- 437	1600	1600	800	1600	800	1600	400	400	1600	1600	1600	400	1600	1600	1600	400	200	0	800	800
12	D -- 190	1600	1600	1600	800	800	1600	100	100	1600	1600	800	—	1600	1600	200	800	200	1600	800	400
13	D -- 234	1600	1600	1600	1600	800	1600	400	800	1600	1600	400	400	1600	1600	1600	400	800	1600	800	100
14	D -- 262	1600	1600	1600	400	1600	1600	400	400	800	1600	400	800	1606	1600	1600	1600	800	1600	800	800
15	D -- 502	800	1600	800	200	1600	200	100	50	50	0	0	0	1600	1600	1600	400	1600	1600	800	0
16	P -- 312	1600	1600	800	1600	—	1600	—	—	0	0	0	0	1600	1600	1600	1600	200	1600	800	50
17	P -- 340	1600	1600	1600	200	100	200	100	50	50	0	0	0	1600	1600	1900	400	1600	1600	800	0
18	P -- 51	1600	1600	1600	400	0	1600	50	0	0	0	0	0	1600	1600	200	800	400	1600	200	0
19	P -- 260	800	1600	800	200	1600	1600	800	800	800	0	800	400	1600	800	800	800	800	1600	800	1600
20	P -- 479	1600	1600	1600	400	0	0	0	0	0	0	0	0	1600	1600	200	800	800	1600	100	0
21	P -- 445	1600	1600	1600	400	800	1600	400	100	400	0	100	200	1600	800	1600	800	50	1600	200	0
22	P -- 512	1600	1600	1600	800	50	0	100	50	0	0	0	0	1600	1600	200	800	800	200	100	200
23	P -- 152	1600	1600	1600	400	0	0	0	0	0	0	0	0	1600	1600	1600	100	1600	1600	800	0
24	P -- 601	1600	1600	1600	400	50	0	100	50	0	0	0	0	1600	1600	400	800	—	—	—	—
25	D -- 649	800	0	1600	1600	0	0	100	100	0	0	0	0	400	200	1600	1600	—	—	—	—
26	D -- 530	800	0	1600	1600	400	0	1600	1600	50	0	100	100	400	200	1600	1600	100	0	1600	400
27	D -- 75	800	0	1600	1600	400	0	50	50	50	0	50	50	400	100	1600	1600	100	0	1600	1600
28	P -- 133	200	0	1600	1600	400	0	1600	1600	0	0	50	50	400	100	1600	1600	100	0	50	400

NOTA — Os numeros usados no cimo das colunas representam os germes empregadas na preparação dos soros.

Analisando-se o quadro, verificamos fato parecido ao já observado, isto é, maior uniformidade e títulos aglutinantes mais altos, quando a reação foi feita com germes autoclavados ou tratados pelo álcool. A não ser as quatro últimas amostras que, só aglutinaram com todos os soros quando tratados pelo álcool, de um modo geral os resultados são semelhantes quanto a regularidade de reações positivas.

Com a aglutinação a 56° de germes vivos, os resultados também foram bons mas duas amostras deixaram de aglutinar em todos os soros e as vezes a aglutinação se processou sómente em diluições baixas. Quando a temperatura usada foi de 37°, cerca de 50% das amostras deixaram de aglutinar com todos os soros. Com germes formolados os resultados também foram bastante desiguais.

Na Standard Methods (3) a temperatura indicada para reações de aglutinação com germes do grupo entérico é a de 48° a 52°, parece nos entretanto que para este grupo particular é preferível autoclavar os germes ou tratá-los pelo álcool. A princípio imaginamos que com esse tratamento haveria uma alteração muito grande nos corpos bacterianos que poderia diminuir a especificidade da reação mas os seguintes fatos provam ao contrário.

Em duas amostras, P.479 e P.152 que não aglutinaram a 37° e a 56° com nenhum soro, fizemos a absorção de aglutininas do soro A.53 empregando germes autoclavados. Fazendo reação com o soro absorvido mais a raça homóloga, verificamos que tinha havido absorção completa das aglutininas.

Usando diversas raças de *Sh. dysenteriae*, *Sh. ambigua*, *Sh. paradysenteriae* e de *Ebbertela typhosa* que tinham sido autoclavadas uma hora a vapor fluente, mais soro A 53, não houve o menor indicio de aglutinação em nenhum dos tubos. Com as amostras já estudadas, mais soro Sonne, obtivemos reações positivas com 6 amostras nos títulos de 1/50 a 1/400, que podem muito bem correr por conta de aglutininas secundárias, existentes no soro. Assim sendo, a ação do álcool e do aquecimento em autoclave, talvez por alterar a disposição do mosaico antigênico do germe, facilitem a ação do soro sobre o germe obtendo-se resultados mais uniformes. Em pesquisas que continuam sendo feitas, preferimos usar o calor em vez do álcool pela maior simplicidade, se bem que o segundo apresente resultados mais uniformes.

Somos gratos ao Snr. Bruno Rangel Pestana pelas indicações fornecidas durante a realização de nossas pesquisas.

RESUMO

Fazendo diferentes modalidades de reações de aglutinação com germes do grupo *Sh alcalescens*, verificaram os autores, resultados mais uniformes quando estes são autoclavados uma hora a vapor corrente ou tratados pelo álcool.

A especificidade das reações não fica em nada alterada, como pensam terem demonstrado em algumas provas feitas.

BIBLIOGRAFIA

ARLINDO DE ASSIS — "O Hospital" — 1939 — 655 — 15.

BIEN — 1924 — Cent. f. Bakt. XLIII — 196.

Standard Methods — A. B. Wadsworth — pg. 509 — 1939. — The Williams Wilkins.

MEIOS DE CULTURA ECONÔMICOS PREPARADOS PELA DIGESTÃO TRÍPTICA DA CARNE, SEGUNDO HOTTINGER

ETTORE RUGAI

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

Péré, em 1892, demonstrou o valor da caseína digerida pela tripsina, como meio de cultura para a produção de indol pelo bacilo coli.

Peckham, em 1893, usando carne em vez de caseína, confirmou os trabalhos de Péré.

Entretanto, foi Hottinger que, em 1912, após estudos mais amplos, divulgou o uso do produto total da digestão tríptica da carne, em diluição conveniente, para substituir o caldo comum. Por isso, esse meio é conhecido hoje, como Caldo pancreático de Hottinger.

Posteriormente, vários autores preparavam meios semelhantes: Dalimier, 1913; Douglas, 1914; Cole e Onslow, 1916; Cunningham, 1918; Norris, 1918-19-20; Angerer, 1921; Hermann, 1934.

Angerer que recebera de Heim a incumbência de preparar um meio de cultura econômico, em face das dificuldades por que passava a Alemanha após a guerra de 1914, encontrou no meio de Hottinger a solução plena do problema. Verificou, ainda, que a carne de peixe pode substituir a de vaca.

Hermann usou testículos do touro para provas de fermentação, por serem pobres em açúcar e produzirem um meio incolor que permite observar, com facilidade, a viragem do indicador.

Os autores citados descreveram meios visando a cultura de germes pouco exigentes; em geral do grupo coli-tifo-paratífico. São meios mais ou menos especializados. Não se pode, por esse motivo, sem outros estudos, lançar mão deles para usos gerais de laboratório. Exceção feita, todavia, dos trabalhos de Angerer que incluiu germes mais delicados — estreptococos, pneumococos, diftéricos. E isto é muito importante porque, os meios à base de digestos trípticos são ricos em aminoácidos que constituem arma de dois gumes. Fonte preciosa de nitrogênio e de assimilação fácil, estimulam a mul-

tiplicação dos germes; mas ultrapassados certos limites de concentração, tornam-se tóxicos, principalmente para os germes mais sensíveis acima citados. É o que demonstraram Wyon e McLeod em 1923 e Gordon em 1923-26. É surpreendente, dizem aqueles autores, que os que propõe digestos trípticos para meios de cultura não se refiram ao poder inibente dos aminoácidos.

O momento oportuno para se interromper a digestão não foi muito considerado. É porem indispensável; seja para garantir o crescimento de maior número possível de espécies bacterianas, seja para estandarização do meio.

Hottinger acompanha o andamento da digestão pela pesquisa do triptófano com água bromada. Manda digerir até determinada intensidade da reação, conforme o fim que se tem em vista. Esta reação tem valor como qualitativa e não pode, portanto, indicar com precisão o grau de digestão. Resulta deste fato que as diversas partidas de meios podem apresentar muita diferença entre si.

Angerer, baseando-se no poder tampão dos aminoácidos, avalia o grau de digestão pela quantidade de solução N/10 de HCl necessária para baixar o pH do ponto de viragem da fenolftaleína ao ponto de viragem do vermelho de metila. Não indica, porém, o momento ótimo para cortar a digestão.

Mais preciso é o método de dosagem dos aminoácidos por meio do formol, segundo Sörensen. É o método que adotamos no presente trabalho.

A digestão tríptica da carne também foi empregada para produção de toxina diftérica, com bons resultados, por: Hartley, 1922; Watson e Wallace, 1923; Watson e Langslaff, 1927; Gibs e Rettger, 1927; Pope e Smith, 1932; Pope e Healey, 1933; Pope e Linggood, 1939; Linggood, 1939-41.

Considerando as vantagens técnico-econômicas que o meio de Hottinger oferece, empreendemos estudos no sentido de verificar si é possível o seu emprego em substituição ao caldo e agar comuns. Após inúmeras provas e algumas modificações, conseguimos o nosso desideratum.

O meio é de grande interesse porque dispensa as peptonas comerciais e reduz grandemente a quantidade de carne que seria necessária para preparar igual quantidade de caldo ou agar comuns.

Antes de entrarmos na parte técnica julgamos de interesse comentar os seguintes tópicos:

1) Fermento digestivo: à pancreatina comercial, de atividade variável e as vezes negativa, preferimos usar a mistura de diver-

os pâncreas de porco, cuja atividade é sempre garantida e mais uniforme. Cunningham usa o pâncreas de carneiro e cabra.

Não se deve usar o pâncreas muito fresco porque, encerrando a tripsina ainda sob a forma de tripsinogênio, é de pouca atividade. A conservação em geladeira durante alguns dias aumenta muito sua atividade pela libertação do enzima proteolítico.

2) Momento oportuno para interromper a digestão: a ação do fermento tríptico é acompanhada pela dosagem dos aminoácidos pelo método do formol, de Sörensen. O resultado é expresso em centímetros cúbicos de solução normal de soda ou em miligramas de nitrogênio amínico por cento. Quando a concentração dos aminoácidos atingir ao valor correspondente a 25-28 cc. de soda normal ou a 0,350 a 0,392 mlgr. de nitrogênio por cento, deve-se interromper a digestão. (Estes dados têm valor para a relação de 1 quilo de carne e 1.500 cc. de água conforme a técnica adiante descrita).

E' necessário observar este limite para garantir o crescimento de estreptococos, pneumococos e diftéricos, germes estes sensíveis à concentrações muito elevadas de aminoácidos.

Os germes do grupo coli-tifo-paratifo-disentérico, desenvolvem-se abundantemente mesmo quando aquele limite atingir a 40 ou mais cc. de soda normal.

Menção especial merece o bacilo tífico, para o qual o meio de digestão bem avançada é de grande valor.

3) Interrupção da digestão: O aquecimento para interromper a digestão deve ser feito em banho Maria ou em autoclave a vapor corrente. (O aquecimento direto altera as propriedades nutritivas do meio), e em pH 6.0. Neste pH além de ser mais fácil a filtração e clarificação da solução, são libertados os ácidos gordurosos insolúveis, dos sabões alcalinos solúveis que se formaram da gordura do pâncreas e da carne com o álcali. A filtração deve ser feita em papel molhado e após completo resfriamento do líquido para eliminação mais fácil desses ácidos.

A alta toxidez dos sais sódidos dos ácidos olêico, linolêico e linolinêico, para os pneumococos, conforme foi demonstrado por Lamar, 1911 e Falk e Yang, 1926, e as nossas próprias observações, justificam plenamente a técnica que indicamos.

4) Estandartização: Não é possível em duas operações de digestão, mesmo quando executadas em condições aparentemente idênticas, chegar-se a um resultado perfeitamente igual. Daí a

necessidade de estandarização para que as diversas partidas de meio sejam, quanto possível, uniformes. Para esse fim, adotamos o método proposto por Ashenshow que, pela simplicidade, está ao alcance de qualquer laboratório.

E' baseado na dosagem da matéria orgânica pelo permanganato de potássio. O resultado é expresso em gramas de oxigênio por cento.

Quanto maior fôr a quantidade de albumina digerida, maior quantidade de oxigênio será absorvida. Este valor nos indicará em que diluição será usada a solução mãe, para se obter um meio que encerre sempre a mesma riqueza em matéria orgânica.

Para casos especiais — pesquisa de indol, pesquisa de pigmentos — a diluição da solução mãe pode ser até de 1 para 50 ou mais, com relação ao peso da carne digerida.

Para o nosso caso porém, que deve conciliar vários problemas, a diluição varia entre 1:12 e 1:15, conforme correu a digestão. Estabelecemos para o caldo e para o agar a concentração de 0,8% em matéria orgânica computada em oxigênio.

Por parte dos compostos resultantes da clivagem das albuminas — albumoses, peptonas, polipeptídios e aminoácidos, — a diluição poderia ser bem mais elevada sem prejudicar as qualidades nutritivas do meio. O mesmo não acontece porém, com as substâncias extrativas da carne — Xantina, hipoxantina, carnina, carnosina, creatina, arginina, guanidina, metil-guanidina, glicose, inosita, vitaminas, compostos orgânicos de fósforo, etc., que não aumentam pelo processo digestivo, atingindo logo os limites mínimos de concentração, importante sob o duplo aspecto: fisiológico, pelo valor nutritivo que apresentam alguns elementos, como demonstraram Armand-Delille e outros, 1912; Meyer e Schoeffer, 1919; e Mueller, 1922; e físico-químico, pela ação da tamponagem.

TÉCNICA PARA PREPARAÇÃO DO MEIO

1) Digestão da carne:

1. carne	1.000,0 gr.
2. água destilada	1.500,0 ml.
3. carbonato de sódio anidro	8,0 gr.
4. pâncreas de porco	150,0 gr.

Cortar a carne em pedaços do tamanho de um dedo. Mergulhá-la, aos poucos, nos 1.500 ml. de água fervente. Esperar a

fervura romper suavemente, mantendo-a 5 minutos, para destruir os fermentos antitripticos. Separar a carne picá-la à máquina. Misturar com água de fervura e colocar tudo em um balão de 2 litros. Arrefecer. Ajuntar o carbonato de sódio e o pâncreas livre de gordura o mais possível e reduzido a polpa. Ajuntar 15 cc. de clorofórmio e 10 cc. de toluol. Agitar energicamente. Encubar a 37°C.. Agitar frequentemente, durante a digestão.

O tamanho dos pedaços de carne vai diminuindo conforme avança a ação do fermento.

Atingida a concentração desejada em aminoácidos, forma-se um líquido amarelado sobre-nadando um resíduo pulverulento, constituído por substâncias indigeríveis.

Decorridas 20 horas de digestão, faz-se a dosagem dos aminoácidos pelo método de Sörensen, como segue:

Tomar 25 ml. de líquido e acidificar com uma gota de ácido acético glacial, colocar em um tubo 18x180, aquecer em banho Maria 10 minutos, Filtrar em papel. Em um balão de Erlenmeyer, colocar:

1. líquido filtrado	10,0 ml.
2. água destilada	15,0 ml.
3. Fenolftaleína, sol. alcoólica a 1% ..	3 gotas

Neutralizar com solução normal de soda até coloração levemente rósea e ajuntar 10 ml. da diluição em partes iguais de formalina e água destilada (solução de formol do comércio que encerra de 36-38% de HCOH), também neutralizada com solução normal de soda em presença de fenolftaleína até coloração rósea.

Feita a mistura, a cor rósea desaparece em face da acidez que se desenvolve pela combinação entre o aldeído e os grupos amínicos dos aminoácidos, destruindo-lhes a função "básica" característica com subsequente exaltação da função "ácido".

Por meio de uma bureta graduada ajunta-se agora uma solução N/10 de soda, até voltar a cor rósea primitiva. Anotar o nº de cc. de reativo empregado. Si o valor for inferior a 25, continua-se a digestão e si estiver entre 25-28, deve-se interrompê-la.

2) Interrupção da digestão:

Acidificar a mistura com solução normal de HCl até ao pH 6.0. Aquecer em banho maria ou em autoclave a vapor fluente 15 minutos. Esfriar completamente. Filtrar em papel previamente molha-

do. Filtra um líquido amarelo-esverdeado, pronto para dosagem da matéria orgânica e que constitue a solução mãe para os meios de cultura.

3) Dosagem da matéria orgânica:

Em balão de Erlenmeyer de 250 ml. colocar:

1. Solução mãe diluída a 10%	1,0 ml.
2. Água destilada	50,0 ml.
3. Sol. de ácido sulfúrico a 25%	10,0 ml.
4. Sol. N/10 de permanganato de potássio	15,0 ml.

Aquecer em banho maria fervente 30 minutos. Retirar do banho e ajuntar 15,0 ml. de solução N/10 de ácido oxálico. A cor aroxeadada da solução desaparece. Aquecer a 70-80°C. e por meio de uma bureta graduada gotejar solução N/10 de permanganato de potássio até aparecimento de cor rósea persistente. O número de centímetros cúbicos de permanganato empregados multiplicado por 0,8, dará a matéria orgânica por cento expressa em oxigênio.

Damos em seguida as propriedades de uma das partidas de solução mãe que preparamos partindo de 1 Kl. de carne:

Volume	1.800 cc.
Côr — amarelo-esverdeado.	
Cheiro — agradável.	
Aspécto — límpido quando recentemente preparado (com o tempo turva-se pela cristalização da tirosina).	
Densidade — 1038.	
Reação do triptófano — positiva (forte).	
Meia saturação com sulfato de amônio — turvação.	
Saturação completa com sulfato de amônio — pequeno precipitado.	
Aminoácidos em cc. de solução de soda normal — 26%.	
Matéria orgânica em gramas de oxigênio — 5,33%.	
Extrato seco a 100°C. 2 horas — 9,5%.	

Esta solução pode ser guardada em frascos estéreis, em presença de clorofórmio e em sítio fresco, anotando-se o volume e o título, para ser usada conforme a necessidade.

Para preparar um meio com determinada porcentagem de matéria orgânica, podemos lançar mão da fórmula geral:

$$V \div \frac{T}{t} = x$$

onde V é o volume do meio desejado, T o título da solução mãe em matéria orgânica, t é o título desejado para o meio e x é o volume a se tomar. Portanto, com a solução acima mencionada teremos:

$$1000 \div \frac{5.33}{0,8} = 150 \text{ ml. de solução, para um litro e}$$

meio com 0,8% em matéria orgânica.

Com um quilo de carne que nos deu 1.800 ml. de solução, podemos preparar:

$$\frac{5.33 \times 1.800}{0,8} = 11.992 \text{ ml. de caldo ou agar.}$$

PREPARAÇÃO DOS MEIOS

C A L D O

1. Solução mãe q.s.p.	0,8% em mat. org.
2. Fosfato dipotássico	1,0 gr.
3. Cloreto de sódio	7,0 gr.
4. Água destilada q.s.p.	1000,0 ml.

pH 7.6. — Esterilização 25' a 115°C.

- Tomar a quantidade de solução mãe calculada pela fórmula acima mencionada.
- Completar 1.000 ml. com água destilada.
- Ferver 10 minutos para eliminar o clorofórmio.
- Ajuntar o cloreto e o fosfato di-potássico.
- Ajustar ao pH 7.6.
- Ferver 5 minutos.
- Filtrar. Completar 1.000 ml.
- Distribuir conforme a necessidade.
- Esterilizar 25 minutos a 115°C.

A G A R

1. Solução mãe q.s.p.	0,8% de mat. org.
2. Fosfato di-potássico	1,0 gr.
3. Cloreto de sódio	7,0 gr.
4. Água destilada q.s.p.	1000,0 ml.
5. Agar	25,0 gr.

pH 7.6. Esterilização 25' a 115°C.

- a) Seguir a técnica da preparação do caldo até o tempo e) inclusive.
- b) Ajuntar o agar.
- c) Autoclavar 25 minutos a 120° C.
- d) Filtrar em algodão. Completar 1.000 ml.
- e) Distribuir conforme a necessidade.
- f) Esterilizar 25 minutos a 115° C.

VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE DOS MEIOS

Estes meios foram estudados comparativamente com o caldo e agar comuns, preparados com peptona de carne "Merck", seca. O caldo foi preparado com a infusão da carne residual da infusão concentrada.

CALDO

O crescimento nos meios líquidos foi avaliado por nefelometria com o auxílio da escala de Mac Farland. Incubação de 24 horas a 37°C. com exceção das brucelas que foram incubadas 72 horas. O quadro I expressa os resultados.

QUADRO I

CRESCIMENTO EM CALDO COMUM E CALDO HOTTINGER

ESPÉCIE BACTERIANA	CRESCIMENTO EM CALDO	
	comum	Hottinger
<i>E. typhosa</i> — 4446 — Inst. Lister	7 (1)	8
<i>E. typhosa</i> — 901-H — Inst. Lister	7	8
<i>E. typhosa</i> — 1586 — Isolada de hemocultura neste Instituto	8	8
<i>E. typhosa</i> — 1615 — Isolada de hemocultura neste Instituto	6	7
<i>S. paratyphi</i> — Kauffman	3	4
<i>S. Schottmülleri</i> — Inst. Lister	4	4
<i>S. dysenteriae</i> — amostra Parkar — Inst. Lister	3	4
<i>S. dysenteriae</i> n.º 49 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. dysenteriae</i> n.º 102 — Isolada neste Instituto ..	3	4
<i>S. dysenteriae</i> n.º 103 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. dysenteriae</i> n.º 547 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra Oxford — Inst. Lister	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra Willesden — Inst. Lister	5	6

ESPÉCIE BACTERIANA	CRESCIMENTO EM CALDO	
	comum	Hottinger
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra n.º 34 — Isolada neste Instituto	5	5
<i>S. paradysenteriae</i> (Flexner) amostra n.º 513 — Isolada neste Instituto	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Y. Hiss) amostra Northampton — Inst. Lister	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Y. Hiss) amostra n.º 70 — Isolada neste Instituto	3	4
<i>S. paradysenteriae</i> (Y. Hiss) amostra n.º 24 — Isolada neste Instituto	3	3
<i>S. ambigua</i> — 836 — Depart. Nacional de Saúde Pública	4	4
<i>S. ambigua</i> — 795 — Instituto Biológico	3	4
<i>S. ambigua</i> — n.º 83 — Isolada neste Instituto ..	3	3
<i>S. alcalescen</i> — grupo A — Dr. Arlindo de Assis	3	4
<i>S. alcalescen</i> — grupo B — Dr. Arlindo de Assis	3	4
<i>S. alcalescen</i> — n.º 362 — Isolado neste Instituto	4	5
<i>S. alcalescen</i> — n.º 133 — Isolado neste Instituto	4	4
<i>E. coli</i> — 77 — Isolada de fezes humanas, neste Instituto	6	7
<i>B. melitensis</i> — Isolado por Mazza — Argentina	1	1
<i>B. abortus</i> — recebido do Depart. Industr. Animal	1	1
<i>B. abortus</i> — amostra 456 — Wash. Hig. Laboratory	1	1
<i>B. suis</i> — recebido do Dr. Carini	2	2
<i>P. aviseptica</i> — 151 — Inst. Pasteur, Paris	3	3
<i>P. bovisseptica</i> — 1287 — Inst. Lister	3	3
<i>P. suisseptica</i> — 2417 — Inst. Lister	3	3
<i>P. leipseptica</i> — 2417 — Inst. Lister	3	3
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 23	2	2
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 25	2	2
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 30	2	3
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 16 — Isolado de hemo- cult. neste Inst. (2)	5	5
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 1108 — Isolado de hemo- cult. neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 1109 — Isolado de hemo- cult. neste Inst.	6	6
<i>Streptoc. hemolyticus</i> — 1068 — Isolado de hemo- cult. neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. scarlatinae</i> Dochez — Inst. Lister	3	3
<i>Streptoc. penfigo</i> — 58 — Isolado pelo Dr. B. M. Mourão	5	5
<i>Streptoc. penfigo</i> — 71 — Isolado pelo Dr. B. M. Mourão	3	3

ESPÉCIE BACTERIANA	CRESCIMENTO EM CALDO	
	comum	Hottinger
<i>Streptoc. pyogenes</i> — 4549 — Instituto Lister	3	3
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 1 — Isolado de hemocultura neste Inst.	4	4
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 2 — Isolado de amígdala neste Inst.	6	6
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 3 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 4 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	5	5
<i>Streptoc. viridans</i> n.º 5 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	4	4
<i>Streptoc. hemolyticus</i> n.º 6 — Isolado de cisto dentário neste Inst.	5	5
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Tipo I — Dep. of Health City New York	4	4
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Tipo II — Dep. of Health City New York	4	4
<i>Diplococcus pneumoniae</i> Tipo III — Dep. of Health City New York	4	5
<i>C. diptheriae</i> — Park Willians n.º 8	3	3
<i>C. diptheriae</i> n.º 44 — Isolado neste Instituto	3	3
<i>C. diptheriae</i> n.º 418 — Isolado neste Instituto ..	3	3
<i>C. diptheriae</i> n.º 409 — Isolado neste Instituto ..	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i> n.º 183 — Isol. de abcesso neste Instituto	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i> n.º 791 — Isol. de hemocult. neste Instituto	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i> n.º 512 — Isol. de meningite neste Instituto	5	4

O caldo de Hottinger revelou-se idêntico ou superior em 96,79% dos casos. Quando o caldo comum apresentou maior crescimento, ainda o desenvolvimento no caldo Hottinger não deixou a desejar.

(1) Os números correspondem aos números dos tubos da escala de McFarland, de sulfato de bário, dos quais mais se aproxima a turvação da cultura.

(2) Para estreptococos e pneumococos foram empregados meios com 1% de glicose, adicionada asseticamente.

PESQUISA DE INDOL

Como ficou demonstrado por Péré, o meio, pela riqueza de triptófano, é ótimo para prova do indol. A comparação foi feita com água peptonada preparada com peptona Park Davis e com triptona Difco. Incubação de 24 horas para os germes indológenos e de 5 dias para os anidológenos. Pesquisa de indol pelo método de Ehrlich.

QUADRO II

PESQUISA DE INDOL

	N. de amostras empregadas	Água peptonada c/ Pep. Park Davis	Água peptonada c/ Bacto triptona Difco.	Caldo de Hottinger	Concordância
<i>S. ambigua</i>	35	+	+	+	100%
<i>Pasteurelas</i> diversas — (av. bov. suis. lepis.)	51	+	+	+	100%
<i>E. coli</i>	70	+	+	+	100%
<i>S. alcalescen</i>	6	+	+	+	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Flexner"	4	—	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Flexner"	3	+	+	+	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Y Hiss"	5	—	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Y Hiss"	3	+	+	+	100%
<i>B. abortus melitensis suis</i> .	6	—	—	—	100%
<i>S. dysenteriae</i>	5	—	—	—	100%
<i>P. pseudotuberculosis</i>	4	—	—	—	100%

Houve concordância em 100% dos casos. As reações positivas foram sempre intensas após 24 horas e de intensidade nunca inferior às reações obtidas com a peptona Park Davis e triptona Difco.

PESQUISA DE MOVIMENTO DAS BACTÉRIAS

O movimento foi pesquisado após 24 horas de crescimento em temperatura ambiente.

O quadro III expressa os resultados.

QUADRO III

PESQUISA DE MOVIMENTO

ESPÉCIES BACTERIANAS	N. de amostras	Culturas em caldo		Concordância
		comum	Hottinger	
<i>E. typhosa</i>	50	+	+	100%
Salmonelas diversas	58	+	+	100%
<i>E. coli</i>	30	+	+	100%
Pasteurelas (av. bov. suis lep.)	46	—	—	100%
<i>S. dysenteriae</i>	5	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Flexner"	8	—	—	100%
<i>S. paradysenteriae</i> "Y Hiss"	11	—	—	100%
<i>S. ambigua</i>	33	—	—	100%

Os resultados foram completamente satisfatórios e concordantes em 100% dos casos.

Para o agar a comparação foi feita pela técnica da contagem em placas. Semeaduras feitas de diluições convenientes da cultura em caldo comum. Incubação de 24 horas a 37°C. com exceção das brucelas que foram incubadas 72 horas. O quadro IV. expressa os resultados.

QUADRO IV

CONTAGEM EM PLACAS DE AGAR COMUM E DE AGAR DE HOTTINGER

	CONTAGEM EM AGAR	
	comum	Hottinger
<i>E. typhosa</i> — 4446 — Inst. Lister	90	110
<i>E. typhosa</i> — 901-H — Inst. Lister	110	122
<i>E. typhosa</i> — 1576 — Isolado de hemocultura neste Instituto	70	81
<i>E. typhosa</i> — 1515 — Isolado de hemocultura neste Instituto	151	162
<i>S. Paratyphi</i>	72	75
<i>S. Schottmülleri</i>	94	96
<i>S. dysenteriae</i> Parker — Inst. Lister	87	90
<i>S. dysenteriae</i> 49 — Isolado neste Instituto ..	62	70
<i>S. dysenteriae</i> 102 — Isolado neste Instituto ..	203	210
<i>S. dysenteriae</i> 103 — Isolado neste Instituto ..	108	112

	CONTAGEM EM AGAR	
	comum	Hottinger
<i>S. dysenteriae</i> 547 — Isolado neste Instituto ..	120	128
<i>S. pardysenteriae</i> "Fleener" — Oxford — Inst. Lister	123	129
<i>S. paradysenteriae</i> "Fleener" — Willesden — Inst. Lister	110	120
<i>S. paradysenteriae</i> "Fleener" 34 — Isolada neste Instituto	93	97
<i>S. paradysenteriae</i> "Fleener" 513 — Isolada neste Instituto	68	72
<i>S. Paradysenteriae</i> "Y. Hiss" Northampon — Inst. Lister	215	223
<i>S. paradysenteriae</i> "Y. Hiss" 70 — Isolado neste Instituto	140	151
<i>S. paradysenteriae</i> "Y. Hiss" 24 — Isolado neste Instituto	94	93
<i>S. ambigua</i> — 836 — D. N. S. P.	183	147
<i>S. ambigua</i> — 795 — Inst. Biológico	62	71
<i>S. ambigua</i> — 83 — Isolada neste Instituto	72	81
<i>S. alcalescen</i> — grupo A — Dr. Arlindo de Assis	92	98
<i>S. alcalescen</i> — grupo B — Dr. Arlindo de Assis	115	130
<i>S. alcalescen</i> — 362 — Isolada neste Instituto ..	98	110
<i>S. alcalescen</i> — 133 — Isolada neste Instituto ..	140	162
<i>B. abortus</i> — recebido do Depart. de Industr. Animal	117	126
<i>B. abortus</i> — amostra 456 — Wash. Hyg. Lab. ..	72	60
<i>B. melitensis</i> — Isolado por Mazza — Argentina	63	50
<i>B. suis</i> — Recebido do Laboratório do Dr. Carini	110	96
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 23	56	60
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 24	128	136
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 25	117	122
<i>P. pseudotuberculosis</i> n.º 30	70	76
<i>Staphylococcus aureus</i> — 791 — Isolado neste Inst. de hemocultura	93	90
<i>Staphylococcus aureus</i> — 183 — Isolado neste Inst. de abcesso	120	130
<i>Staphylococcus aureus</i> — 512 — Isolado neste Inst. de meningite	110	118

Em 86,12% dos casos, o agar de Hotinger foi igual ou superior.

As Brucelas mostraram preferência pelo agar comum mas desenvolveram-se perfeitamente no agar de Hottinger.

A aglutinabilidade do bacilo tífico em presença do soro específico não sofreu alteração pela cultura em agar de Hottinger. A verificação foi feita após 22 passagens, com antígeno vivo e aquecido a vapor fluente 1 hora. Ver quadros V e VI:

QUADRO V

AGLUTINAÇÃO COM ANTÍGENO VIVO

AMOSTRA DE GERMES	TÍTULO DE AGLUTINAÇÃO COM GERMES CULTIVADOS EM AGAR:	
	<i>comum</i>	<i>Hottinger</i>
<i>E. typhosa</i> 901 — Inst. Lister	25.600	25.600
<i>E. typhosa</i> n.º 23 — Isolada neste Inst.	25.600	25.600

QUADRO VI

AGLUTINAÇÃO COM ANTÍGENO AQUECIDO

AMOSTRA DE GERMES	TÍTULO DE AGLUTINAÇÃO COM GERMES CULTIVADOS EM AGAR:	
	<i>comum</i>	<i>Hottinger</i>
<i>E. typhosa</i> 901 — Inst. Lister	6.400	6.400
<i>E. typhosa</i> n.º 23 — Isolada neste Inst.	3.200	3.200

Numerosas provas de crescimento em superfície foram feitas com todos os germes usados nas provas anteriores. O resultado nunca deixou a desejar. Vinte amostras de meningococos (culturas de estoque), desenvolveram-se bem no agar em 24 horas, sem adição de líquidos albuminosos.

Adicionado de 5% de sangue de coelho, o agar produz bom crescimento com estreptococos, pneumococos, gonococos, bacilo pertussis, bacilo de Pfeifer.

As provas de hemólise em placas não são prejudicadas.

CONCLUSÃO

O digesto triptico da carne pode ser empregado, com vantagens, tanto sob a forma líquida como sólida, para usos gerais de laboratório, em substituição ao caldo e agar comuns, desde que sejam observados certos detalhes de técnica que descrevemos na sua preparação.

Para a indústria farmacêutica é de incontestável valor na preparação de vacinas e buco-vacinas, pelo seu alto valor nutritivo e baixo custo.

RESUMO

1) O autor descreve a técnica para preparação do caldo e do agar de Hottinger e estabelece o método para a estandarização dos mesmos.

2) Verificou pela cultura de numerosas espécies bacterianas — *E. typhosa*, *S. paratyphi*, *S. Schottmülleri*, *S. dysenteriae*, *S. ambigua*, *S. paradysenteriae*, *S. alcalescens*, *C. diptheriae*, *B. abortus*, *B. militensis*, *B. suis*, *S. aureus*, *S. hemolyticus*, *S. viridans*, *D. pneumoniae*, *N. intracellularis*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *H. pertussis*, — que os meios tem grande valor nutritivo.

3) O meio líquido é ótimo para prova do indol.

4) A aglutinação da *E. typhosa* em presença de soro específico não sofreu alteração após 22 passagens em meio sólido.

5) Estes meios podem substituir com vantagem o caldo e o agar comuns.

SUMMARY

1) The A. described the technic of the preparation of the Hottinger's broth and agar, stablishing the method for their standardization.

2) By the cultivation of numerous species of bacteria he verified the media has high nutrient value.

3) The fluid medium is excellent for the indol test.

4) After 22 successive transfers on the solid medium, in presence of specific immune serun, the agglutination of the *E. typhosa* has not undergone alteration.

5) The media may, with advantage, replace the plain broth and agar.

AGRADECIMENTOS

Não queremos furtar-nos ao dever de agradecer: ao Dr. Bruno Rangel Pestana, pelo apoio que nos deu na execução deste trabalho; à D. Ruth de Lima Correa, pelas dosagens de matéria orgânica; ao Dr. B. M. Mourão pelas amostras de estreptococos que nos enviou por intermédio do Dr. Augusto Taunay; ao Dr. Ariosto Büller Souto, que nos cedeu as amostras de gonococos; e, ao pessoal técnico desta sub-seção de meios de cultura, pelo auxílio técnico que nos prestou.

BIBLIOGRAFIA

- ASHENSHOW, 1941, Canadian Publ. Health Journ., 32, 468.
 COLE, S. W. e ONLOW, H., 1916, The Lancet, 2, 9.
 CUNNINGHAM, J., 1918, Ind. Med. Journ. Res., 6, 147.
 DALIMIER, R. e LANCERAUX, E., 1913, Presse Medic. Par., 21, 419.
 DELILLE, Armand, e outros, 1912, C. Rendus Ac. Sic., 154, 537.
 DOUGLAS, S. R., 1914, The Lancet, 2, 891.
 FALK, K. S. e YANG, S. Y., 1926, Jour. Infec. Dis., 38, 8.
 GORDON, J., 1924, Journ. Path. Bact., 27, 123.
 GORDON, J., 1926, Idem, 29, 14.
 HARTLEY, P., 1922, Jour. Path. Bact., 25, 479.
 HEIM, L., 1922, Lehrbuch der Bakteriologie, 114
 HERRMANN, L., 1934, Zentralblat f. Bakter. Orig., 132, 148.
 HOTTINGER, R., 1912, Zentralblat f. Bakter. Orig., 67, 178.
 HOTTINGER, R., 1912, Rev. Med. de São Paulo, 232.
 HOTTINGER, R. e PAULA SOUZA, 1916, Rev. Med. Inst. Oswaldo Cruz, 17, 10 e 213.
 LAMAR, V. R., 1911, The Jour. Exper. Med., 13, 1.
 LAMAR, V. R., 1911, Idem, 13, 380.
 LINGGOOD, R. V., 1939, Brit. Journ. Exp., 20, 502.
 LINGGOOD, R. V., 1941, Idem, 22, 255.
 MEYER, A. e SCHOEFFER, G., 1919, C. Rendus Soc. Biol., 82, 113.
 NORRIS, D., 1918, Ind. Journ. Med. Res., 6, 174.
 NORRIS, D., 1918, Idem, 6, 569.
 NORRIS, D., 1919, Idem, 7, 536.
 NORRIS, D., 1920, Idem, 704.
 MUELLER, J. W., 1922, Journ. Bact., 7, 309.
 NOGUCHI, H., 1907, Bioch. Zeitsch, 6.
 PECKHAM, A. W., 1893, Journ. Exp., Med. 2, 549.
 PÉRÉ, M. A., 1892, An. Inst. Pasteur, 6, 512.
 POPE, C. G., e LINGGOOD, F. V., 1933, Brit. Journ. Expr. Path., 14, 77.
 POPE, C. G., e SMITH, M. L., 1932, Journ. Path. Bact., 35, 573.
 POPE, C. G., e HEALEY, M., 1939, Brit. Journ. Exper. Path., 20, 213.
 WATSON, A. F. e WALLACE, V., 1923, Journ. Path. Bact., 26, 447.
 WATSON, A. F., e LANGSLAFF, E., 1927, Journ. Path. Bact., 30, 383.
 WYON, C. A., e MAC LEOD, J. U., 1923, Journ. Hyg., 21, 376.

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 tambem 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 Shäffer e o meio de Kauffmann.

Meio de Shäffer — 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.

Junte 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

	T ^o l ^o 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 decrescimento 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 pírico, 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 disenterico, 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

ANO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	<i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> Shiga	<i>Shigella</i> ambigua	<i>Shigella</i> para <i>dysenteriae</i> tipo Hiss- Russell	<i>Shigella</i> para <i>dysenteriae</i> tipo Flexner	<i>Shigella</i> gru- po <i>alkalescens</i> e <i>dispar</i>	<i>Shigella</i> e grupo Sonne	<i>Eberthella</i> <i>typhosa</i>	<i>Salmonellas</i>
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>alkalecens</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 (Calazanas 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 paradyserteriae*, 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 bismuth 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.

ACHORION GALLINAE (MÉGNIN-SABRAZÈS, 1890-93)

Caso de infestação humana espontânea

NICOLAU ROSSETTI

Prof. catedrático da Escola Paulista de Medicina. Biologista-chefe do Instituto Adolfo Lutz

Em Fevereiro de 1938 apresenta-se à Consulta de Pele do Instituto de Higiene uma escolar portadora de lesão cutânea do rosto. Trata-se de menina de 8 anos de idade, branca, brasileira, em bom estado de saúde geral. Sua queixa diz respeito ao aparecimento de uma placa circunscrita, localizada ao nível da região malar esquerda. Essa alteração cutânea, que começara como ponto insignificante, foi ganhando dia a dia em extensão. No momento do exame, cerca de uma semana após o início, era de se observar, na sede já referida, uma lesão mais ou menos ovalar, com $1 \times 1\frac{1}{2}$ cm. de diâmetro, seca, eritemato-escamosa, bem delimitada por borda nítida. Esta desenhava o aspeto de fina moldura de cor vermelha inflamatória bastante acentuada. Enfim, lesão com as características de "*herpes circinado da pele glabra*", igual a de inúmeros casos que aqui entre nós determina o *M. felineum*; igual mas não idêntica se se tomar tento na maior acentuação do componente inflamatório. Estabelecido o diagnóstico de epidermomicose e confirmado por exame microscópico de algumas escamas, procurou-se colher dados epidemiológicos capazes de indicar a fonte do contágio. Resultou não haver na família e suas relações e nem na vizinhança outro caso idêntico. A paciente não possuía cão ou gato, só tendo tido em seu quintal galinhas, das quais a mãe se desfizera dias antes, conservando apenas uma. Foi referido também que a criança costumava brincar com essas aves, tendo mesmo o hábito de afagá-las contra o rosto, fato esse que provocara reiteradas advertências da mãe.

Depois de retirada, mediante raspagem, maior quantidade de escamas para sementeira, receitou-se à paciente álcool iodado a 1% para fricção local, medicação essa que curou a pequena lesão em cerca de duas semanas.

IDENTIFICAÇÃO DO COGUMELO

A identificação do cogumelo foi a principio trabalhosa. Por se tratar de caso típico de herpes circinado da pele glabra, comum entre nós e quase sempre devido ao *M. felineum*, ficamos surpreendidos ao verificar o crescimento, nos meios de cultura, de colônias cujo aspeto não lembrava em nada nenhum dos cogumelos das tinhas que estamos habituados a encontrar no nosso ambiente como parasitos de indivíduos humanos.

A observação cuidadosa do aspeto macroscópico das diversas culturas e a lembrança de que entre os dados epidemiológicos havia uma referência explícita a contato com aves domésticas, sugeriu-nos a conveniência de colocar os tubos na estufa a 30° C. Pudemos constatar nessas condições o aparecimento de um pigmento rosa que da cultura difundiu-se para o meio corando-o em rosa framboesa, o que é uma das caraterísticas do *Achorion gallinae*, ou melhor como diz Sabouraud (1), “é um carater exclusivo dessa cultura em toda a série dos Dermatófitos”.

Já melhor orientados procedemos ao estudo desse fungo nas condições de temperatura que lhe são mais propícias notando minuciosamente suas caraterísticas macroscópicas; fizemos em cultura sobre lâminas o estudo de seus atributos micológicos; não descuidamos da parte propriamente experimental inoculando-o em galináceos e mesmo “in anima nobile”; obtivemos, das inoculações, retroculturas absolutamente iguais às do material primitivo. De todas essas pesquisas, que abaixo vão relatadas, pudemos concluir com absoluta certeza ser o *Achorion gallinae* o cogumelo isolado.

CULTURAS

Estudo macroscópico de culturas. Em meio de prova. — Dado que o *A. gallinae*, ao contrário dos outros Dermatófitos (com exceção do *T. album*), precisa ser estudado também em temperatura outra que a do ambiente, damos aquí lado a lado a observação do desenvolvimento de culturas em meio de Sabouraud maltosado, mantidas em duas condições diversas: na estufa a 30° C. e em temperatura de laboratório.

ESTUFA 30° C.

- 4.^o dia — A cultura é penugenta, branca de neve, com tamanho e forma de cabeça de alfinete grande.
- 6.^o dia — Disco penugento de 14 mm. de diâmetro, com aspeto de arminho de pó de arroz, convexo, bem alvo.
- 8.^o dia — Aparece no centro do disco, que agora tem 18 mm. de diâmetro, uma depressão arredondada da qual partem, em direção radiada, sete sulcos que na maioria alcançam a periferia do disco.
- 11.^o dia — Disco de 32 mm. de diâmetro, recoberto de penugem alva bem curta. O centro, na extensão de uma lentilha, é deprimido e dele partem 15 sulcos radiados, relativamente profundos, que dividem a superfície do disco em setores triangulares. Dorso da cultura de cor rósea escura.
- 17.^o dia — A cultura é agora um grande disco arredondado, de 45 mm. de diâmetro e ocupa quase totalmente o fundo do balão de Erlenmeyer. Sua superfície, que anteriormente só tinha o umbigo central e os sulcos radiados regularmente dispostos, começa a convulsionar-se. Os gomos entre os sulcos tornam-se irregulares tomando um aspeto algum tanto cerebri-forme. Aparecem também no centro algumas rupturas que emprestam à colônia aspeto fenestrado.

TEMPERATURA DE LABORATÓRIO

- 4.^o dia — Mesmo aspeto, porem as dimensões são cerca da metade.
- 6.^o dia — Mesmo aspeto. Diâmetro de 6 mm.
- 8.^o dia — Disco muito menor que o da cultura em estufa; só tem 7 mm. de diâmetro. Não mostra ainda os sulcos radiados, mas somente a depressão central em forma de umbigo.
- 11.^o dia — Mais ou menos o mesmo aspeto da cultura em estufa. Diâmetro, porem, bem menor: cerca de 12 mm.
- 17.^o dia — Aspeto semelhante ao da cultura em estufa. Diâmetro de 22 mm.



FIG. 1

Achorion gallinae — Cultura de 23 dias em
balão, meio de prova maltosado.

23.^o dia — A cultura cobre todo o fundo do balão de Erlenmeyer. Sua superfície deixa ver, além do que foi anotado precedentemente, alguns leves sulcos transversais que cortam paralelamente as elevações cerebriformes. A mais, a superfície de cultura deixa perceber duas zonas de cores diferentes: uma central, de cerca de 2 cm. de diâmetro, tingida de cor rósea pálida, de tonalidade muito delicada; e outra periférica de cor branca levemente parda, que envolve a primeira. O aspeto da superfície da cultura é agora acartonado. O meio sobre o qual se desenvolve a cultura mostra-se invadido por um pigmento rosa que lhe empresta uma cor de geleia de framboesa.

23.^o dia — Aspeto semelhante ao de cultura em estufa. Não há, porem, presença de pigmento rosa, a não ser em algumas raras culturas, nas quais, entretanto, a coloração é apenas esboçada e somente circunscrita à sua zona central. Na maioria estas são acartonadas, e de cor branca levemente acinzentadas. A figura n.^o 1 dá-nos uma reprodução exata do aspeto da cultura nesse estágio.

Aparecimento do pigmento nas culturas de A. gallinae — Para a observação do pigmento deste cogumelo, verificamos não ser o meio de prova maltosado o melhor. Como para outros cogumelos que formam pigmento, este desenvolve-se mais frequente e rapidamente, e em maior quantidade, no meio de prova glicosado. Em meio deste tipo, estando a cultura de *A. gallinae* em estufa a 30° C., vimos aparecer o pigmento rosa framboesa na superfície da cultura já no 5.º dia, para, no 7.º dia, ganhar a espessura do meio e difundir-se nele.

Fora da estufa, mesmo com glicose, isso não se dá. Sem embargo o pigmento pode-se formar mas muito tardiamente e circunscrito só ao dorso da cultura que se tinge de amarelo misturado de róseo. Às vezes, em alguns tubos, lá para o 17.º dia, invade muito pouco e em pequena profundidade a espessura do meio dando a este, nesse ponto, o aspeto de ambar de uma cor rósea desbotada.

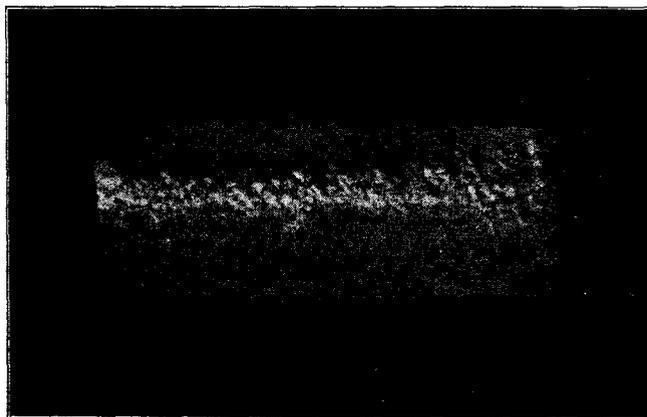


FIG. 2

Achorion gallinae — Cultura em batata. — 22.º dia.

Cultura em batata simples e glicerizada — No 4.º ou 5.º dia, no lugar em que se fez a estria de sementeira, começam a aparecer pequenas colônias ligeiramente elevadas, arredondadas umas, outras alongadas, algumas isoladas, outras confluentes, que formam em conjunto uma fita estreita e irregular com aspecto de baixo-relevo sobre a superfície da batata. Essas elevações são recobertas de penugem curta, bem alva. Cerca de uma semana mais tarde, aproximadamente no 12.º dia, as elevações se acentuam e perdem sua penugem alva. Vê-se então uma larga estria alta, montuosa e mesmo vermiculada e cerebriforme, tingida de branco ligeiramente acin-

zentado e mesmo róseo em alguns pontos. A *figura n.º 2* nos mostra esse mesmo aspeto, um pouco mais desenvolvido, de uma cultura fotografada no 22.º dia.

Cultura em meio de conservação — Em meio de peptona a 4% as culturas tomam no fim de uma semana a aparência de disco com cerca de $\frac{1}{2}$ cm. de diâmetro, de superfície feita de penugem branca, bem curta. A borda da cultura tem um matiz levemente amarelado; o dorso é de cor amarelo-ovo com um ponto pardo no centro.

Observadas de uma semana a dez dias mais tarde, e daí para diante, as culturas em meio de conservação podem se mostrar no mesmo tubo sob dois aspetos, como é de se ver na *figura n.º 3*.

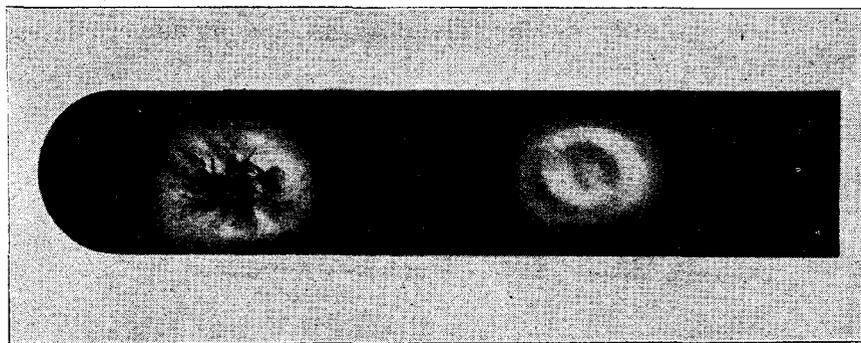


FIG. N.º 3

Achorion gallinae — Cultura em meio de conservação — 37.º dia.

1.º) Na parte alta do tubo, devido talvez à menor quantidade de meio e consequentemente ao seu menor grau de umidade, a colônia cessa de crescer ficando com o aspeto de botão de peitilho de camisa, ou melhor de cratera. Seu diâmetro é de cerca de 7 mm.; sua superfície é branca, feita de penugem muito baixa, como um tecido de pelo curto. De um certo modo essa espécie de cultura lembra as do *T. crateriforme*; mas não fica, como estas, acartonada e pulverulenta.

2.º) Na parte baixa do tubo (*figura n.º 3*) o disco de cultura continua a desenvolver-se; sua superfície se estende elevando-se em plicas, formando assim elevações e sulcos que dão ao conjunto um aspeto movimentado, irregularmente cerebriforme, cortado de fi-

nas rupturas. O dorso da cultura toma cor amarela pardacenta, mais ou menos carregada.

Aspeto microscópico das culturas — O aspeto propriamente micológico foi observado em culturas sobre lâminas, preparadas segundo o método de Rivalier e Seydel. Em cerca de 20 dias as culturas assim feitas alcançam aproximadamente 17-18 mm. de diâmetro. Foram fixadas, colodionadas e tingidas com “bleu-coton” a 1/2%. Mostram-se constituídas de filamentos de espessura desigual com expansão radiada do centro para a periferia, filamentos esses, que se ramificam emaranhando essas ramificações umas com as outras. Muitos dos filamentos mais finos, especialmente os dispostos não horizontalmente mas perpendicularmente, isto é, os aéreos, trazem *aleurias piriformes*, presas diretamente de um lado e do outro do tirso, e *fusos* em forma de clava divididos em lojas no numero de um a cinco. (*Figura n.º 4*).

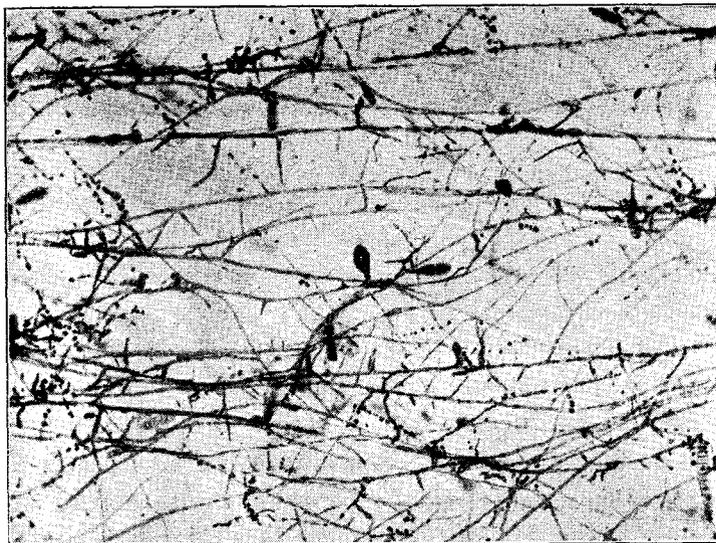


FIG. 4

Achorion gallinae — Cultura sobre lâmina, 20.º dia. Aumento 280 x. Vê-se, como órgãos diferenciados, fusos e aleurias.

A *figura n.º 5* nos dá uma representação fotográfica de filamentos com aleurias piriformes; e a *figura n.º 6* mostra-nos, em grande aumento os detalhes de um fusos com cinco lojas.



FIG. 5

Cultura, sobre lâmina, de *A. gallinae* — Filamento miceliano com afeurias laterais. Aumento 500 x.



FIG. 6

Cultura, sobre lâmina, de *A. gallinae* — Fusão com cinco lojas. Aumento 1000 x.

INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL

Em animais — Praticamos a inoculação do cogumelo em dois galos novos. O material que serviu para inoculação foi retirado de cultura em meio glicosado e de outra em meio de conservação; a primeira com 26 e a segunda com 27 dias de idade. Em um dos galos inoculou-se também um fragmento de escama obtida da lesão primitiva do doente.

A técnica de inoculação foi de um modo geral a seguinte: fricção de partículas de cultura sobre pele previamente traumatizada de certas regiões como crista, barbeta, parte da face situada logo atrás do bico. Além disso, em um dos galos, inoculamos uma área de pele do flanco, enxertando fragmentos de cultura em óstios foliculares dos quais tínhamos previamente arrancado as penas; no outro animal enchemos o conduto auditivo, ligeiramente escarificado, com material de cultura.

A observação dessas aves fez-nos notar que no 4.^o dia já haviam desaparecido as lesões traumáticas, tomando, a pele das regiões em apreço, aspeto normal. Só no 11.^o dia é que se constatou, nos pontos inoculados, sinais de descamação esbranquiçada. Essas alterações epidérmicas ganham dia a dia em extensão e intensidade e já no 15.^o dia é de se ver, logo atrás do bico de uma das aves, uma pequena placa, das dimensões de grão de milho, arredondada e recoberta de finíssimas escamas brancas semelhantes a minúsculas partículas de gesso. Pouco a pouco a crista, as partes laterais da cabeça proximas do bico, as barbelas vão ficando salpicadas ou de numerosas escamas-crostas nitidamente redondas do tamanho e forma de cabeça de alfinete, ou, por confluência destas, de amontoados e ilhotas de uma massa de aspeto gessoso. A figura n.^o 7 representa esse estágio, cerca de 3 a 4 semanas a contar do dia da inoculação.

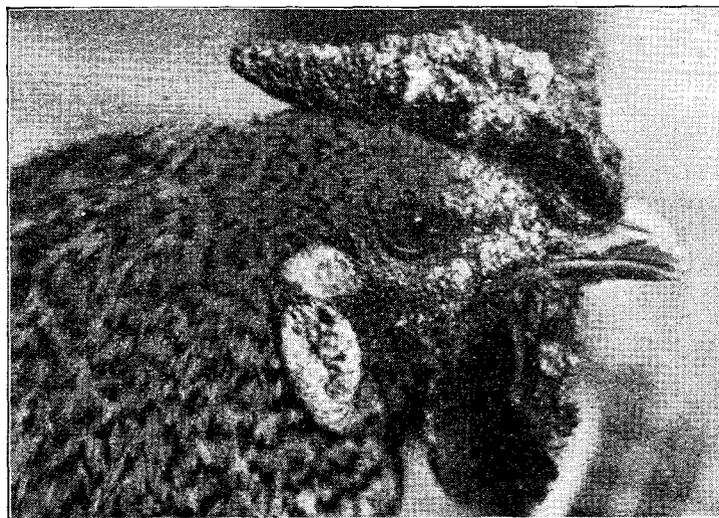


FIG. 7

Galo inoculado com *A. gallinae* — Na face, logo atrás do bico, pequenas lesões em forma de "godets" isolados; na crista, lesões da mesma natureza confluídas em placas crostosas.

Quanto à cor desse induto escamo-crostoso devemos dizer que ficamos surpreendidos ao verificar não ser ela a mesma nos dois animais inoculados. Num dos galos as lesões são brancas ou brancas acinzentadas e conformes nisso e no mais à descrição clássica feita por *Sabouraud* (1); justificam bem, pelo seu aspeto de con-

junto, a denominação vulgar de “crista branca” que em geral se dá ao favo das aves. No outro galo, no entanto, já a cor é diferente: a princípio branca amarelada, torna-se com o tempo, ou já o é de início, *amarela mais ou menos intensa e mesmo amarela-enzofre*.

A diferença de cor era de indiscutível evidência, mas as retro-culturas feitas repetida e comparativamente com material de cor diversa deram sempre o mesmo cogumelo com todas as características do *A. gallinae*.

Não encontramos referências a esse fato em trabalhos de autores estrangeiros.

Entre nós, J. Reis e P. Nobrega, no ótimo “*Tratado de doenças das aves*” (2) descrevem o favo aviário como “infecção da pele caracterizada pelo aparecimento de placas branco-acinzentadas...”, de acordo, pois, com a observação clássica habitual; *Mastrofrancisco* (3) fala de uma cor branca nacarada muito particular. Pertence, a nosso ver, a Octavio de Magalhães e Aroeira Neves a primeira notação dessa curiosa variante de cor das crostas do favo das galinhas. Com efeito, esses autores, em excelente contribuição para o estudo dos cogumelos em Belo Horizonte (4), referindo-se a um galináceo parasitado pelo *A. gallinae* assim se expressam: “*O aspeto da crista, insistimos muito particularmente nisto, não era o de manchas brancas. A cor amarela de ouro velho era manifesta. Verificamos mais tarde, pela experimentação, que essa cor se apresentava desde o início das lesões. As escamas, o bulbo das penas, as cristas, tinham declaradamente esta cor. A moléstia seria antes “crista amarela”, que branca — do galináceo...*” Com esta descrição concorda uma observação de Cesar Pinto (5).

Para terminar a observação macroscópica das nossas inoculações experimentais devemos ainda acrescentar que as pequenas penas situadas nas faces das aves, na imediação das lesões, foram também atacadas pelo cogumelo. Este formava, em torno delas, ao nível da pele, um tecido miceliano com aspeto de crosta anular. Nos flancos das aves os pontos foliculares enxertados evoluíram criando lesões circinadas tricofitóides.

Inoculação sobre pele humana — Praticamos esta na pele glabra do braço e do dorso de duas meninas de 13 anos e de uma moça de 26 anos de idade. Como material de inoculação serviram

fragmentos de escama-crosta retirada previamente das lesões experimentais dos galos. Esses fragmentos foram aplicados sobre área cutânea levemente traumatizada mediante fricção com a borda de uma lâmina esterilizada. Todas as inoculações resultaram positivas, evoluindo do modo que abaixo vai descrito. Não nos descuidamos de fazer retro-culturas com material das lesões experimentais humanas assim obtidas; todas elas deram colônias de *A. gallinae*.

Evolução das inoculações — O aspecto morfológico das lesões foi o mesmo nas três pessoas inoculadas; a evolução, no entanto, foi mais rápida e menos limitada em uma das pessoas do que nas outras duas. Assim é que, enquanto nestas só no 6.º dia era de se ver uma alteração epidérmica lenticular, naquela esse mesmo tipo de lesão já tinha sido visto no 3.º dia. Em todas, porém, o aspecto foi sempre o de *herpes circinado de pele glabra*, mais ou menos bem definido; em outras palavras lesão ovalar, eritêmato-pitiriásica, emoldurada por uma borda em fita, vermelha viva, um pouco sobrelevada, borda essa crivada de pequeníssimas vesiculopústulas amarelas claras ou de minúsculas crostinhas pardacentas. Não conseguimos provocar a formação de “godets” visíveis a olho nú, como, aliás, também se deu com Sabrazès (6). As placas eritêmato-escamosas ovulares alcançaram dimensões que variavam entre 7x10 e 10x15 milímetros de diâmetro.

Exame microscópico das escamas — Retiramos algumas escamas e as deixamos clarificar a frio, entre lâmina e lamínula, durante 24 horas, em solução de potassa a 30%. Os campos da preparação microscópica são em geral muito ricos de filamentos micelianos (*figura n.º 8*). Nota-se nessas escamas dois aspectos que convem assinalar:

1.º) Pontos há em que o cogumelo se mostra como amontoado de elementos muito curtos, na maioria arredondados ou ovais e de tamanho desigual. A um exame pouco detido pareceria à primeira vista tratar-se de amontoado de esporos de forma e tamanho um pouco diferentes, quando na realidade, o que há não é senão um novelo feito do emaranhamento de micélios curtos cujos artículos polimorfos simulam, na superfície, esporos de vários aspectos.

2.º) Em outros pontos, e mais frequentemente, o cogumelo tem a forma de filamentos micelianos longos, sinuosos, dicotomiza-



FIG. 8

Micélio do *A. gallinae* na epiderme de lesões experimentais humanas
Aumento: 465 x.

dos, que se entrecruzaram desenhando tralhas de malhas largas e irregulares. A espessura desses filamentos é bastante desigual, variando do simples ao dobro e mesmo, para alguns, ao triplo. São todos eles subdivididos por septos em artículos breves, sub-cúbicos, arredondados e ovoides. Artículos assim de diversas formas e dimensões, por fazerem parte de um mesmo filamento miceliano, dão a este uma conformação bastante irregular e emprestam ao quadro de conjunto um curioso aspeto polimorfo.

Exame histológico das lesões experimentais — Foi feita biópsia de uma das lesões experimentais humanas, no 11.º dia da sua evolução. Incluído o fragmento em parafina e corado pela hematoxilina-eosina, pode-se ver que:

- 1) a *derme*, sobretudo ao nível do corpo papilar, mostra um acentuado edema interfascicular e infiltração de células redondas; seus vasos sanguíneos estão dilatados e muitos deles apresentam agrupamentos de hemátias. As papilas dérmicas são alongadas e separadas umas das outras mediante largas cunhas epidérmicas;

- 2) a *epiderme*, espessada no seu todo mas sobretudo a custa da camada de Malpighi, traz em sua superfície, aquí e acolá, pequenas massas em forma de menisco biconvexo incluídas entre duas fitas de camada córnea. Esses meniscos revelam-se, ao exame com maior aumento, constituídos de uma feltragem cerrada de micélios cujos artí-culos mais ou menos retangulares ou cúbicos são percepti-veis nos pontos mais nítidos da preparação. Trata-se de formações que devem ser interpretadas como “godets” microscópicos.

CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS

Baseado nas pesquisas micológicas e experimentais acima re-feridas, fica seguramente identificado o *A. gallinae* como cogumelo responsavel da lesão do caso em apreço. A necessidade desse rigor de provas resulta do fato de serem raríssimos na literatura médica os casos de infestação espontânea humana pelo *A. gallinae*.

Sabouraud, em 1910, no clássico tratado sobre as Tinhas, diz no texto que esse cogumelo não fora ainda observado em estado espontâneo no Homem; retifica em seguida essa afirmação com a seguinte nota: “*No momento em que corrijo estas provas, um dis-cípulo do serviço Dr. Brocq acaba de tirar de uma lesão tricofítica de Homem uma cultura muito certa de ACHORION GALLINAE. Acabo de fazer sua identificação*” (1, pag. 553). Não obstante, em 1936, no volume II da “*Nouvelle Pratique Dermatologique*”, nas poucas linhas que dedica ao *A. gallinae* volta a afirmar que este cogumelo nunca foi encontrado no homem, razão porque ele só o menciona. “*Cette espèce n'a encore jamais été recontrée sur l'homme, nous ne ferons que la mentionner*” — (7, p. 125).

Tambem são da literatura médica estrangeira as seguintes duas outras referências a casos de infestação espontânea humana pelo *A. gallinae*:

Em 1921 Haupt (8) apresentou em Berlim na Sociedade de Dermatologia uma cultura de *A. gallinae* obtida de um gato que contaminara um família inteira — Em 1926, A. Sartory, A. Petges et R. Sartory (9) relatam em conjunto uma afecção cutânea crô-nica apresentada por um empregado de estrada de ferro no Came-run. Dessa dermatose, constituída de placas eritêmato-escamosas, arredondadas ou festonadas, marginadas, com aspeto de certas pla-cas de epidermofícia, foi isolado como cogumelo o *A. gallinae*.

Entre nós é atribuída a Silva Araujo Pai a verificação de um caso de afecção espontânea do homem pelo favo aviário. Pedimos vênia para divergir dessa opinião, pois que o exame detido da comunicação desse ilustre Colega, feita em 1889 ao 1.º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro (10), mostra não haver elementos para uma afirmação de tal ordem. Aliás o caso apresentado ao Congresso o foi a título de "*pro-diagnose*". Qualquer identificação desse caso como micose aviária só poderia ter sido feita ulteriormente, também porque, não obstante já ser conhecido no mundo médico o favo da crista dos galináceos (Gerlach, 1858-1859; Leisering, 1858-1864; F. Müller, 1858; Mégnin, 1881; etc...), seu parasito só foi identificado em 1890 mediante culturas obtidas por Duclaux, e apresentadas por Mégnin à Sociedade de Biologia de Paris.

A comunicação de Silva Araujo Pai é sem duvida excelente pela clareza com que foram observados e expostos os fatos; estes podem ser, porisso mesmo, submetidos a uma análise segura.

Damos aquí primeiramente excertos da comunicação. Trata-se do seguinte:

Uma mocinha de 15 anos cuida de uma galinha de estimação "*afetada de uma molestia das pernas muito pruriginosa*", raspando com um alfinete as pernas do mesmo animal. "Esta galinha era uma das muitas que no galinheiro se apresentavam atacadas de uma moléstia epidêmica que ali grassava...". "Diversos desses animais haviam sucumbido, depois de demonstrarem grande sofrimento, prurido intenso e excitação anormal...". Duas dessas galinhas foram observadas durante muitos dias notando-se que: "As duas galinhas apresentavam notavel magreza. Comiam bem os grãos de milho que se lhes atirava, mas apenas acabavam de fazê-lo, denotavam grande agitação, que parecia motivada pelo prurido experimentado nas pernas. As galinhas procuravam de fato arrancar certas crostas que lhes cobriam esses membros. Neste afã conseguiam realmente arrancar pedaços das referidas crostas, ferindo-se muitas vezes, a ponto de correr sangue. Erravam de quando em vez o alvo e beliscavam as coxas, donde arrancavam penas e pedaços de pele, ficando os músculos a descoberto. Quando soltas em um pátio ajardinado da Policlínica, distraíam-se um pouco em catar insetos, vermes e detritos orgânicos pelo solo, como é hábito desses animais esgravatando os canteiros; mas em breve, concitadas sem dúvida pelo prurido, voltavam à faina das beliscadelas nas pernas. O aspeto destas era sumamente curioso. Parecia que sobre elas havia sido colocada espessa camada de gesso sujo, irregularmente depositado, formando elevações e depressões, de modo que em certos pontos era consideravel a grossura das pernas das galinhas. Esta substância, que parecia calcárea, destacava-se, quando raspada, sob forma de pó branco ou amarelado".

"Na cabeça da moça igual aspeto se notava. As massas estranhas eram aí mais claras, menos secas e duras, mas suscetíveis de dissociação, como a das galinhas. Os pelos atravessavam estas crostas em diferentes direções e caíam espontaneamente, deixando várias superfícies glabras. Em alguns pontos viam-se vesículas, vesico-pústulas e pústulas, mas a maior extensão da cabeça era ocupada pelas crostas já descritas. Todo o couro cabeludo foi atacado por seções distintas, interpoladas de partes aparentemente poupadas...". "A epilação era de todo impossível, tal a dor que a doente acusava às menores trações".

A dor era tão acentuada que para efetuar-se a epilação foi necessário fazer anestesia local.

"Não se notava no couro cabeludo grande inflamação, e a que existia era mesmo em partes circunscritas, sem caráter algum de difusão; mas a despeito deste caráter tórpido da afecção, as papilas dérmicas deviam estar extraordinariamente sensíveis, pois o menor contato com o couro cabeludo provocava dores violentas."

... "O emagrecimento da doente era considerável, a inapetência quase absoluta e, em consequência das dores que a afligiam, quase impossível se tornava o sono."

... "Os exames bacterioscópicos das crostas e pelos da doente, bem como das crostas das galinhas, foram confiados ao Dr. Afonso Ramos. Este colega encarregou-se também da cultura do micróbio retirado dessas crostas, e o resultado de seus estudos se acha consignado nas seguintes notas...:"

"Os cabelos achavam-se bastante alterados em sua estrutura, principalmente no bulbo, onde se apresentava o seu tecido conetivo protetor completamente despedaçado. A pigmentação achava-se irregularmente distribuída, sendo que em alguns pontos era muito mais profusa do que em outros. O processo inflamatório atingiu o bulbo em todas as suas camadas, o que explica as condições em que os cabelos se achavam na cabeça da doente, isto é, sensivelmente dolorosos à menor pressão ou tração, e destacando-se com a maior facilidade."

"Retirado, com todos os cuidados que se exige nos métodos de cultura, um pouco do líquido concreto de uma das pústulas, a qual foi profundamente incisada, encontrei grande quantidade de cocos, ora isolados, ora constituindo zoógleas."

"Com este mesmo líquido inoquiei alguns tubos de cultura de gelatina, onde os mesmos cocos se desenvolveram com grande rapidez, sendo que neste meio eram eles dotados de movimentos."

"Com a galinha procedi da mesma forma, extraindo, com toda a antissepsia, um pouco da substância de aspeto calcáreo, que constituía as excrescências mais ou menos difusas que cobriam as pernas do animal, tendo o cuidado de retirar essa matéria de camadas bem profundamente situadas. As culturas do micróbio encontrado na galinha deram, desde o segundo dia, bastonetes que se viam, logo que atingiam certas proporções, que eram dotados de movimento. Estes bastonetes quando coloridos eram-no somente nos extremos, resistindo a parte central à impregnação da substância corante."

"Nas culturas, quer do conteúdo da pústula, quer da massa concreta da galinha, só se desenvolveu um micróbio. Eram culturas perfeitamente puras."

Tendo assim fornecido os resultados microscópicos e das culturas, Silva Araujo Pai passa mais adiante a discutir o diagnóstico da dermatose da moça, nos seguintes termos:

... "O diagnóstico ali só poderia oscilar entre a *tinea favosa* (*Trichomyces pustulosa* de Auspitz) e o *eczema impetiginoso*. Quem tivesse, porém, prática de ver tinhosos, desde logo rejeitaria esta hipótese. Nem um *favus* isolado existia (forma *lupinosa*) e as crostas, que se poderiam supor aglomerações de velhos *favi*, formando então os *scutula* descritos pelos autores, em nada se pareciam, depois de detido exame com esses *scutula*."

"A forma *squarrosa* seria a que mais se imporia ao espírito, se as crostas nesta moléstia, que o orador está descrevendo, não fossem tão caracteristicamente diferentes das dessa forma de *tinea favosa*."

"Um argumento, porém, de maior força é o seguinte: nem o orador nem o Dr. Afonso Ramos puderam, a-pesar dos mais reiterados exames microscópicos, encontrar o mais ligeiro vestígio de *Achorion Schoenleinii*, o parasita produtor da *tinha favosa*, o qual é, aliás, pelas suas relativamente grandes proporções, de fácil reconhecimento."

"Quanto à *tinha tonsurante*, não se poderia pensar nela, à vista dos sintomas descritos, e nem o microscópio revelou, no exame dos pelos, a presença de *Trichophyton tonsurans*, seu parasita produtor."

"De um *eczema impetiginoso* poderia parecer este caso, se a inflamação fosse mais intensa, as pústulas em maior número, as crostas com o aspeto francamente purulento que o caracterizam, se a secreção melitúrica, tão própria desta afecção, ali existisse, se a moléstia se estendesse também para as partes circunvizinhas da pele, excedendo os limites pilosos, enfim, se se notasse aquele aspeto tão típico do *eczema*, que tão facilmente se impõe, na maioria dos casos, aos olhos do clínico..."

O orador conclue não estabelecendo no momento o diagnóstico.

* * *

Como se vê dos largos excertos acima transcritos, na excelente comunicação do Dr. Silva Araujo é traçado admiravelmente bem o quadro clínico de ambas as moléstias, a das galinhas e a da moçinha; os exames de laboratório foram repetidos e minuciosos; a discussão diagnóstica foi feita com evidente competência.

Mas de tudo resulta que, no caso em questão, devemos nos ater às próprias conclusões do autor da comunicação que, em se baseando no quadro clínico e nos exames microscópicos e culturais, exclue a hipótese de um favo e de uma *tinha tonsurante*, e, dizemos nós,

exclue com isso também a hipótese de qualquer outra dermatomycose. Contudo queremos, para maior clareza, enumerar nossas objeções fundamentais:

1.º) O quadro clínico humano, como bem frisa Silva Araujo, em muito difere do de uma tinha favosa ou tonsurante. Lembraria mais o de um eczema impetiginoso se certos sintomas fossem mais acusados ou presentes.

Ou então, acrescentamos, poderia estar no grupo das coccides eczematiformes do couro cabeludo (Sabouraud), cujo aspecto clínico é extremamente polimorfo (eczematide psoriasiforme de Darier ou paraqueratose psoriasiforme de Brocq, etc.).

2.) Dá maior relevo à hipótese de um eczema impetiginoso e de uma eczematide mais ou menos inflamatória a presença de cocos ("profusa" — pag. 31 da comunicação) nos cabelos e crostas do couro cabeludo, revelados pelo exame microscópico e em cultura pura.

3.º) Contraria absolutamente o diagnóstico de uma micose a ausência de filamentos micelianos nos cabelos e nas crostas, procurados por Silva Araujo e pelo Dr. Afonso Ramos e não encontrados "*a-pesar dos mais reiterados exames*". Muito justamente faz Silva Araujo, dessa ausência de cogumelos "*o argumento de maior força*" contra a hipótese de um favo e também de uma tinha tonsurante. Os filamentos micelianos dos Dermatomicetos, como é sabido, são de fácil pesquisa, especialmente em se tratando de lesão clínica tão evoluida e, no caso, eles foram procurados em *reiterados* exames.

4.º) A doença das galinhas, minuciosamente descrita, em nada se parece com o favo aviário. Não há, na comunicação, a menor referência a lesões da crista ou mesmo da cabeça desses animais, quando é conhecido serem essas regiões as que em primeiro lugar são atacadas e com frequência são a sede exclusiva da moléstia. O favo aviário pode às vezes, em verdade, nas galinhas mantidas em péssimas condições higiênicas, generalizar-se à pele do corpo todo, provocando a queda das penas com o aparecimento de lesões circinadas tricofitoides. Sem embargo, nesses casos, também a crista é atacada e de modo acentuadíssimo.

As galinhas da comunicação de Silva Araujo sofriam de moléstia que se caracterizava por dois sintomas: as crostas, localizadas *unicamente nas pernas*, e o prurido tão intenso que provocava ne-

las grande agitação e que as levava a bicarem os próprios membros, ferindo-os "*a ponto de correr sangue*".

Demos conhecimento textual da descrição clínica dessa moléstia, conforme vem na comunicação de Silva Araujo, a um ilustre colega especializado em doenças das aves. Ele também, exclue a possibilidade de se tratar de casos de favo aviário; o quadro clínico sugere-lhe a hipótese de uma dermatose devida a acarianos.

Em conclusão, o simples fato de lesões do couro cabeludo aparecerem em pessoa que cuidava de ave doente não é suficiente para esteiar o diagnóstico de uma moléstia tão extremamente rara como é o favo humano espontâneo provocado pelo *A. gallinae*.

Impossível é ainda mais essa afirmação em caso como esse em que nem o quadro clínico humano e nem o das galinhas indicam com segurança uma Dermatomicose, — e em que, sobretudo, a pesquisa reiterada de Dermatomicetos nas crostas e cabelos, pelo microscópio e pela cultura, foi sempre negativa.

A conclusão não diferente tinha aliás chegado o Dr. Silva Araujo Pai a cuja memoria rendemos respeitosa homenagem.

RESUMO

Visto ser extremamente rara a infestação humana espontânea por *Achorion gallinae*, o autor crê oportuno referir um caso por ele observado em S. Paulo.

Trata-se de uma menina de 8 anos de idade que tinha por hábito brincar com galinhas e afagá-las contra o rosto. Veiu á Consulta com uma lesão de herpes circinado da pele glabra localizada na região malar esquerda. O exame direto das escamas revelou ao microscópio a presença de filamentos micelianos; a cultura mostrou ser esse cogumelo o *A. gallinae*.

Não obstante serem as culturas absolutamente típicas, não faltando nas colocadas em estufa a 30°C. a presença de abundante pigmento rosa difundido no meio, o que emprestava a este o aspeto de geleia de framboesa, quís o autor contudo cercar-se de todas as provas para testemunhar a segura identificação do *A. gallinae*.

O trabalho, porisso, refere:

- o desenvolvimento macroscópico das culturas em diversos meios (Sabouraud maltosado e glicosado, batata simples e glicerinada, e meio de conservação);
- a observação do aparecimento do pigmento rosa framboesa nas culturas em estufa;
- o estudo micológico do fungo feito em culturas sobre lâminas, o que pôs em evidência seus órgãos diferenciados;
- o estudo experimental mediante inoculação em galináceos e indivíduos humanos, obtendo lesões típicas respectivamente de favo aviário e de epidermomicose, sendo que dessas lesões foram conseguidas facilmente retro-culturas de *A. gallinae*;
- o exame histológico das lesões experimentais humanas e aviárias com a demonstração da presença de “godets” microscópicos entre os estratos da camada cornea.

Veem em seguida citados os únicos trabalhos da literatura médica estrangeira sobre infestação humana por *A. gallinae*.

Dado que, entre nós, é atribuída a Silva Araujo Pai a verificação de um caso de afecção espontânea humana pelo favo aviário, o autor analisa pormenorizadamente a comunicação de Silva Araujo concluindo não haver nela elementos para afirmar que as dermatoses — tanto a humana como a da galinha — nela referidas, possam ser identificadas como dermatomicoses devidas ao *A. gallinae* ou a outro qualquer cogumelo.

SUMMARY

Being extremely rare the spontaneous human infestation by the *Achorion gallinae*, the A. thought it might be interesting the publishing of a case observed by him.

The patient, a girl 8 years old, had the habit of playing with chickens, bringing them in contact with the face. She went to the A.'s Clinic with a circinated herps of the glabrous skin of the left malar region. The microscopic examination of the scales showed mycelian filaments and the culture proved it to be the *A. gallinae*.

Although the cultures were absolutely typical, there not lacking, in those left in the oven at 30° C., plenty of rosy pigment im-

pregnating the culture medium and imparting to it the strawberry gelly aspect, the *A.* decided, nevertheless, to produce all the proves for the sure identification of the *A. gallinae*.

The work deals with:

- the macroscopic development of the cultures in several media (Sabouraud with maltose or glucose, potatoes either simple or with glicerín and conservation medium);
- the observations of the development of the strawberry rosy pigment in the cultures kept in the oven;
- the mycological study of the fungus cultivated on slides which showed its differentiated organs;
- the experimental study, by the inoculations into poultry and human beings, which gave typical lesions of the avian forms and human epidermomycosis and from which new cultures of *A. gallinae* were easily obtained;
- the histological examinations of the experimental lesions with demonstrations of microscopic scutula between the horny layers of the epiderm.

Next are cited the few foreign works met with in the medical litterature about the human infestation by the *A. gallinae*.

Since in Brazil, it is attributed to Silva Araujo (father) the reporting of a case of spontaneous human affection by the avian favus, the *A.* closely analyses Silva Araujo's work and concludes that there are not in such work the proofs to enable one to say that the dermatosis — the human as well as the avian — referred to in that work, might be identified to those due to *A. gallinae* or any other fungus.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — SABOURAUD, R. — 1910 — Les maladies cryptogamiques — Les Teignes Masson et C. — pag. 567.
- 2 — REIS, J. e P. NOBREGA — 1936 — Tratado de doenças das aves — Edição do Instituto Biológico de S. Paulo.
- 3 — MASTROFRANCISCO, N. — 1940 — Contribuição para o estudo do "favus" aviário — Revista de Industria Animal, 3 (nova serie), n.º 1. pgs. 146-156.

- 4 — MAGALHÃES, OCTAVIO e AROEIRA NEVES — 1926 — Ensaio de Micologia (Contribuição para o estudo dos cogumelos em Belo Horizonte) "Mem. do Inst. Oswaldo Cruz". Tomo XIX — Fasc. II.
- 5 — PINTO CESAR — 1934 — Contribuição á Higiene Veterinaria — O Campo — Setembro 1934 — pg. 17.
- 6 — SABRAZÈS, JEAN — 1893 — Favus de l'homme, de la poule et du chien — Ann. de Dermat. et de Syphiligr. Tome IV — pg. 340.
- 7 — DARIER, J., SABOURAUD, GOUGEROT, MILIAN, PAUTRIER, RAVAUT, SÉZARY, SIMON — 1936 — Nouvelle Pratique Dermatologique — Tome II — Masson et C."
- 8 — HAUPT — 1921 — Trichophytie der Katze durch *A. gallinae*, an der sich eine ganze Familie mit Favus infiziert hatte. Berlin, Dermat. Ges. 8-XI-1921 — Dermat. Zeitschr. B. 37, S. 104; e em C. Bruhns und A. Alexander — 1928 — Allgemeine Mykologie — B. XI — Handbuch der Haut — und Geschlechtskrank. herausg. von J. Jadassohn.
- 9 — SARTORY, A., A. FETGES et R. SARTORY — 1926 — Étude d'une épidermo-mycose causée par l'agent de la teigne de la poule "*Achorion gallinae*" Sabrazès — Bull. de l'Acad. de Méd. vol. 95 — n.º 20 — pg. 510.
- 10 — ARAUJO, SILVA — 1889 — in: 1.º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro — pg. 28-33.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO MORFO-BIOLÓGICO DO *PENICILLIUM NOTATUM*

HASSIB ASHCAR

Assistente do Diretor do Instituto Adolfo Lutz

I. INTRODUÇÃO.

II. ESTUDO MICOLÓGICO:

- 1) Posição sistemática.
- 2) Condições de cultivo.
- 3) Macroscopia das culturas: a) em meios sólidos; b) em meios líquidos; c) cultura seca.
- 4) Microscopia das culturas.
- 5) Caracteres bioquímicos: a) provas de fermentação; b) outras provas.
- 6) Patogenicidade (inoculações): a) em coelhos; b) em cobaias; c) em camundongos.

III. ENSAIOS SOBRE PENICILINA:

- 1) Produção de penicilina.
- 2) Determinação do poder bacteriostático.
- 3) Resultados obtidos.

IV. CONCLUSÕES — REFERÊNCIAS.

I. INTRODUÇÃO

Encetamos um estudo sobre a morfo-biologia do *Penicillium notatum*, em virtude da faculdade que possui esse cogumelo de produzir uma substância não tóxica e altamente bacteriostática sobre numerosas bactérias patogênicas, inclusive o *Streptococcus viridans*.

Embora as sulfamidas dominem atualmente no campo da quimioterapia, vários autores têm pesquisado e estudado substâncias produzidas por bactérias e cogumelos que possuem propriedades bacteriostáticas, bacteriolíticas e bactericidas, sobre microorganismos patogênicos.

Essas propriedades representam antagonismos microbianos cujo estudo tomou impulso com os trabalhos de Metchnikoff. Em 1929, Fleming observou que um cogumelo do gênero *Penicillium* era capaz de produzir em cultivo uma substância filtravel com acentuada propriedade bacteriostática sobre várias bactérias Gram-positivas (estafilococos, estreptococos, etc.) e algumas Gram-negativas (gonococos e meningococos). Essa substância, à qual denominou penicilina, não inibia o *H. influenzae*, o bacilo coli e outros. Sugeriu que a penicilina poderia ser usada como agente inibidor no isolamento de certos germes, particularmente do *H. influenzae*, e, como agente antisséptico, no tratamento local de feridas infectadas. Em 1932, Clutterbuck, Lovell e Raistrick modificaram o meio líquido de Czapek-Dox e nele cultivaram o *Penicillium notatum*; verificaram a produção de penicilina porém apenas isolaram um pigmento — crisogenina, que não apresentava ação antibacteriana. Em 1935, Reid embora não tenha conseguido isolar a penicilina, estudou algumas de suas propriedades e confirmou as observações de Fleming.

Em 1940, Chain e colaboradores elaboraram métodos destinados a obter uma quantidade consideravel de penicilina e a determinar seu poder inibidor, antibacteriano. Conseguiram obter das culturas um pó pardo cuja solução aquosa era estavel por muito tempo e, embora não fosse uma substância pura, possuia um poder antibacteriano bem acentuado.

Em 1941, Abraham, Chain e outros, em trabalho minucioso, descreveram um método de produção, extração e purificação de penicilina em larga escala; demonstraram seu alto poder inibidor sobre numerosas bactérias patogênicas e verificaram que o seu poder bacteriostático sobre os estafilococos e estreptococos é muito maior que o das sulfamidas. Demonstraram também que essa substância desenvolve uma ação terapêutica consideravel em infecções experimentais em animais e em infecções piógenas no homem.

Recentemente, Chain, numa sessão da Sociedade de Bioquímica de Oxford, descrevendo as propriedades químicas e físicas da penicilina, refere que é um ácido forte com 2 grupos ácidos ou múltiplos de dois e que na molécula existe carbono, hidrogênio e oxigênio. Na sua estrutura molecular, não encontrou o grupo metoxil, verificando, entretanto, 2 grupos hidroxil. Afirma ainda que o sal seco de bário, obtido da P se mantém indefinidamente e, na solução aquosa, é mais estavel entre pH 5 e 7.

Na mesma sessão, Abraham relata que a instabilidade da P obriga a recorrer a 3 métodos de purificação, dependendo da dissolução nos solventes, adsorção seletiva e redução. Dessa forma, o sal branco de bário obtido apresentou uma atividade de 240 unidades por miligrama e inibiu completamente o estafilococo em uma diluição de 1/16.000.000.

Fleming, ainda na mesma ocasião, prevê que a penicilina desde que tenha, pelo que parece, uma constituição diferente da das sulfamidas, o isolamento e a síntese da substância ativa sob forma pura, abrirá um novo campo na quimioterapia.

II. ESTUDO MICOLÓGICO

1. *Posição sistemática:* O microorganismo que vamos estudar pertence ao ramo Eumycetes, classe Ascomycetes, ordem Plectascales, família Aspergillaceae, gênero *Penicillium*, espécie *P. notatum*.

Procedência: A cultura que ainda continua em estudos foi enviada ao Instituto Adolfo Lutz, pelo Dr. Charles Thom, do "United States Department of Agriculture", com a indicação 144-5767 do germe de Fleming.

2. *Condições de cultivo:*

O *Penicillium notatum* é um cogumelo aeróbio, não se desenvolvendo em anaerobiose. Cresce bem em temperatura ambiente (18-26°C). Em geladeira (+ 4°C.), o seu desenvolvimento é muito lento, o mesmo acontecendo em estufa a 37°C. Em seus ensaios, Abraham e colaboradores cultivaram-no com sucesso a 24°C. É pouco sensível às mudanças de pH. Desenvolve-se bem nos meios comuns de cultura: meios de Sabouraud, Czapek-Dox, etc.. O extrato de levedura (desde 0,1%) acelera o crescimento do cogumelo, ao passo que o nitrito de sódio (0,3%) o retarda acentuadamente.

3. *Macroscopia das culturas:*

a) *Em meios sólidos — Caracteres das colônias gigantes:* Semeamos uma suspensão de esporos em frascos de Erhlenmeyer com meio de Sabouraud glicose e verificamos após 5-7 dias de incubação, em temperatura ambiente (18-26°C.), o seguinte aspecto: Desenvolvimento de uma colônia discóide com alguns cen-

timetros de diâmetro. A face superior da colônia é seca, de aspecto rugoso e de natureza aveludada. Apresenta numerosos sulcos dispostos como raios de circunferência. Quanto à cor e ao aspecto, distinguimos 3 zonas concêntricas: central, intermediária e periférica. A zona central de cor verde é mais saliente, possui filamentos mais aéreos e apresenta, na superfície, gotas amarelas que não molham a colônia. A zona intermediária de cor branca com nuances esverdeadas, possui filamentos menos aéreos que se continuam externamente por delicadíssimos filamentos como franjas de 2 a 3 milímetros de extensão, aderentes ao meio e que constituem a zona periférica. As gotas que frequentemente aparecem na superfície da colônia formam-se à expensas da água do meio de cultura.

A face inferior da colônia é úmida, lisa, de cor branco-amarelada e apresenta-se crivada ou fendida, principalmente, quando existem gotas na face superior ou aeróbia. A colônia elabora um pigmento amarelo que se difunde no meio de cultura. No meio de Sabouraud maltose os caracteres das colônias são semelhantes aos já descritos, apenas com variação na tonalidade das cores. A fotografia nº 1, mostra um aspecto da colônia gigante do *P. notatum* nesse meio de cultura.

No meio de Czapek-Dox modificado com 2% de agar os caracteres das colônias se repetem, porém o pigmento amarelo aparece melhor e se difunde facilmente pelo meio terminando por corá-lo completamente de amarelo.

b) *Em meios líquidos:* No meio de Czapek-Dox, modificado por Clutterbuck, Lovell e Raistrick, observamos todos os caracteres já descritos por Abraham e colaboradores. Em caldo Hottinger o cogumelo desenvolve-se mais lentamente, podendo-se entretanto, acelerar o crescimento juntando-se a esse meio 4% de glicose. Nesses meios líquidos com mais de 2 centímetros de altura, além do crescimento na superfície com aspecto de feltro contínuo e compacto, o cogumelo forma no fundo do frasco um sedimento branco, de aspecto floconoso. O pigmento amarelo acima referido é elaborado pelo micélio superficial e rapidamente se difunde no meio tornando-o, de incolor, amarelo ouro. Algumas vezes a produção de pigmento é pequena e o meio fica levemente corado (amarelo pálido); outras vezes, a cor do meio torna-se amarelo-alaranjada, e até avermelhada, quando a produção do pigmento é muito intensa.

c) *Cultura seca*: Semeamos o cogumelo no meio de Czapek-Dox com 5% de extrato de levedura e, após vários meses de exposição à temperatura ambiente, obtivemos a cultura seca. Esta apresentava-se com o aspecto de pó escuro, côr de cacau. Examinado ao microscópio verificamos que esse pó era formado principalmente por esporos de morfologia normal e fragmentos de micélio ou hifas.

A cultura seca repicada, após 10 meses, nos meios habituais de cultura, reproduziu o cogumelo com todos os seus caracteres morfológicos e bioquímicos. Conservou assim, as propriedades de fermentar a dextrose, sacarose, maltose, e glicerina como também as de elaborar pigmento e de produzir penicilina.

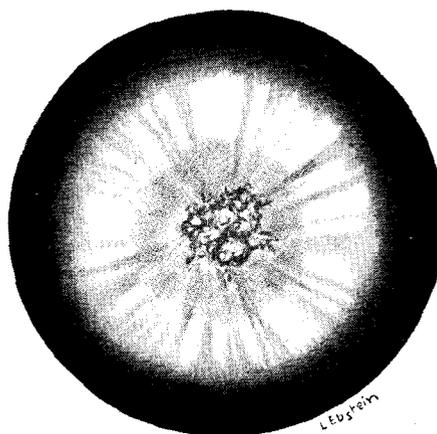
Temos a impressão de que é possível obter com êxito culturas secas de outros cogumelos o que evitaria repiques frequentes, diminuiria as possibilidades de contaminação e de perda das culturas.

4. *Microscopia das culturas*:

As culturas de 2 a 3 dias em temperatura ambiente, apresentam um micélio desenvolvido constituído por filamentos septados ou hifas retilíneas ou enroladas, muitas vezes se anastomosando e emitindo ramificações laterais. O micélio dá também origem a filamentos férteis denominados conidióforos que sustentam os aparelhos reprodutores do cogumelo. O aparelho reprodutor, chamado conidiano e que caracteriza o gênero *Penicillium* tem a forma de pincel ou vassoura. Ele é formado por um conifióforo, filamento fértil, que se divide em ramos; esses por sua vez se dividem dando râmulos ou, diretamente, dão origem às metulas que sustentam células alongadas esporógenas denominadas fiálides ou esterigmatas. Essas últimas geram esporos assexuados chamados conídios que se dispõem em cadeias no seu próprio prolongamento. As fiálides, em número de duas, três ou mais, formam entre si ângulos agudos cujos vértices estão ligados às extremidades distais das metulas constituindo assim os verticílios.

Observando-se o cogumelo após 5-7 dias de cultivo, verifica-se que aumenta muito o número de aparelhos conidianos, os quais então libertam grande quantidade de exosporos. A fotografia nº 2 mostra um aspecto do cogumelo nesta fase.

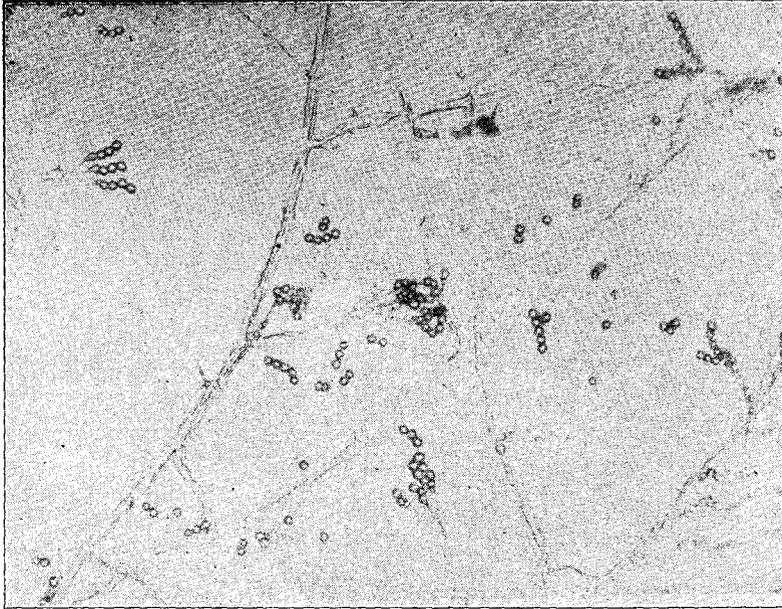




FOTOGRAFIA n. 1

Colônia gigante do *P. notatum*, 7 dias de cultivo em meio de Sabouraud maltose.

Os exosporos são geralmente redondos, hialinos; assemelham-se a hemátias humanas, porém, são menores, medindo de 3,0 a 5,2 micras de diâmetro. A maior parte, entretanto, (cerca de 85%), possui diâmetros que variam de 4 a 5 micras.



FOTOGRAFIA n. 2

Microfotografia do *Penicillium notatum* em meio de Czapek-Dox modificado. 7 dias de cultivo em temperatura ambiente. Aumento: 200 diâmetros.

Segundo a fase evolutiva pode-se encontrar esporos pedunculados em início de germinação. Os pedúnculos são expansões citoplasmáticas acidófilas que se coram em vermelho pelo método de Gram, ao passo que os esporos, que são basófilos, se coram em violeta.

5. Caracteres Bioquímicos:

a) *Provas de fermentação*: Utilizamos o meio semi-sólido de Hiss com fenol vermelho como indicador. Incubação em estufas a 18°C. e 28°C.

As leituras feitas após 48 horas de incubação revelaram que o *P. notatum* fermenta a dextrose, sacarose, maltose e glicerina, porém sem produção de gás. Após 5 dias, os resultados se repetiram com acidificação menos intensa com exceção dos tubos de glicerina

que indicaram acidificação maior. Nos dias seguintes observamos mudança do indicador para o lado alcalino nos tubos de dextrose, sacarose e maltose, enquanto que nos tubos de glicerina permaneceu a acidificação por tempo mais longo (3-4 semanas).

Foram negativas as provas de fermentação de: adonita, amido, arabinose, dextrina, dulcita, esculina, galactose, inulina, inosita, lactose, levulose, manita, rafinose, salicina, sorbita, trealose e xilose.

b) *Outras provas:* O cogumelo não acidifica nem coagula o leite, porém cresce bem nesse meio produzindo pigmento amarelo. Não liquefaz a gelatina. Reações de Voges-Proskauer e de vermelho de metila negativas (5 dias).

Não produz indol e não reduz nitratos a nitritos (10 dias).

6. *Patogenicidade:*

Não encontramos referências na literatura consultada sobre a patogenicidade ou inocuidade do *Penicillium notatum*. Para nos certificarmos si a sua manipulação poderia ou não oferecer perigo de infecção, fizemos inoculações em animais de laboratório. Preparamos uma suspensão de esporos lavando, com 10 cc. de solução fisiológica, a superfície de uma cultura de 7 dias em meio sólido inclinado.

a) *Inoculações em coelhos:* Injetamos 1 cc. da suspensão de esporos na veia de um coelho. Noutro coelho injetamos a mesma dose por via subcutânea. 10 dias após reinoculamos com as mesmas doses. Não verificamos reações térmicas nem outros sintomas de moléstia durante 3 meses de observação.

b) *Inoculações em cobaias:* Em 4 cobaias, cujos pesos variavam de 225 a 330 grs., injetamos 0,5 cc. de suspensão de esporos, subcutaneamente, na virilha. Inoculamos também a mesma dose numa 5.^a cobaia, porém, intraperitonealmente. Uma das 4 primeiras morreu acidentalmente 24 horas após. A autópsia nada revelou, a não ser leve hiperemia no ponto de inoculação. 10 dias após, as cobaias restantes foram reinoculadas com as mesmas doses. Uma semana depois da 2.^a inoculação, morreu a cobaia injetada intraperitonealmente. A autópsia nada revelou. O exame histopatológico do pulmão revelou apenas hiperemia e infiltração peri-vascular. O exame do fígado demonstrou apenas discreta infiltração peri-vascular. As culturas desses órgãos foram negativas para o cogumelo em estudo. Após 3 meses de observação, as 3 cobaias restantes continuavam normais. Sacrificamos uma delas e semea-

mos fragmentos de fígado, pulmão e baço em meio de Sabouraud glicose, resultando culturas negativas.

c) *Inoculações em camondongos*: Inoculamos 0,2 cc. de suspensão de esporos em 10 camondongos de 20 a 25 grs., sendo em 5 por via intraperitoneal e, nos 5 restantes, por via subcutânea. 10 dias depois foram reinoculados com as mesmas doses. Todos sobreviveram e não apresentaram quaisquer sintomas de moléstia, durante 3 meses de observação. Após esse tempo, sacrificamos 2 camondongos e retiramos fragmentos de fígado, pulmão e baço que foram semeados em meio de Sabouraud glicose, com resultados negativos.

III. ENSAIOS SOBRE PENICILINA

1. *Produção de penicilina*:

Afim de obtermos penicilina e analisarmos suas propriedades, semeamos esporos do cogumelo em frascos de Fernbach contendo meios líquidos de cultura cujas alturas não excediam de 2 centímetros. O meio que mais usamos e que forneceu material para a maior parte de nossas pesquisas foi o de Czapek-Dox modificado, cuja fórmula é a seguinte:

NaNO ₃	3,0 grs.
KH ₂ PO ₄	1,0 grs.
KCl	0,5 grs
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 grs.
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 grs.
Glicose anidra	40,0 grs.
Água destilada	1000 cc.

A incubação foi feita em temperatura ambiente (18-26°C.).

Em alguns frascos adicionamos ao meio 0,01% e noutros 0,02% de sulfato de zinco; entretanto, não verificamos nem aceleração no crescimento, nem aumento na produção de penicilina. A glicose favorece o crescimento do cogumelo e a pigmentação do micélio, porém não é indispensável para a produção de penicilina. A fermentação da glicose parece ser a causa da acidificação do meio de cultura nos primeiros dias de cultivo. O pH do meio, inicialmente em torno de 6,0, pode baixar muito, chegando a 2,0 entre o 4º e 5º dias; depois torna a se elevar até ficar francamente alcalino. Em torno da neutralidade se obtêm o maior teor em penicilina; este ponto foi por nós verificado, após 9 a 10 dias, no

primeiro cultivo em temperatura ambiente. Retirando-se o líquido de cultivo com penicilina e substituindo-o por outro esteril, o cogumelo, no mesmo frasco, produzirá o máximo de penicilina num tempo menor (5 a 7 dias), uma vez que já se encontra bem desenvolvido.

Em caldo Hottinger, com glicose ou sem, verificamos também a produção de penicilina, porém, em quantidade menor.

2. *Determinação do poder bacteriostático:*

Na avaliação do poder bacteriostático da penicilina, empregamos 2 métodos:

1º) Em tubos de caldo simples ou de caldo soro.

2º) Em placas de agar comum ou de outros meios sólidos.

No primeiro método, faz-se, em caldo, uma série de diluições de penicilina cuja atividade será representada pelo título da maior diluição que inibir completamente o crescimento de um germe dado.

No segundo método, a atividade pode ser avaliada quer pela área de inibição, quer medindo em milímetros o diâmetro da mesma quando fôr circular. Fazendo provas com *Staphylococcus aureus* e empregando o método em placas, Abraham e colaboradores consideraram como unidade (arbitrária) de penicilina a quantidade de P que, dissolvida em 1 cc. de água, produz uma área de inibição com 24 milímetros de diâmetro médio.

No método em tubos a técnica que adotamos foi a seguinte:

Em tubos com 5 cc. de caldo simples, fizemos diluições seriadas das preparações de penicilina, a partir da diluição de 1 para 5. A cada tubo de diluição semeamos 1 alça (2 mm. de diâmetro) de uma suspensão homogênea de bactérias resultantes da diluição, a 1 por 20, de uma cultura em caldo de *Staphylococcus aureus*, incubada a 37.C. durante 18 a 24 horas.

3. *Resultados obtidos:*

O filtrado de cultura em meio de Czapek-Dox modificado, revelou inibição total das diluições a 1/10 e 1/20 e inibição parcial na diluição a 1/40.

O filtrado de cultura em caldo Hottinger com 4% de glicose: inibição total na diluição a 1/10; inibição parcial nas diluições a 1/20 e 1/40. O mesmo filtrado em caldo Hottinger sem glicose:

inibição total na diluição a 1/5; inibição parcial na diluição a 1/10 e 1/20.

No método em placas, adotamos a técnica seguida por Abraham e colaboradores. Utilizando penicilina concentrada, fizemos provas de bacteriostase com numerosas raças de estafilococos e com várias de estreptococos, pneumococos, gonococos e algumas do grupo coli-tífico. A fotografia nº 3 mostra a área circular de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* pela penicilina.



FOTOGRAFIA n. 3

Cultura de *Staphylococcus aureus* com área circular de inibição pela penicilina.

As provas com estafilococos e com os germes do grupo coli-tífico, foram feitas em placas de agar comum, e, os resultados foram observados 24 horas após incubação em estufa a 37°C. Usamos, para as provas com estreptococos e pneumococos, placas de agar-sangue, e, para as com gonococos, placas de agar-ascite. A leitura dessas provas foi feita 48 horas após incubação a 37°C. Os resultados obtidos estão resumidos no quadro I.

QUADRO I

N. das culturas	Bactérias examinadas	Diâmetro médio em milímetros de inibição total do crescimento pela penicilina	Proveniência
<i>Staphylococcus:</i>			
4	S. aureus	22,0	Sicose
5	S. aureus	21,0	Laboratório
9	S. aureus	19,5	Garganta
12	S. aureus	19,0	Liquor
13	S. aureus	20,0	Peritonite
16	S. aureus	19,0	Furúnculo
21	S. aureus	25,0	Pus
23	S. aureus	21,0	Sangue
24	S. aureus	23,0	Bile C.
25	S. aureus	25,0	Pênfigo
26	S. aureus	22,5	Furúnculo
5	S. albus	19,5	Furúnculo
6	S. albus	20,0	Urina
7	S. albus	18,0	Garganta
8	S. albus	21,0	Nariz
10	S. albus	31,0	Pus
12	S. albus	27,0	Gânglio
13	S. albus	30,0	Bile C.
9	S. citreus	21,0	Úlcera gástrica
16	S. pyogenes	25,0	Hemocultura
1.108	S. pyogenes	19,0	Hemocultura
1.114	S. pyogenes	23,0	Hemocultura
1.116	S. pyogenes	22,5	Hemocultura
4.108	S. pyogenes	24,0	Coleção
4.114	S. pyogenes	23,0	Hemocultura
4.115	S. viridans	17,0	Hemocultura
4.116	S. viridans	15,0	Hemocultura
4.117	S. viridans	15,0	Dente
<i>Diplococcus:</i>			
1	D. pneumoniae (tipo I)	24,0	[Departamento de Saúde de Nova York
2	D. pneumoniae (tipo II)	22,5	
3	D. pneumoniae (tipo III)	23,0	

QUADRO I (cont.)

<i>N. das culturas</i>	<i>Bactérias examinadas</i>	<i>Diâmetro médio em milímetros de inibição total do crescimento pela penicilina</i>	<i>Proveniência</i>
	<i>Neisseria:</i>		
3	<i>N. gonorrhoeae</i>	22,5	Uretrite
4	<i>N. gonorrhoeae</i>	22,0	Uretrite
	<i>Escherichia:</i>		
7	<i>E. coli</i>	0	Fezes
9	<i>E. coli</i>	0	Hemocultura
	<i>Eberthella:</i>		
1.242	<i>E. typhosa</i>	0	Hemocultura
1.276	<i>E. typhosa</i>	0	Hemocultura

IV. CONCLUSÕES

1. O extrato de levedura desde a concentração de 0,1% acelera o crescimento do *Penicillium notatum*.
2. Substituindo-se, no meio Czapek-Dox modificado, o nitrato de sódio por igual percentagem de nitrito de sódio, verifica-se um retardamento acentuado no desenvolvimento desse cogumelo.
3. A dextrose favorece o crescimento do cogumelo assim como a pigmentação do micélio.
4. O *P. notatum* fermenta a dextrose, sacarose, maltose e glicerina, sem produção de gás. Não fermenta adonita, amido, arabinose, dextrina, dulcita, esculina, galactose, inulina, inosita, lactose, levulose, manita, rafinose, salicina, trealose e xilose. Não acidifica nem coagula o leite. Não liquefaz a gelatina; não produz indol e não reduz nitratos a nitritos.
5. Desse germe pode-se obter culturas secas que conservam, integralmente, por longo tempo (10 meses de observação), os caracteres morfológicos, as propriedades bioquímicas, inclusive, a faculdade de produzir penicilina.
6. Os esporos de *P. notatum* não são patogênicos para coelhos, cobaias e camundongos.
7. O meio de Czapek-Dox modificado por Clutterbuck, Lovell e Raistrick, mostrou-se superior ao caldo Hottinger para a produção de penicilina.

8. O catião zinco, que estimula o *Aspergillus niger* na produção do ácido cítrico, não exerce influência sobre a elaboração da penicilina, a qual por Chain é considerada ácido orgânico.

9. O método em placas, para determinação do poder bacteriostático da penicilina, não é tão preciso como o das diluições seriadas em tubos, porém foi o que mais usamos por ser mais rápido e econômico e porque, nessas primeiras provas, visamos mais o aspecto qualitativo do que o quantitativo.

10. Os estafilococos (*aureus*, *albus* e *citreus*), os estreptococos (grupo *pyogenes*), os pneumococos e os gonococos sofreram nítida e semelhante inibição no crescimento pela penicilina.

11. Os estreptococos do grupo *viridans* foram também inibidos, porém, revelaram uma sensibilidade menor.

12. As 2 raças de *Escherichia coli*, e as 2 de *Eberthella typhosa* examinadas, mostraram-se insensíveis à ação bacteriostática da penicilina.

SUMMARY

1) The yeast-extract of at least 0,1% concentration speeds up the growth of the *Penicillium notatum*.

2) By changing, in the modified Czapek-Dox' medium, sodium nitrate by an equal quantity of sodium nitrite, one observes a very remarkable delay in the growth of this mould.

3) The dextrose helps the growth of the mould as well as the pigmentation of the mycelium.

4) The *P. notatum* ferments dextrose, sucrose, maltose, and glycerol, without production of gas. It has no action on: adonitol, starch, arabinose, dextrin, dulcitol, esculin, galactose, inulin, inositol, lactose, levulose, mannitol, raffinose, salicin, trehalose and xylose. The milk is not acidified or coagulated by it. Gelatin is not liquefied; indol is not formed and nitrites are not produced from nitrates by it.

5) From this organism we could get dry cultures that maintain, for a long time, (10 months of observation), entirely morphologic characters, biochemical activities, including the ability to produce penicillin.

6) The spores of *P. notatum* are not pathogenic for rabbits, guinea-pigs or mice.

7) The Czapek-Dox' medium modified by Clutterburck, Lovell and Raistrick has shown itself to be superior to Hottinger's broth in the production of penicillin.

8) The zinc cation that helps the *Aspergillus niger* in the production of citric acid, is inactive in the production of penicillin that is recognized by Chain as an organic acid.

9) The plate method for determining the bacteriostatic power of penicillin, is not so exact as the method of tubes with dilutions in series, but it has been used by us because it is quicker and more economic and because, in these first researches, we aimed more at qualitative than at the quantitative aspect.

10) The growth of *Staphylococcus (aureus, albus and citreus)*, *Streptococcus (pyogenes group)*, *Pneumococcus* and *Gonococcus* was distinctly and always, in a similar manner, inhibited by the penicillin.

11) The growth of *Streptococcus* of the *viridans group* was also inhibited but they showed less sensitiveness.

12) The two strains of *Escherichia coli* and those of *Eberthella typhosa* that were researched by us showed themselves as without sensitiveness to the bacteriostatic action of penicillin.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P. — 1941 — Lancet, 2 (25), 762.
ABRAHAM, E. P. e outros — 1941 — Lancet, 2 (7), 177-188.
ALEXANDER, A. e outros — 1928 — Dermatomykosen, Berlin (Vol. XI de Handbuck der Haut: Und geschlechtskrankheiten, publicado sob a direção de J. Jadasson).
ALMEIDA, F. F. — 1939 — Mycologia Médica, ed. Cia. Melhoramentos de São Paulo.
BESSEY, E. A. — 1935 — A Text-Book of Mycology, Philadelphia.
CHAIN, E. e outros — 1940 — Lancet, 2, 226-228.
CHAIN, E. — 1941 — Lancet, 2 (25), 762.
CLUTTERBUCK, P. W.; LOWELL, R. e RAISTRICK, H. — 1932 — Biochem. Journal — 26, 1907-1918.
DODGE, C. W. — 1935 — Medical Mycology, Ed. C. W. Mosby Company.
FLEMING, A. — 1929 — Brit. Journ. Exp. Path., 10, 222-236.
FLEMING, A. — 1941 — Lancet, 2 (25), 761.
REID, R. D. — 1935 — Journal of Bacteriology, 29, 215-221.
THOM, C. — 1930 — The Penicillia, Baltimore.

LEVEDUROSES HUMANAS (*)

(Visão geral do assunto)

FLORIANO DE ALMEIDA

1.º Assistente e docente-livre de Microbiologia da Faculdade de Medicina

CARLOS DA SILVA LACAZ

2.º Assistente substituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina

OLGA DE BARROS

Química do Instituto Adolfo Lutz

CAPÍTULO I — Considerações gerais sobre as leveduroses humanas. Importância do seu estudo.

CAPÍTULO II — Classificação e estudo das principais leveduroses humanas. Diagnóstico clínico. Orientação terapêutica.

1 — Leveduroses tegumentares (cutâneo mucosas) e Levedurides.

2 — Estomatite cremosa ou sapinho bucal.

3 — Língua negra pilosa.

4 — Vulvo-vaginites por leveduras.

5 — Pneumomicoses por leveduras.

6 — Levedurose generalizada.

7 — Granuloma criptocócico { Forma localizada
Forma generalizada

8 — Esprú (?)

CAPÍTULO III — Diagnóstico de laboratório das leveduroses humanas.

CAPÍTULO IV — Orientação no estudo micológico das leveduras patogênicas.

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS LEVEDUROSES HUMANAS IMPORTÂNCIA DO SEU ESTUDO

Por leveduroses compreendemos todas aquelas micoses determinadas por cogumelos do grupo das leveduras. A expressão le-

(*) Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Instituto Adolfo Lutz.

vedura é aqui empregada numa acepção ampla, representando os fungos que nos tecidos se reproduzem por um processo de brotamento ou gemulação.

Tais leveduras, de tão grande importância industrial, apresentam sob o ponto de vista médico grande interesse, pois são capazes de determinar, em condições especiais, blastomicoses de aspectos clínicos os mais variados.

São estas leveduras patogênicas, verdadeiras ou falsas, filamentosas ou não, que provocam o aparecimento das “blastomicoses propriamente ditas” ou leveduroses.

Flavio Niño separa em 3 grupos as chamadas blastomicoses:

- 1.º grupo — *Blastomicoses propriamente ditas*
- 2.º grupo — *Parablastomicoses* — Gr. paracoccidióidico
Síndrome de Gilchrist
Histoplasmose
- 3.º grupo — *Pseudoblastomicoses* — Gr. coccidióidico
Gr. rinosporidiósico
Gr. cromomicósico

As blastomicoses propriamente ditas são as produzidas por leveduras.

As parablastomicoses são determinadas por cogumelos que, sem ser leveduras, podem em algumas circunstâncias se apresentar ao exame microscópico como células gemulantes que recordam em sua morfologia as leveduras verdadeiras.

As pseudoblastomicoses são produzidas por fungos que em nenhum momento apresentam a forma de reprodução por brotamento ou gemulação. Neste trabalho, estudaremos apenas as “blastomicoses propriamente ditas” ou leveduroses, encarando a necessidade do seu estudo clínico e micológico.

Grande número de formas clínicas interessantes estão enquadradas no grupo das leveduroses humanas, determinadas por cogumelos pertencentes às grandes famílias *Torulopsidaceae*, de Ciferri e Redaelli e *Saccharomycetaceae*.

Redaelli, em seu trabalho — *L'attuale Sistemazione delle cosiddette “blastomicosi”* — separa as blastomicoses em 2 grandes grupos: as verdadeiras blastomicoses e as falsas, isto é, as produzidas por leveduras, ascógenas ou anascógenas, e aquelas nas quais se inclui a maior parte das chamadas “blastomicoses americanas”.

As leveduroses humanas ou blastomicoses propriamente ditas necessitam ser melhor conhecidas para que se possa então diagnosticá-las com maior frequência. Flavio Niño, em sua brilhante monografia sobre as blastomicoses na Argentina, afirma textualmente: "En efecto, grande ha de ser el número de estas afecciones que se rotulan como otras tantas: lúes, tuberculosis, leishmaniosis y neoplasias diversas por colegas que no las tienen en cuenta ante un diagnóstico diferencial. Si se piensa en la gravedad del pronóstico que significa un diagnóstico de blastomicosis por granuloma criptocócico o por alguno de los granulomas que forman el grupo de las parablastomicosis y el de las pseudoblastomicosis, se comprenderá fácilmente la importancia que tiene el mejor conocimiento de estas afecciones y la necesidad imperiosa de poder establecer en forma precoz la verdadera naturaleza de un tal padecimiento, ya que en ello, va muchas veces asegurado el éxito de un tratamiento y la vida de un ser humano".

As leveduras, afirma Mackinnon, necessitam geralmente alterações especiais da pele ou mucosas para poder vegetar sobre elas, porém tais alterações não bastam; é necessário que o cogumelo possua um certo grau de virulência que o torne apto a viver parasiticamente.

Segundo o mesmo autor é possível que amostras particularmente virulentas não necessitem de alterações prévias dos tecidos para determinar o aparecimento de lesões.

Numerosas manifestações clínicas são provocadas pelas leveduras e o conhecimento dessas formas anátomo clínicas interessa a todos os especialistas.

De um modo geral, as leveduroses comportam bom prognóstico, a não ser no granuloma criptocócico em que as lesões são generalizadas, comprometendo órgãos vitais por excelência.

A bibliografia médica estrangeira referente às leveduroses humanas, em seu duplo aspecto — clínico e micológico, é a mais rica possível. Em nosso meio, escassas são as publicações a respeito, talvez pela ignorância dos conhecimentos micológicos.

Este nosso trabalho tem por finalidade máxima chamar a atenção dos clínicos em geral e dos homens de laboratório para a verificação e comprovação diagnóstica de um grande número de leveduroses, todas elas apresentando-se mais ou menos comumente na clínica, mas passando despercebidas, ignoradas por alguns ou não diagnosticadas exatamente por outros.

A Seção de Micologia do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina está aparelhada para executar diagnósticos micológicos de toda a levedurose e prazerosamente coloca-se à disposição dos colegas interessados.

CAPÍTULO II

CLASSIFICAÇÃO E ESTUDO DAS PRINCIPAIS LEVEDUROSES HUMANAS. DIAGNÓSTICO CLÍNICO. ORIENTAÇÃO TERAPÊUTICA

Na classificação das leveduroses humanas, adotamos um critério puramente clínico. Pareceu-nos tal idéia a mais razoável, pois uma classificação de ordem micológica dificultaria a boa compreensão do assunto.

Estudando, resumidamente, cada levedurose de per si, demos a cada capítulo um cunho eminentemente prático. Estabelecemos os caracteres gerais de cada levedurose, a sua diagnose clínica e o seu tratamento. Deixamos para um capítulo à parte tudo o que se refere ao diagnóstico de laboratório das blastomicoses propriamente ditas. Foi a seguinte a classificação que esboçamos das principais leveduroses humanas:

- 1 — Leveduroses tegumentares (cutâneo-mucosas) e Levedurides.
- 2 — Estomatite cremosa ou sapinho bucal.
- 3 — Língua negra pilosa.
- 4 — Vulvo-vaginites por leveduras.
- 5 — Pneumomicoses por leveduras.
- 6 — Levedurose generalizada.
- 7 — Granuloma criptocócico { a) Forma localizada.
 b) Forma generalizada.
- 8 — Esprú (?).

1 — *Leveduroses tegumentares (cutâneo-mucosas) e levedurides*

Durante muito tempo as leveduras foram consideradas como agentes saprofíticos da pele e das mucosas, não se acreditando em sua patogenicidade. No entanto, em diversas lesões tegumentares, cutâneo-mucosas, foram isoladas leveduras que se mostraram patogênicas para os animais de laboratório, fato este que levou vários pesquisadores a estudar melhor o assunto.

Na França, Ravaut e Rabeau pesquisaram as diferentes reações humorais que se processam no organismo após o ataque pelas leveduras e constataram resultados positivos, persistentes e suficientemente específicos. Outros dermatologistas de renome se ocuparam do assunto, confirmando as conclusões tiradas por Ravaut e Rabeau. Estes mesmos autores verificaram em certos doentes a ocorrência de lesões secundárias, determinadas por leveduras, lesões estas que se assemelhavam ora a uma paraqueratose, ora a um psoríasis, ora a um eczema. A tais lesões, Ravaut e Rabeau denominaram de "levurides" ou, melhor diremos "levedurides".

Para maior facilidade de estudo, apresentaremos a seguir um quadro geral das principais leveduroses tegumentares, para depois estudarmos as levedurides.

LEVEDUROSES TEGUMENTARES (CUTÂNEO-MUCOSAS)	1. <i>Lesões de intertrigo</i>	a. dobra ínguino crural e órgãos genitais
	2. <i>Onixis e perionixis</i>	b. dobra sub-mamária, axilar, retro-auricular e umbigo
	3. <i>Leveduroses da boca e tubo digestivo</i>	c. espaços interdigitais dos pés e mãos.
	4. <i>Lesões cutâneas discutidas</i>	a. sapinho — glossites — queilites
	5. <i>Queratites</i>	b. língua negra pilosa
	6. <i>Leveduroses cutâneas generalizadas do recém-nascido e do adulto.</i>	c. lesões da comissura dos lábios, etc.

1. *Lesões de Intertrigo:*

Segundo Ravaut e Rabeau o intertrigo por leveduras pode se localizar em diferentes pontos do organismo, assumindo aspectos clínicos os mais interessantes.

Na dobra ínguino crural, a lesão se inicia com uma placa avermelhada, de contorno irregular, geográfico. Sobre esta placa há geralmente um exsudato cremoso.

Muitas vezes, nas bordas da lesão verifica-se o aparecimento de uma zona com vesículas, algumas pustulosas. O prurido é intenso.

Tais lesões podem atingir a bolsa escrotal, o penis e a região interglútea, chegando em alguns casos ao reto. Na mulher a vulva e a vagina podem ser atingidas.

O intertrigo por leveduras pode se localizar igualmente nas dobras sub-mamárias, na aréola dos mamilos, nas dobras axilares, retro-auriculares e algumas vezes na cicatriz umbelical. Tais lesões se iniciam quasi sempre por uma placa avermelhada, mal delimitada, seguida por uma zona pustulosa. Recobrando as lesões, um ligeiro exsudato.

Nos espaços interdigitais, o intertrigo por leveduras quasi sempre se manifesta por meio de pequenas fissuras, recobertas por restos de epiderme macerada. O prurido é intenso, podendo coexistir lesões de onixis ou perionixis.

Nesses casos, verifica-se que o calor e particularmente o contacto com a água intensificam as lesões. Segundo Niño, estas lesões de intertrigo se diferenciam das produzidas por dermatófitos, pelo carater inflamatório mais agudo, com aspecto mais úmido que seco. Devemos dizer que vários AA. negam a existência do intertrigo por leveduras, atribuindo a estas um papel secundário. Mackinnon, no Uruguay, entre muitos outros, aceita, com numerosas provas, a existência desses intertrigos por leveduras. Mackinnon, em seu trabalho sobre a "Erosio interdigitalis", entre outras conclusões, aponta a seguinte:

na erosão interdigital da mão, com o tipo clínico do intertrigo por leveduras, comprova-se a ausência de *Streptococcus* e de dermatófitos, e a presença de leveduras desde o início da enfermidade.

2. *Onixis e perionixis:*

As onixis por leveduras são raras, ao contrário das perionixis.

Nas onixis, as unhas tornam-se espessas, de superfície irregular, cheias de sulcos e pequenas depressões e é difícil pelo exame clínico diferenciá-las das onixis por dermatófitos.

Nas perionixis as lesões se iniciam com uma vermelhidão dolorosa da ranhura peri-ungueal, o dedo se deforma, a pele torna-se tensa e dolorosa.

O assunto vem muito bem tratado no livro "Diseases of the Nails", de autoria de V. Pardo-Castello (1941). Outros autores, entre eles Flavio Niño, Negroni e Mackinnon se ocuparam do assunto. Niño diz que as onixis e perionixis por leveduras são frequentes no sexo feminino, (lavadeiras e cosineiras, particularmente); as perionixis têm geralmente um início agudo, depois passam à cronicidade. Niño verificou reativação dos fenômenos inflamatórios por ocasião do período menstrual.

3. Lesões da boca e tubo digestivo:

Em capítulo especial, pela sua grande importância, trataremos da estomatite cremosa ou sapinho bucal, assim como da língua negra pilosa. Leveduras diversas podem se localizar na língua, determinando uma glossite, geralmente ulcerativa e superficial, como em um caso publicado por dois de nós (Almeida e Lacaz). As glossites blastométicas seriam, para alguns AA., formas circunscritas de um estomatite cremosa.



FIG. 1

Glossite ulcerativa blastomictica por cogumelo do gênero *Candida*.

Lesões da comissura dos lábios por leveduras são frequentes e se confundem com as produzidas por *Streptococcus*. Freund em-

prega a expressão de micose inter-labial para diferenciá-la da chamada "perlèche" que seria determinada por um *Streptococcus* (*S. plicatis* de Lemaître). Queilites descamativas por leveduras têm sido descritas. Dedicamos atenção especial às enterites determinadas pelas leveduras no capítulo destinado ao esprú.

4. Lesões cutâneas discutidas:

Ravaut e Rabeau, estudando as leveduroses cutâneas, descrevem outras lesões por leveduras, mas que não são aceitas pela maioria dos dermatologistas. Entre tais lesões, figuram:

- a) *Foliculites descalvantes* — observadas em 1924 por Castellani, consistindo em pequenos furúnculos do couro cabeludo com queda dos pêlos nas regiões atingidas.
- b) *Seborréia* — Sabouraud em 1904 achou que a seborréia era determinada por uma levedura pertencente ao gênero *Pityrosporum*. Depois, Morris Moore, entre outros, estudou o assunto e considerou o *Pityrosporum ovale* como sendo o agente da dermatite seborréica. Quando a seborréia atinge o couro cabeludo recebe entre nós o nome de "caspa" ou "dandruff" em inglês. É moléstia universal, e Moore acredita ter reproduzido experimentalmente a dermatite seborréica. O mesmo pesquisador tem isolado o cogumelo, com relativa facilidade, semeadando as escamas em wort-agar, pH 4,8.
- c) *Psoriasis* — Wachowiak e Fleischer (1929) acharam que as leveduras desempenhavam um papel importante na etiologia do psoriasis, o que não foi aceito por outros pesquisadores.
- d) *Ulcerações cutâneas* — Ramel, em alguns tipos de ulcerações cutâneas, encontrou numerosas leveduras e os doentes reagiram com os extratos dessas mesmas leveduras quando eram inoculados por via intradérmica.

5. Queratites:

As queratites determinadas por leveduras são raras e quasi sempre se acompanham de uma conjuntivite. As queratites por

leveduras podem assumir uma forma ulcerativa, nodular ou infiltrante. Niño, em sua monografia sobre as blastomicoses na Argentina, refere-se a uma observação do Drs. Romano Jalour, Negri e Balsa, em cujo doente se observava uma conjuntivite rebelde, com ulceração da córnea, de tipo serpiginoso, irregular e de bordas infiltradas. Tais lesões melhoraram lentamente com o emprego de atropina, pomada de óxido amarelo de mercúrio e aplicações tópicas de nitrato de prata.

6. *Leveduroses cutâneas generalizadas:*

Em crianças desnutridas são frequentes dermatites vesiculosas ou lesões de intertrigo que atingem territórios cutâneos diferentes. Geralmente, a tais lesões se associam o sapinho e distúrbios intestinais.

Lesões eritêmato escamosas ou eritêmato vesiculosas aparecem igualmente no recém-nascido, na 2.^a infância e no adulto desnutrido, particularmente. Aliás, Bloch mostrou o papel do "terreno" no aparecimento de todas as leveduroses. É sabido que o sapinho bucal e lesões de intertrigo são frequentes nos diabéticos.

TRATAMENTO: Nas lesões cutâneas (intertrigos, particularmente) aconselham-se:

1. Aplicações da pomada de Whitfield:

Banha	30 gr.
Ácido benzóico	1 gr.
Ácido salicílico	1 a 2 gr., ou

2. Tintura de iodo diluído

3. Lugol

4. Mercúrio cromo a 2%.

Nas lesões de onixis e perionixis, o melhor tratamento é o radioterápico, como aconselha Pardo-Castello.

Curativos tópicos com a fórmula preconizada por Carini:

Ácido salicílico	1 gr.
Formol	0,40 gr.
Álcool	20 cc.

Baliña, citado por Flavio Niño, trata os intertrigos por leveduras da seguinte maneira:

1. Repouso.

2. Curativos úmidos com sol. fisiológica até diminuir o estado inflamatório das lesões.

3. Empregar com o mesmo objetivo o linimento óleo calcáreo.

4. Como fungicida, usar o borato de sódio a 40%, a pomada de resorcina a 3,6%, crisarrobina a 1%, ou o álcool iodado de Sabouraud.

Levedurides (ou levurides de Ravaut e Rabeau, oidiomíctides de Bloch, moniliíctides de Hopkins).

As levedurides consistem em uma reação cutânea secundária, estéril, determinada pela reativação de uma lesão primária por leveduras.

Tais lesões podem ser divididas em 2 tipos, de acordo com Ravaut e Rabeau:

- a) tipo paraqueratósico
- b) tipo eczematoso

Bloch descreveu levedurides de forma pápulo-liquenóide. Diversos fatores determinam o aparecimento dessas levedurides, tais como sinapismos, intoxicação medicamentosa ou alimentar, calor, frio, etc.. A própria injeção de levurina ou levedurina pode desencadear a reação secundária, alérgica.

Nas levedurides devemos sempre pesquisar o foco primário. Ravaut e Rabeau, de cujo trabalho extraímos um resumo para este capítulo, acham que dois elementos entram em jogo para produzir uma leveduride:

- 1 — um estado de sensibilização;
- 2 — a chegada, ao nível das células epidérmicas, de um corpo vulnerante ou princípio tóxico de natureza micótica. Da combinação desses 2 elementos nasce a deflagração, donde a leveduride não é senão o efeito, dizem aqueles mesmos autores.

TRATAMENTO: Tratar o foco primário. Diminuir os fenômenos de sensibilização com os métodos atuais de dessensibilização.

2 — *Estomatite cremosa*

Sinonímia — Sapinho bucal, *Aphthae albae infantum* (Galeno) Muguét, Blanchet, Millet, *Stomatite cremeuse* na literatura francesa. Soor, na literatura alemã. Thrush na Inglaterra. Mughetto na Itália. Sapillo e mal blanco na Espanha. *Aphthae lactamen* (Sauvage.) *Aphthae lactantium* (Batman).

A estomatite cremosa, relativamente frequente em certas crianças, manifesta-se quasi sempre na primeira infância com o

aparecimento de placas esbranquiçadas ou pseudo membranas, semelhantes a grumos de leite coalhado. Esta pseudo membrana inicialmente é muito aderente à mucosa e quando removida provoca um sangramento desta última. Há casos rebeldes que aparecem em crianças com extremo grau de debilidade orgânica. Verifica-se, então, ao lado do sapinho bucal, perda de peso, febre, distúrbios gastro-intestinais, muitas vezes intertrigos na região interglútea, e às vezes propagação das lesões ao faringe, esôfago, estômago, brônquios e pulmões. Em 1934, Inah Morais de Camargo, defendendo sua tese de doutoramento em S. Paulo, estudou 60 casos de sapinho bucal e verificou ser o gênero *Mycotorula* (igual a *Candida*) o mais frequente causador desta micose em nosso meio. A mesma autora observou que o sapinho bucal é bastante comum na cidade de S. Paulo.

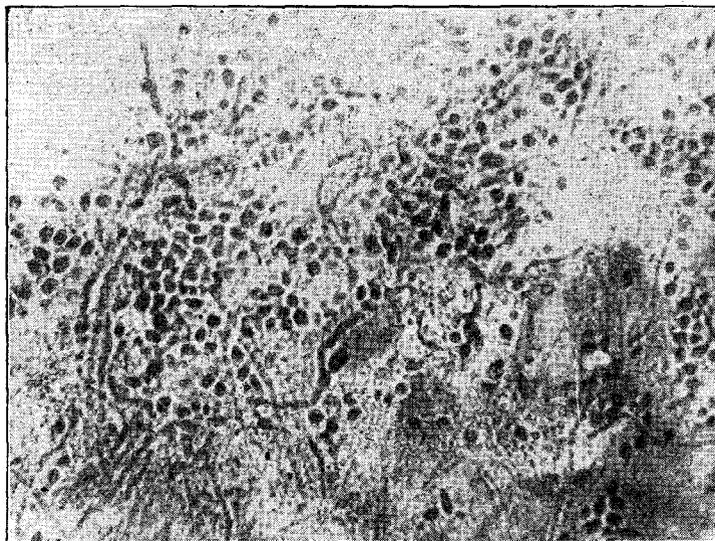


FIG. 2

Aspecto microscópico do exame de material retirado das placas de sapinho bucal.

Shlossmann considera os agentes do sapinho como hóspedes habituais da boca dos lactantes; seriam saprófitas que passariam a parasitos com a diminuição de resistência do organismo. Nas crianças acima de 6 anos de idade, afirma aquele autor, 38,5% a 54% contêm na cavidade bucal fungos do sapinho, particularmente a antiga *Monilia albicans*.

O sapinho bucal quando aparece em indivíduos adultos quasi sempre indica mau prognóstico. Nos indivíduos diabéticos, tuberculosos e nas moléstias consuntivas é comum o aparecimento do "sapinho bucal".

Todd, estudando a flora micótica da boca e garganta de 1.000 pessoas normais, verificou que 14,7% possuíam leveduras na boca ou garganta. A levedura frequentemente isolada dos casos de sapinho é a *Candida albicans*, capaz de determinar igualmente outras lesões, tais como vulvovaginites, intertrigos, onixis e perionixis.

TRATAMENTO: 1.º — Manter em boas condições o estado geral do paciente. 2.º — Tratamento local com soluções alcalinas ou com solução de nitrato de prata (2 gr.), Glicerina (20 cc.), Água destilada (80 cc.). Colargol a 2%. Azul de metileno. Lavagens da boca com sol. NaHCO_3 a 5%.

3 — Língua negra pilosa

Sinonímia — Hiperqueratose melânica lingual. *Glossophytia melanica*. *Melanotrichia* lingual. Antracose lingual. Queratomicose lingual. Língua pilosa nigra. Língua negra et pilosa, etc.

A língua negra pilosa parece ser provocada, segundo as idéias mais recentes, por cogumelos do grupo das leveduras. Os sintomas principais desta levedurose são os seguintes: na altura do V lingual surgem formações filamentosas escuras, que depois se estendem para frente e para os lados, fazendo lembrar um tapete ou tecido veludoso. Os pacientes atestam então um empastamento da língua e às vezes dificuldade na deglutição. Tais filamentos, que conferem à língua o aspecto piloso tão característico, são considerados pelos autores como papilas filiformes hipertrofiadas e hiperqueratinizadas. Geralmente, os pacientes, pela manhã, praticam uma "toilette" lingual, raspando a superfície deste órgão, afim de aliviar a sensação de espessamento ou de empastamento. Retira-se, deste modo, uma substância mucilaginosa, contendo formações filamentosas escuras, ao lado de numerosos micróbios entre os quais algumas leveduras. Fato digno de nota é que quasi todos os pacientes atacados por este processo são tabagistas inveterados, podendo-se até certo ponto estabelecer uma relação entre o fumo e a lesão. A figura n.º 3 mostra um caso de língua negra pilosa observado por Almeida, Lacaz e Fava Neto. A etiologia da língua

negra pilosa foi e tem sido muito discutida. Em 1890 Wallerand defendeu a hipótese da teoria nervosa, argumentando que a língua negra geralmente se observava em indivíduos nervosos e emotivos. Para outros, tal afecção resultaria de uma irritação local por diversas substâncias, e os cogumelos seriam simples agentes saprofiticos, instalados neste terreno previamente alterado. Grande variedade de cogumelos tem sido isolados por diferentes autores. Dodge cita os seguintes: *Oospora catenata*, *Oospora fragilis*, *Cryptococcus cooperi*, *Cryptococcus linguae pilosae*, *Castellania linguae pilosae*. Pensamos que a causa primária da hiperqueratose lingual seja uma irritação determinada em certos indivíduos pelo uso inveterado do fumo; as leveduras instalar-se-iam neste terreno em ótimas condições para a sua multiplicação. Segundo as idéias



FIG. 3
Lingua negra pilosa.

de Almeida e Lacaz, a coloração escura da língua seria devida ao uso exagerado do fumo, cujo pigmento nicotínico impregnaria a porção queratinizada das papilas hipertrofiadas, do mesmo modo que impregna as porções córneas das polpas dos dedos de muitos fumadores.

TRATAMENTO: 1 — Abolição do fumo ou de qualquer causa irritante da mucosa lingual. 2 — Lavagens da boca com antissépticos brandos. 3 — Emprego da vitamina A em altas doses.

4 — *Vulvo-vaginites por leveduras*

Entre as numerosas causas de vaginites e corrimentos vaginais, destaca-se o “sapinho vaginal”, denominação popular conferida a uma doença de natureza fúngica, e que se apresenta geralmente sob a forma de um induto pseudo membranoso, de coloração esbranquiçada ou levemente amarelada e aderente às paredes da vagina. Parece haver uma relação estreita entre o sapinho vaginal e o bucal dos recém-nascidos; estes se contaminariam durante sua passagem pelo canal vaginal onde se encontrariam os cogumelos agentes do sapinho. Esta hipótese merece ser levada em consideração, pois o sapinho vaginal é relativamente frequente nas mulheres grávidas conforme tem sido observado em alguns centros médicos. Negroni, na Argentina, acredita que 33% das mulheres grávidas apresentam o sapinho vaginal em seus diferentes aspectos clínicos. Woodruff e Hesseline (resumo de um trabalho publicado no Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana, ano 18, nº 3, Março de 1939) realizaram cultivos vaginais em 402 mulheres no 3º trimestre da gravidez e estudaram 90 casos de sapinho bucal dos recém-nascidos. O coeficiente de micose vaginal segundo aqueles autores parece associar-se com a situação econômica e higiênica das mulheres em gestação, correndo os futuros recém-nascidos 35 vezes mais perigo de manifestar o sapinho que os filhos de mulheres indenes de infecção. A frequência do sapinho vaginal naquelas mulheres foi de 28%; as indigentes pretas apresentavam-se com a moléstia em maior proporção que as brancas e as brancas mais ilustradas quasi não eram atacadas pela micose vaginal. Claudius P. Jones e Donald S. Martin estudaram 68 amostras de leveduras, isoladas do trato vaginal de mulheres grávidas e não grávidas, sendo que dessas amostras 52 foram isoladas das primeiras mulheres e 16 das segundas. Vemos, pois, que a percentagem de cogumelos isolados da vagina das mulheres em período de gravidez tem sido apreciável e este fato pode explicar até certo ponto o sapinho bucal dos recém-nascidos. Flavio Niño, explicando a patogenia do sapinho vaginal, acha que dois mecanismos de contágio devem ser lembrados:

- a) Contaminação pela água de lavagens vaginais, e
- b) Contágio sexual.

Escomel, no Perú, descreve verdadeiras pequenas epidemias de vulvo-vaginites nos hospitais peruanos. Negróni isolou em 8% de mulheres que não estavam grávidas a *Mycotorula albicans*. Parece ser um fato estabelecido de que tal levedura seja igualmente o agente mais comum do sapinho vaginal. Castelaní e Taylor distinguem 2 tipos de sapinho vaginal: o purulento e o membranoso. De um modo geral a vulvo-vaginite blastomicética aparece no último trimestre da gravidez ou em mulheres diabéticas, produzindo ora corrimento associado a edema das paredes vaginais, com prurido vulvar, ora membranas amareladas semelhantes a grumos de leite coalhado.

TRATAMENTO: 1 — Ferver a água a ser empregada nas lavagens vaginais. 2 — Lavagens com lisofórmio, oxiacianeto de mercúrio, permanganato de potássio ou bicarbonato de sódio. A solução de bicarbonato de sódio a 2% parece ser o melhor medicamento. Outros autores empregam embrocações de azul de metileno a 2% ou violeta de genciana a 2%.

5 — *Micoses pulmonares por leveduras*

Hoje em dia maior atenção tem sido dispensada às micoses pulmonares, cuja importância em patologia pulmonar é de enorme interesse prático.

Entre as diversas formas de pneumomicoses distinguem-se as produzidas por leveduras. Otavio de Magalhães, entre nós, descreveu a micose pulmonar pelo *Neogeotrichum pulmoneum* e posteriormente Samuel Libanio e Mario Dias Costa se ocuparam do mesmo assunto. Os AA. argentinos, entre os quais Niño, afirmam que as chamadas “bronco-pulmonites blastomicéticas” apresentam geralmente um decurso crônico ou sub agudo atacando preferencialmente os indivíduos adultos. O quadro clínico nada mostra de particular ou de específico. Os doentes apresentam-se de um modo geral febrís, escarros muco purulentos ou hemoptóicos, perda de peso, anorexia e dores localizadas no torax. Somente o laboratório consegue então elucidar o diagnóstico.

A bibliografia médica estrangeira é riquíssima em observações de micoses broncopulmonares determinadas por leveduras dos gêneros os mais diversos.

Recentemente, na Argentina, Manoel C. Blanco, em sua tese de doutoramento sobre as micoses pulmonares dedica especial atenção ao capítulo das pneumomicoses por leveduras. Naquele mesmo país, Flavio Niño, Negroni, Mazza e tantos outros publicaram observações de blastomicoses pulmonares propriamente ditas.

No Uruguay, Talice, Mackinnon e outros estudaram o assunto sob vários aspectos.

Castellani foi um dos primeiros pesquisadores a chamar a atenção dos estudiosos para o papel patogênico das *Monilias* sobre o parênquima pulmonar. Na Europa, Boeri e Iacono, Ciferri e Redaelli, Sartory e Bailly, Perin e muitos outros, em uma série de publicações, abordaram a questão, quer no terreno clínico, quer no micológico. Entre nós, José Maria Gomes, Pinto Carvalho e outros publicaram casos de micoses pulmonares por leveduras. Há muitos anos, dois de nós (Almeida e Lacaz), em trabalhos diversos, têm chamado a atenção da classe médica para a possibilidade da ocorrência de micoses pulmonares em nosso meio e, felizmente, inúmeros diagnósticos têm sido feitos, com enorme benefício para os enfermos.

Recentemente publicamos (Almeida e Lacaz) um trabalho sobre micoses pulmonares, obra laureada pela Faculdade de Medicina de São Paulo, e na qual dedicamos um capítulo especial ao estudo das leveduroses pulmonares.

TRATAMENTO: Iodetos, tendo-se o cuidado de verificar a sensibilidade do doente a estes medicamentos. Doses iniciais pequenas. Levantar o estado geral do doente. Vacinoterapia em alguns casos.

6 — *Levedurose generalizada*

As leveduras patogênicas, em certas condições, podem determinar lesões generalizadas.

No capítulo seguinte dedicado ao estudo do granuloma criptocócico, veremos que o agente desta micose — o *Cryptococcus neoformans*, determina quasi sempre múltiplas lesões, em órgãos vitais por excelência, razão pela qual o prognóstico desta moléstia é sempre o mais reservado possível.

Na literatura médica, há casos descritos de “moniliase generalizada” em que o ponto de partida das lesões foi representado por um sapinho bucal.

Entre nós, Moses e Gaspar Viana, em 1913 publicaram nas Memórias do Instituto Osvaldo Cruz um caso de micose generalizada por uma levedura que eles rotularam naquela época como sendo o *Proteomyces infestans* (Moses e Viana, 1913) e que Puntoni denomina de *Trichosporon infestans* (Moses e Viana) Puntoni 1936.

O doente, de 18 anos de idade, cocheiro, apresentou-se ao serviço do Prof. Terra, na Santa Casa, do Rio de Janeiro, em estado de confusão de idéias, razão pela qual a anamnese foi prejudicada. O exame objetivo e subjetivo revelou: grande fraqueza geral, cefaléia, locomoção difícilima, incoordenação motora, numerosos e pequenos abscessos localizados preferencialmente nos membros superiores e inferiores, empastamento abdominal profundo, temperatura elevada e flictenas sobre a face. O paciente faleceu alguns dias após sua entrada no hospital.

A necropsopia revelou lesões em grande número de vísceras. Foi obtida cultura em meios de Sabouraud. O parasito mostrou-se patogênico para ratos, coelhos, cobaios e saguís, não o sendo para pombos e galinhas.

Em 1939, Negroni e Villafañe Lastra publicaram um caso de micose generalizada e mortal pelo *Trichosporon proteolyticum* n.sp. Tratava-se de uma levedurose, de origem pulmonar, com focos metastáticos no tecido celular sub cutâneo.

7 — *Granuloma criptocócico*

O granuloma criptocócico parece ser das leveduroses humanas a mais grave, comportando sempre prognóstico o mais sombrio possível.

O quadro clínico do granuloma criptocócico, determinado pelo *Cryptococcus neoformans* é variadíssimo. Os AA. norte-americanos, durante muito tempo dedicaram sua atenção para o estudo da chamada "Torula infection", modalidade clínica do granuloma criptocócico. Nestes casos a moléstia se denuncia quasi sempre com uma meningoencefalite, precedida ou não de lesões cutâneas ou pulmonares. O exame líquórico revela hipertensão, albuminúria, polinucleose e presença no sedimento de numerosos *Cryptococcus* com a sua morfologia característica.

No tecido nervoso, o parasito apresenta notavel atividade histolítica, de tal modo que se formam verdadeiros abcessos cerebrais cheios de cogumelos. As lesões meningíticas podem ser difusas ou circunscritas, exsudativas ou granulomatosas.

Interessante notarmos que na Europa predominam as lesões cutâneas, com quadros anátomo clínicos os mais diversos. Depois de longos estudos chegou-se à conclusão de que a chamada "blastomicose européia" ou "blastomicose de Busse-Buschke" nada mais era que uma modalidade clínica do granuloma criptocócico, que no caso particular se apresenta geralmente sob a forma de lesões cutâneas ulcerosas, lesões pústulo-crostosas ou verrucosas e algumas vezes abcessos subcutâneos de evolução crônica.

Ao lado das lesões cutâneas são frequentes as lesões pulmonares. Em 1941, dois de nós (Almeida e Lacaz) tiveram ocasião de estudar material do 1º caso de granuloma criptocócico no Brasil em que o doente apresentava extensas lesões pulmonares rotuladas como de tuberculose. Posteriormente, apareceram sinais de meningite e, feita a punção, isolou-se do liquor o *Cryptococcus neoformans*. As lesões ósseas no granuloma criptocócico são também frequentes.

O parasito pode determinar igualmente a formação de verdadeiros neoplasmas e daí a denominação de *Saccharomyces neoformans*, uma das primeiras denominações conferidas ao germe. Sanfelice foi o primeiro a reproduzir, em animais de laboratório, tumores de aspecto mixotomatoso, o que permitiu a diversos investigadores idealizar a teoria blastomicética dos tumores. O granuloma criptocócico determina geralmente a formação de abcessos ou quistos com aspecto mixomatoso ou gelatinoso, dentro dos quais existem numerosos parasitos.

A febre é constante e o exame hematológico revela leucocitose com neutrofilia e anemia pronunciada. O parasito, como veremos na parte de diagnóstico de laboratório, apresenta-se com morfologia característica. Trata-se de um cogumelo relativamente volumoso, com membrana de duplo contorno, tendo uma cápsula gelatinosa bem visível.

TRATAMENTO: Flavio Niño, numa série de experiências realizadas *in vitro*, com a finalidade de verificar a substância capaz de exercer uma ação fungicida sobre o parasito do granuloma criptocócico, mostrou que as soluções de Yatren a 5% em soro fisiológico exercem uma ação inibidora, e que o corpo 386B da casa Bayer o faz em menor grau. Com estas 2 substâncias foi tratado um caso observado por Niño, com ótimos resultados.

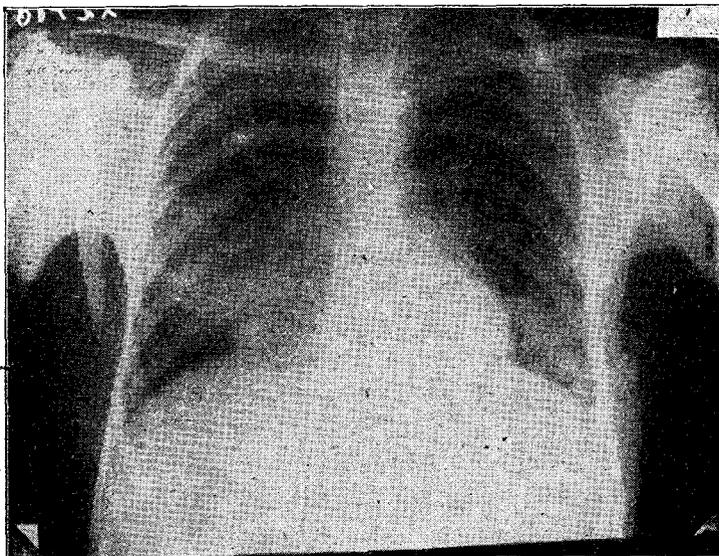


FIG. 4

Lesões pulmonares em um caso de granuloma criptocócico (Almeida e Lacaz).
Radiografia gentilmente cedida pelo Dr. Edmundo Cabral Botelho.

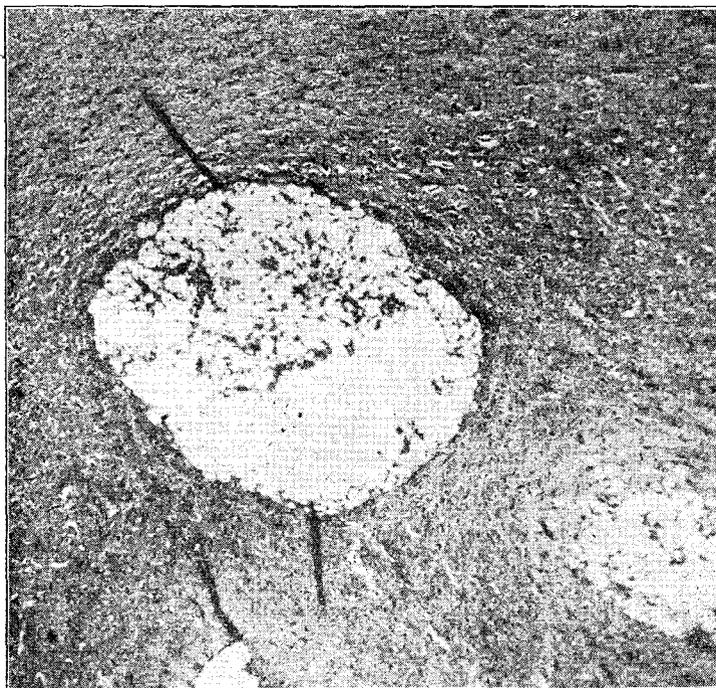


FIG. 5

Acesso cerebral pelo *Cryptococcus neoformans*, seg. Niño.

Nos animais de laboratório é possível obter-se uma imunização ativa mediante a inoculação de doses repetidas e crescentes de cultivos vivos e mortos do *Cryptococcus neoformans*.

As tentativas de imunização passiva assim como a soroterapia preventiva e curativa falharam por completo.

8 — O problema etiológico do esprú

O esprú (sprue, afta tropical, psilosis, psilosis linguae, diarréia branca, diarréia da Cochinchina, aphotoides crônica) é moléstia relativamente frequente nas regiões tropicais e sub-tropicais e de etiologia ainda muito discutida.

Alem do esprú tropical, teríamos o esprú não tropical e em estreita relação com as duas entidades, a moléstia de Gee-Herter-Heubner, todas elas tendo como carater principal a esteatorréia. Este fato levou Thaysen, citado por Alves Meira, a enquadrar as 3 moléstias com o título de “esteatorréia idiopática”.

O esprú, considerado durante muito tempo como sendo devido à ação patogênica de uma levedura — a *Monilia psilosis* (*Monilia ashfordi*) se caracteriza por um certo número de sintomas, entre os quais predominam os digestivos, caracterizados por uma estomatite aftosa, anorexia, glossite dolorosa, modificações do quimismo gástrico, dores esofageanas, náuseas, vômitos, esteatorréia, cólicas intestinais, meteorismo e algumas vezes megacolo.

Ao lado desses sintomas digestivos, encontramos alterações hematológicas (anemia severa), sintomas de ordem geral (febre, astenia, emagrecimento), sintomas endócrino-metabólicos (modificações no teor do cálcio, fósforo e glicose, perturbações ósseas, tetania), sintomas nervosos (parestesias, polinevrites, ataxia) e sintomas psíquicos (irritabilidade, neurastenia, etc.).

Segundo Anes Dias, ao se estabelecer um diagnóstico de esprú, três grandes sintomas devem estar presentes no espírito do médico:

- a) anemia
- b) estomatite
- c) descargas intestinais.

As descargas intestinais são constituídas por fezes líquidas, abundantes e gordurosas, precedidas de um meteorismo notavel e que se instala rapidamente, o que permitiu a Anes Dias afirmar pitorescamente que no esprú “a ventania e a trovoadas estão a anunciar chuva”.

Durante muito tempo acreditou-se que a antiga *Monilia psilosis* (*Monilia ashfordi*) fosse o agente etiológico do esprú.

Hoje em dia acredita-se que as leveduras se instalam no tubo gastro intestinal quando existe um terreno previamente alterado por um desequilíbrio nutritivo.

De acordo com Ashford, o esprú seria uma entidade mórbida resultante da ação de um fermento fúngico sobre um terreno em avitaminose.

Segundo Weis, citado por Alves Meira, a *Monilia psilosis* não deve ser considerada como o agente etiológico do esprú, admitindo-se no máximo que ela tenha uma significação secundária.

Uma comissão do Laboratório de Bacteriologia de Bombay, encarregada de estudar o assunto, após 18 meses de pesquisas concluiu que o esprú não deve ser considerado como uma "moniliase digestiva"; as leveduras encontradas nas fezes dos doentes podem desempenhar um papel secundário importante na produção de certos sintomas, durante as fases de atividade da enfermidade.

Si estudarmos a flora micótica do tubo intestinal de indivíduos normais, verificaremos que os dados obtidos são variáveis, conforme os diferentes investigadores. Anderson encontrou 47% positivo para cogumelos; Dold 7,5%; Fleischer e Wachowiak 38%; Ashford 44%, dos quais 5,6% era a *M.psilosis*; Benham 80%, 18% sendo a *Monilia albicans*.

As mesmas variações são verificadas em condições anormais; Dold encontrou em 16% dos casos de diarréia a presença de cogumelos; Fleischer e Wochowiak 58%; Anderson em 100% e Ashford em 280 casos, 55,3% positivo para a *Monilia psilosis*.

Ashford (1929), citado por Negroni e Fischer, empreendeu uma série de investigações em pessoas sãs e enfermas e em 872 casos obteve os seguintes resultados:

Em 280 doentes c/esprú, encontrou 155 vezes (55,3%) a *M.psilosis*

Em 288 doentes c/distúrbios intestinais, encontrou 19 vezes (6,6%) a *M.psilosis*

Em 126 doentes c/outras enfermidades, encontrou 6 vezes (4,7%) a *M.psilosis*

Em 178 pessoas sãs, encontrou 10 vezes (5,6%) a *M.psilosis*

Esta a razão pela qual Ashford afirmou que o esprú é um transtorno nutritivo que favorece a multiplicação, no intestino, da *Monilia psilosis*. Concluindo, diremos que a *M. psilosis*, além de ser encontrada nas fezes de doentes portadores de esprú, é frequentemente isolada em outros casos de perturbações intestinais as mais diversas, não sendo portanto específica.

A tendência moderna é aceitar o esprú como sendo uma doença de carência.

CAPÍTULO III

DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO DAS LEVEDUROSES HUMANAS

O diagnóstico de laboratório de uma levedurose humana repousa fundamentalmente na observação microscópica do cogumelo no material retirado das lesões. São as seguintes as provas que devem ser executadas para um diagnóstico preciso:

1. Observação microscópica da levedura
2. Isolamento e identificação
3. Intradermo reação com levedura
4. Provas sorológicas {
 Fixação do complemento
 Soro aglutinação
 Soro precipitação
5. Inoculação da levedura em animais de laboratório.

O exame microscópico do material suspeito poderá ser feito a fresco (com ou sem coloração) e pelos métodos de Gram ou Ziehl, e nos casos positivos observaremos numerosas células gemulantes, esféricas ou ovóides, ao lado de filamentos micelianos em maior ou menor abundância.

Já vimos que no caso do granuloma criptocócico, os parasitos se apresentam com morfologia mais ou menos característica. O *Cryptococcus neoformans*, ao exame microscópico, mostra-se sob a forma de células arredondadas, providas de uma cápsula com aspecto mucoso ou gelatinoso. No citoplasma desse cogumelo, verifica-se em alguns casos, a presença de gotículas de gordura misturadas a uma substância granulosa às vezes rica em cromatina.

A observação microscópica da levedura poderá ser efetuada em cortes histológicos. Quasi sempre a reação histopatológica face

ao ataque das leveduras é o do tipo granulomatoso. Os parasitos são encontrados fagocitados por células gigantes.

Uma vez observado o cogumelo resta o seu isolamento e identificação. Os meios empregados para o isolamento das leveduras são os mais variados. No Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina, desde longa data usamos a gelose glicosada e acidificada pelo ácido tartárico a 2%, disposta em placa de Petri. Semeado o material, a placa é levada para a estufa a 37°C. e observada durante 24-48 horas. Para a conservação da amostra empregamos o meio de Sabouraud-glicose. De um modo geral, as leveduras isolam-se com muita facilidade e se apresentam sob a forma de colônias brancas ou vermelhas, lisas ou cerebriformes, aderentes ou não ao meio, úmidas ou secas, brilhantes ou opacas. Para a identificação genérica das leveduras usamos um critério de ordem prática e que será ventilado no capítulo seguinte.

Ao lado do exame microscópico podemos praticar nos pacientes com leveduroses a intradermo-reação com a levedurina. Já possuímos no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina tal antígeno que já empregamos em doentes com leishmaniose, úlcera tropical e eczema, com resultados negativos. Como os casos de leveduroses humanas não nos têm sido enviados com constância, talvez porque comporem, de um modo geral, um tratamento quasi sempre eficiente nas mãos de qualquer clínico, não temos opinião formada sobre a sensibilidade de tal prova. No entanto, na Europa, Ravaut e Rabeau estudaram tal reação, concluindo pelo seu valor, achando porém que como todo teste biológico ela deve ser julgada sempre comparativamente.

Negronei estudou também o valor desta prova e, com a *Mycotorula albicans*, preparou 2 antígenos para reações intradérmicas. O 1º, polissacarídeo extraído do meio líquido no qual se cultiva a *Mycotorula albicans* produz constantemente reações positivas nos doentes com leveduroses. O 2º, polissacarídeo extraído diretamente das células não dá intradermo reações positivas, conservando no entanto seu poder de reagir "in vitro" (floculação e fixação do complemento). Diz o mesmo A. que provavelmente o poder alérgico das levedurinas preparadas pelos diversos AA. se deve à presença deste ou daquele polissacarídeo.

Entre as provas sorológicas que se praticam no diagnóstico das leveduroses humanas merece ser citada a reação de fixação do complemento.

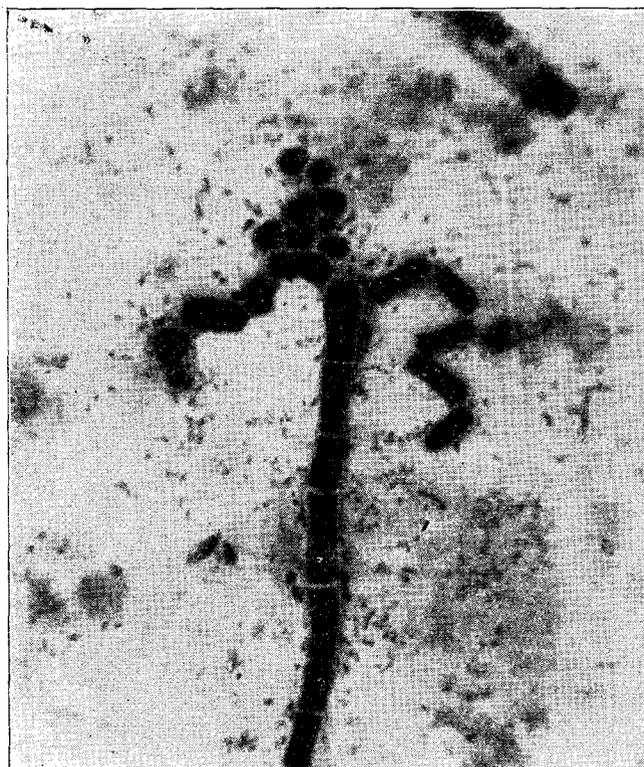
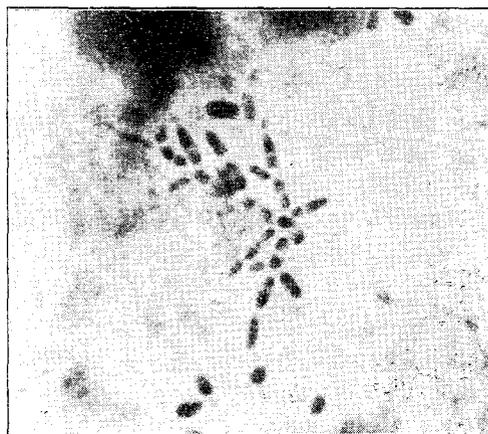


FIG. 6

Células de leveduras no escarro, coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. Gênero *Geotrichum*.



FIGS. 7 e 8

Aspectos microscópicos de leveduras em esfregaço de escarro. Gênero *Candida*.

Negróni estudou comparativamente as reações de soro aglutinação, soro precipitação e reação de fixação do complemento em pacientes atacados por leveduroses, concluindo que de todas estas provas a mais sensível e específica é a última, dando uma percentagem de positividade igual a 65,85%. Negróni afirma que a reação de fixação do complemento, nas leveduroses, pela sua cons-

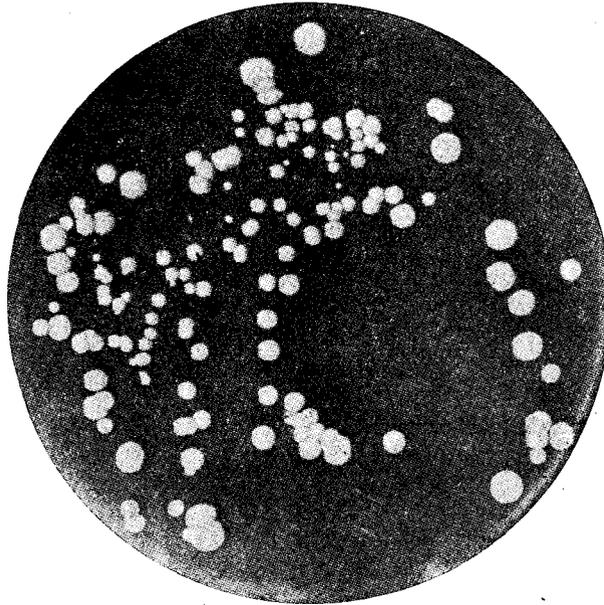


FIG. 9

Aspecto mais comum das colônias de leveduras isoladas em gelose glicosada e acidificada pelo ácido tartárico a 2%.

tância é um teste de alto valor diagnóstico. O mesmo não se dá com as reações de soro aglutinação e soro precipitação.

No diagnóstico de laboratório das leveduroses humanas devemos sempre que possível inocular em diferentes animais de laboratório o cogumelo isolado. Muitas vezes, para que os resultados sejam positivos, devemos antes sensibilizar os animais com inoculações pequenas, como recomenda Henrici. Mackinnon, no Uruguai, em sua tese de doutoramento, estudando os caracteres e o grau de virulência experimental das Turulopsidáceas, concluiu, de um modo geral, que todas as amostras possuíam o mesmo tipo de ação experimental e o animal mais sensível era o rato.

O coelho é mais sensível quando inoculado por via endovenosa, obtendo-se lesões em quasi todas as vísceras, particularmente nos rins. As lesões anátomo-patológicas são de tipos variados, desde a reação piógena (microabcessos) até o granuloma típico.

CAPÍTULO IV

ORIENTAÇÃO NO ESTUDO MICOLÓGICO DAS LEVEDURAS PATOGENICAS

Uma vez isolada a levedura, o que geralmente fazemos em gelose glicosada e acidificada pelo ácido tartárico a 2%, resta a sua identificação genérica e específica. Geralmente, contentamo-nos com a diagnóse genérica.

Para tal, seguimos a seguinte orientação, que nos parece ser a mais prática possível:

- 1) Semeadura da levedura em meio de Sabouraud glicose para estudo de sua colônia gigante.
- 2) Semeadura em água de batata, segundo o processo de Langeron e Talice ou em água de fécula de batata (estufa a 37°C.) para estudo micromorfológico da levedura isolada.
- 3) Estudo micromorfológico da levedura, corando-se a lâmina pelo Lugol duplo.
- 4) Verificação dos ascósporos, corando-se a lâmina pela hematoxilina férrica, ou mesmo pelo Lugol duplo ou corante de Gueguen, estando a levedura em água de fécula de batata, ou então fucsina fenicada de Ziehl (técnica a ser brevemente publicada).
- 5) Estudo bioquímico da levedura.

Numa lâmina corada pelo Lugol duplo, o micologista rapidamente separa aquelas que filamentam das que não filamentam.

Catalogada a levedura em um desses 2 grandes grupos, evidenciamos a presença ou ausência dos ascósporos, separando assim 4 grandes grupos desses cogumelos:

- 1) Leveduras que não filamentam, ascógenas
- 2) Leveduras que não filamentam, anascógenas

- 3) Leveduras que filamentam, ascógenas
- 4) Leveduras que filamentam, anascógenas.

1. *Leveduras que não filamentam, ascógenas*

Neste grupo estão incluídos vários gêneros, cujas características podem ser revistas em um trabalho por nós publicado na Rev. do Instituto Adolfo Lutz (vol. I, nº 2, 1941, pgs. 395-446).

Gêneros: *Schizosaccharomyces*
Nadsonia
Debaryomyces
Saccharomycopsis
Zygosaccharomyces
Torulaspota
Saccharomyces
Saccharomycodes
Hansenula (= *Willia*)
Pichia
Schwanniomyces
Hanseniaspora (= *Hansenia*)
Monosporella (= *Monospora*)
Coccidiascus

2. *Leveduras que não filamentam, anascógenas*

Gêneros: *Torulopsis*
Cryptococcus
Rhodotorula
Kloechera
Trigonopsis
Pityrosporum
Asporomyces
Mycoderma
Schizoblastosporion

3. *Leveduras que filamentam, ascógenas*

Gêneros: *Endomyces*
Nematospora
Endomycopsis
Eremascus
Oleina
Octomyces

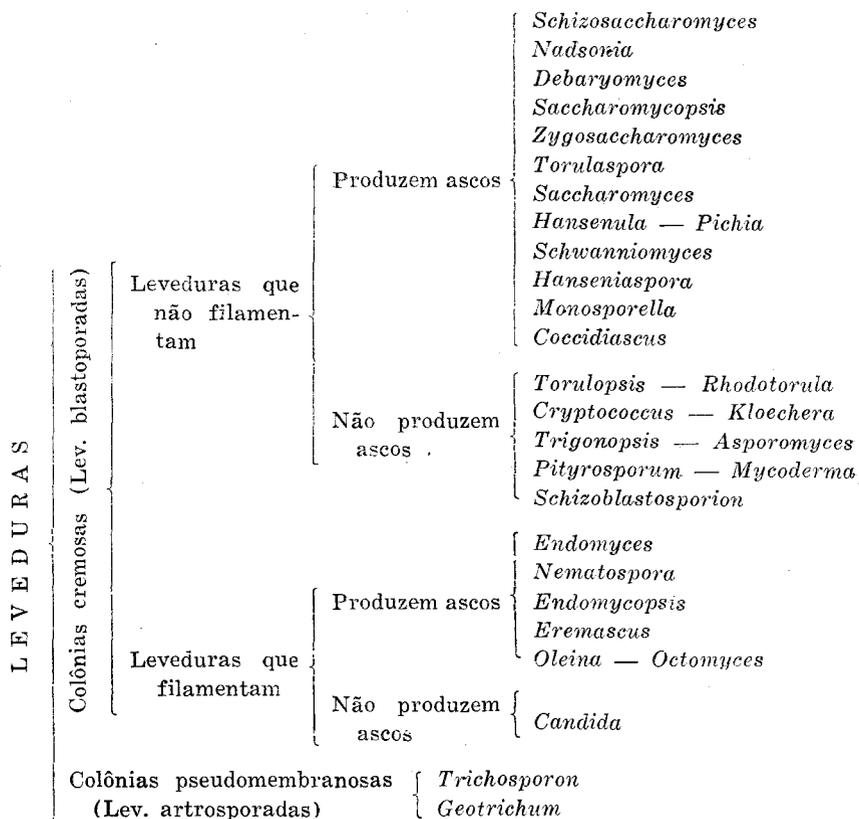
4. *Leveduras que filamentam, anascógenas*

Gêneros: *Candida* { grupo *albicans*
 " *tropicalis*
 " *pseudotropicalis*
 " *guilhermondi*
 " *krusei*
 " *brumpti*
 " *azimático*

Trichosporon
Geotrichum

Não nos preocupamos em catalogar este ou aquele gênero nesta ou naquela família, porque infelizmente reina ainda enorme confusão em torno da sistemática das leveduras.

As classificações propostas são numerosas, apresentando interesse apenas para o micologista. Para o clínico e analista basta o diagnóstico genérico.



RESUMO

Os AA. tratam neste trabalho das principais leveduroses humanas, encarando a necessidade de um estudo mais acurado dessas blastomicoses. Inicialmente, tecem comentários ligeiros sobre a importância das leveduroses na patologia humana, citando numerosos trabalhos realizados no estrangeiro, sobre o assunto.

No Capítulo seguinte apresentam uma classificação médica das leveduroses humanas, assim esquematizada:

- 1) Leveduroses tegumentares (cutâneo-mucosas) e Levedurides
- 2) Estomatite cremosa ou sapinho bucal
- 3) Língua negra pilosa
- 4) Vulvo-vaginites por leveduras
- 5) Pneumomicoses por leveduras
- 6) Levedurose generalizada
- 7) Granuloma criptocócico
- 8) Esprú (?)

Sobre cada uma dessas leveduroses tecem comentários de ordem clínica e terapêutica.

O 3º Capítulo é destinado ao estudo das principais provas de laboratório que devem ser praticadas no diagnóstico das leveduroses humanas.

No 4º Capítulo os AA. apresentam a orientação que seguem no estudo micológico das leveduras patogênicas.

SUMMARY

In this paper the AA. discuss the most important human diseases caused by yeasts, and bring out the necessity of a more accurate study of such blastomycosis. Initially they refer to the importance of the yeasts in human pathology, pointing out various works carried on in other countries about this subject.

In the next chapter they present a medical classification of the human diseases caused by yeasts, as follows:

- 1) Tegumentary yeast diseases (Skin and mucous membranes)
- 2) Thrush

- 3) Black tongue (Glossophytia)
- 4) Vulvo-vaginitis caused by yeasts
- 5) Pneumomycosis caused by yeasts
- 6) Generalized yeast disease
- 7) Cryptococcus granuloma
- 8) Sprue (?)

There are given clinical and therapeutical indications concerning each one of these diseases.

The 3rd chapter is dedicated to the estudy of the chief laboratory tests to be used in the diagnosis of human yeasts.

In the next chapter the AA. give the criterium followed in the micological study of the pathogenic yasts.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, Floriano de, LACAZ, Carlos da Silva e FAVA NETO, Celeste — Considerações a proposito de 4 casos de Lingua negra pilosa. Em publicação no Livro comemorativo do Jubileu do Prof. Cantídio Moura Campos.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1938 — Considerações em torno do sapinho vaginal e bucal. *Rev. de Obstetricia e Ginecologia de S. Paulo*, vol. III, fasc. 1.
- ALMEIDA, Floriano de — 1935 — Micotorulados como produtores de micoses. Com. à Soc. Biol., S. Paulo, 8-2-935.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1942 — Notas a propósito das blastomicoses propriamente ditas. *Rev. Med.*, vol. 26, janeiro, n.º 97, S. Paulo.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — Cogumelos levediformes isolados da bile. *Folia Clinica et Biologica*, vol. XII, n.º 3.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — Cogumelo do gênero *Geotrichum* isolado de lesões ulcerativas do reto. *Folia Clinica et Biologica*, vol. XII, n.º 2, S. Paulo.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1941 — Mucose pelo *Cryptococcus neformans*. (Primeiro caso observado em São Paulo) *Ann. Paulistas Med. Cir.*, vol. XLII, novembro, n.º 5. S. Paulo.
- ALMEIDA, Floriano de — 1939 — Micologia Medica. Estudo das micoses humanas e seus cogumelos. Cia Melhoramentos S. Paulo.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — Nova técnica para demonstração rápida dos ascosporos. *Folia Clinica et Biologica*, vol. 12, n.º 4.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — Considerações micológicas sobre 6 amostras de levedos isolados do escarro. *An. Fac. Med. S. Paulo*, vol. XVI, tomo I, S. Paulo (Brasil).

- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1938 — Frequência das micoses pulmonares em S. Paulo. *Rev. Med. C. A. O. C.*, vol. 23, junho, n.º 66.
- ALMEIDA, Floriano de, LACAZ, Carlos da Silva e BARROS, Olga de — 1941 — Orientação prática para a identificação das leveduras. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, vol. 1, n.º 2, p. 395 a 446.
- ALMEIDA, Floriano de — 1935 — Micoses do aparelho respiratório. *An. Paul. Med. e Cir.*, vol. XXX, Dezembro, n.º 6.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — Cogumelo do gênero *Sacharomyces* isolado do escarro. *An. Fac. Med. S. Paulo*, XVI (Tomo I), pg. 247.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — Considerações micológicas sobre 4 amostras de *Geotrichum* isoladas do escarro. *Folia Clinica et Biologica*, vol. XIII, n.º 2, S. Paulo.
- ALMEIDA, Floriano de e LACAZ, Carlos da Silva — 1938 — Observações em torno da espécie *Candida butantanensis* de José Maria Gomes. *Folia Clinica et Biologica*, n.º 1.
- ALMEIDA, Floriano de — 1933 — As blastomicoses no Brasil. *An. Fac. Med. S. Paulo*, vol. IX.
- ANES DIAS — Lições de Clínica Médica — 5.ª série, Edição da Livraria do Globo, Porto Alegre.
- ARAGÃO, Raimundo Moniz e ROCHA, Aluizio — 1942 — Cogumelo levediforme (*Candida*) isolado do escarro. *Resenha médica*, ano IX, n.º 1, jan.-fev.
- BASGAL, Waldemar — 1931 — Contribuição ao estudo das blastomicoses pulmonares. Tese de doutoramento. Rio de Janeiro.
- BENHAM, Rhoda W. — 1935 — The terminology of the Cryptococci with a note on *Cryptococcus mollis*. *Mycologia*, vol. XXVII, n.º 5, 496-502.
- BENHAM, Rhoda W. — 1935 — Cryptococci — Their identification by morphology and by serology. *Jour. of Infectious Diseases*, vol. 57, 255-274.
- BENHAM, Rhoda W. — 1932 — Monilias, Yeasts and Cryptococci. Their pathogenicity, classification and identification. *The American Jour. Of. Public Health*, vol. XXII, n.º 5, May.
- BENHAM, Rhoda W. — 1934 — The Fungi of Blastomycosis and coccidioidal Granuloma. *Arch. of Dermath. and Syphil.*, vol. 30, 385-400.
- BESTA, Bruno — 1933 — Le *Torulopsidaceae* nella patologia umana. (Osservazione sperimentali su 11 species). *Bolletino Dell'Istituto Sieroterapico Milaneze*, vol. XII, Settembre, ano XI, fasc. IX, 718.
- BOERI, G. e IACONO, I. — 1932 — Micosi dell'apparato respiratorio.
- BRUMPT, E. — 1936 — Précis de Parasitologie. Masson et Cie.
- CAMARGO, Inah Moraes de — 1934 — Agentes etiológicos do "Sapinho" Estomatite crerosa em S. Paulo. Tese de doutoramento. S. Paulo.
- CASTEX, Mariano R. y BLANCO, Manoel C. — 1941 — Bronconeumopatias de etiologia micotica, su frecuencia en nuestro medio. *Anales del Instituto de Investigaciones fisicas aplicadas a la patologia humana*. Ano II, vol. II, Buenos Aires.
- CATANEI, A. — 1925 — La langue noire pileuse: sa parasitologie, reflexions sur la pathogénie. *Archives de l'Institut. Pasteur d'Algerie*, vol. 3, 379-393.

- CAVALLERO, C — 1940 — L'allergia e l'immunità nelle micosi. 1.^o — Concetti generali sull'allergia, metodi, diagnostici dell'allergia. Allergia e immunità nelle actinomicosi e actinobacillosi. *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 4.
- CAVALLERO, C. — 1941 — L'allergia e l'immunità nella micosi. 2: — Allergia e immunità nelle micosi da lieviti (Blastomicosi). *Mycopathologia*, vol. III, fasc. 1.
- CAVALLERO, Cesare — 1939 — Fenomeni di variazioni e di dissociazioni nei miceti lievitifirmi. *Mycopathologia*, vol. 1, fasc. 4.
- CAVARA, Vittoriano — 1928 — Le micosi Oculari. Siena. Libreria Editrice Senese.
- CIFERRI, C. e REDAELLI, P. — 1939 — *Mycotorula* vs. *Candida*. *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 1.
- CIFERRI, R. e REDAELLI, P. — 1925 — Monografia delle *Torulopsidaceae* a pigmento rosso. Atti dell R. Istituto Botanico Dell Università di Pavia.
- CIFERRI, C. — 1930 — Contribuzioni alla sistematica delle *Torulopsidaceae*. *Archiv für Protistenkunde*, II-XIV.
- CIFERRI, R. e REDAELLI, P. — 1929 — Studies on the *Torulopsidaceae*: a trial general systematic classification of the asporigenous ferments. *Annales Mycologici*, vol. XXVII, n.^o 314.
- CONANT, Norman F. — 1940 — The taxonomy of the anascosporous yeast like Fungi. *Mycopatologia*, vol. II, fasc. 4.
- COSTA, Mario Dias da — 1919 — Mycose pulmonar pelo *Oidium brasiliense*. Tese de doutoramento. Rio de Janeiro.
- COTTINI, G. B. — 1939 — Um caso de "lingua nigra et pilosa" com isolamento di *Mycotorula Guilliermondi* (Cast.) n. corub.) *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 2.
- DEKKER, Nellie Margaretha Stelling — 1931 — Die Sporogenen Hefen. I. Teil. Amsterdam.
- DIDEENS, H. A. e LODDER, L. — 1939 — An appeal for unification of the generic taxonomy in the *Mycotoruloideae*. *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 1.
- DIDDENS, H. A. e LODDER, J. — 1939 — On some sporogenous yeasts and their imperfect stages. *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 1.
- DODGE, C. W. — 1935 — Medical Mycology. Fungous diseases of man and others animals. St. Louis. he C. V. Mosty Company.
- FARAH, Najib — 1921 — La moniliase bronchique in Egypte. La Presse Médicale, n.^o 72.
- FISHER, C. Virginia e ARNOLD, Lloyd — 1936 — Classification of yeasts and yeast like Fungi. *University of Illinois Bulletin*, vol. XXXIII, n.^o 51.
- FOLTZ, Pino — 1933 — Su la broncopneumoniliasi (Contributo anatomo patologico) *Revista di clinica Médica*, n.^o 12, Firenze, ano XXXIV, 51.
- GAMARRA, Nicolás e SCHONTEN, Guillermo — Flora micológica da vagina das grávidas. *Rev. d'Obstetrícia e Ginecologia*, vol. 31, n.^o 4-T, 263, Rio de Janeiro.
- GIORDANO, Alfonso — 1939 — Studio micologico del *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Fed. cif., et giord. e significato della specie nella patologia animale. *Mycopathologia*, vol. I, fasc. 4.
- GOMES, José Maria — 1924 — Mycose bronco-pulmonar. *Monilia butantanensis* (n. sp.) *An. Paul. Med. e Cir.*, vol. XV, n.^o 10, ano XII.

- GUEGUEN, Fernand — 1908 — Sur *Oospora lingualis*, nov. esp. et *Cryptococcus linguae-pilleuse*. *Arch. Parasitologie*, t. 12, n.º 1, 337-360.
- GUILLERMOND, A. e TANNER, F. W. — 1920 — The Yeasts.
- GUILLERMOND, A. Les Levures. O. Doint et Fils, Editeurs, Paris, 1912.
- GUILLERMOND, A. — 1937 — La sexualité, le cycle de développement, la phylogénie et la classification des Levures d'après les travaux récents. Masson et Cie.
- GUILLERMOND, A. — 1928 — Clef dichotomique pour la détermination de levures. Paris.
- HENRICI, Arthur T. — 1930 — Molds, Yeasts and Actinomycetes. New York.
- HENRICI, Arthur T. — 1941 — Characteristics of Fungous diseases. *Journal of bacteriology*, vol. 39, n.º 2.
- HENRICI, Arthur T. — 1941 — The Yeasts. Genetics, Cytology, Variation, Classification and Identification. *Bacteriological Reviews*, vol. 5, n.º 2.
- JONES, Claudius P. e MARTIN, Donalds S. — 1938 — Identification of Yeastlike organisms isolated from the vaginal tracts of pregnant and non-pregnant women. *Am. Jour. of Obstetrics and Gynecology*, vol. 35, n.º 1, 98.
- KAISER, E. — Les Levures. Paris.
- LACAZ, Carlos da Silva — 1938 — Sapinho vaginal. *Medicina Prática*. Nova Era. Ano I, n.º 2, Julho.
- LACAZ, Carlos da Silva — Pneumomicose. *Rev. Clínica S. Paulo*, vol. IV, n.º 1, 18-32.
- LACAZ, Carlos da Silva — 1939 — Cultura do escarro para pesquisa de cogumelos. Fungos produtores de micoses bronquio-pulmonares. *Brasil Médico*, ano LIII, n.º 13 e 14, Rio de Janeiro.
- LACAZ, Carlos da Silva — 1940 — O iodo no tratamento das micoses. *An. Paul. Med. e Cir.*, vol. XXXIX, n.º 5.
- LANGERON, M. e GUERRA, Paul — 1932 — Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*. Tome XVI, n.º 1, 2, 5 e 6.
- LANGERON, M. e TALICE, R. V. — 1932 — Nouvelles méthodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, tome X, n.º 1.
- LIBANIO, Marcelo dos Santos — A oídio pulmonar e suas formas clínicas. Tese de professorado. Belo Horizonte.
- LODDER, J. — 1938 — *Torulopsis* or *Cryptococcus*. *Mycopathologia*, vol. I, fasc. I.
- LODDER, J. — 1934 — Die Anaskosporogen Hefen. Amsterdam.
- MAC CALLUM, J. Kinloch — 1941 — Pulmonary moniliasis with primary bronchogenic pneumonia. *The Lancet*, Sept. 13, 306.
- MACKINNON, J. E. — 1933 — "Erosio interdigitalis". Pruebas de la etiología micótica e identificación de los hongos que producen la afección. Octava reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional del Norte — Santiago del Estero, 2 y 3 de octubre.
- MACKINNON, J. E. — 1933 — Identificación de los hongos levuriformes aislados de once casos de onixis y perionixis. Consideraciones sobre la enfermedad. Octava reunión de la Sociedad Arg. de Pat. Reg. del Norte. Santiago del Estero, 2 y 3 de octubre.

- MACKINNON, J. E. et RODRIGUES GARCIA, J. H. — 1936 — Mesure et comparaison du degré de virulence des champignons levuriformes. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*. Tome XIV, n.º 4, 1er. juillet.
- MACKINNON, J. E. — 1936 — Caracteres y Grado de la virulencia Experimental de las Torulopsidaceas de la Sub-Familia Micotoruleas (Monilias) Tesis de doctorado. Montevideo.
- MACKINNON, J. E. — 1940 — Dissociation in *Candida albicans*. *The Journ. of Inf. diseases*, vol. 66, 59-77.
- MAGALHÃES, Octavio de — 1918 — Nova mycose humana. *Memorias Inst. Osw. Cruz*, Tomo X, fasc. I.
- MAGALHÃES, Octavio de — 1932 — Mycose pulmonar pelo *Neogeotrichum pulmonum*. Com. à semana de Laboratório, Janeiro, S. Paulo.
- MEIRA, João Alves — 1936 — Considerações diagnósticas sobre um caso de esprú. *Rev. Associação Paulista de Med.*, vol. IX, n.º 1, 27-62, julho.
- MEIRA, João Alves — 1937 — Esprú. Noções atuais. *Letras Médicas*, ano 2, n.º 3, 41-47. S. Paulo.
- MONTPELLIER, T. e CATANEI, A. — 1926 — Langue pileuse et sableuse avec Monilia. *Ann. Derm. Syph.*, vol. I, 78-87.
- MOOK, William Hewson e MOORE, Morris — 1936 — Cutaneous Torulosis. *Arch. of Dermatology and Syphilology*, vol. 33, 951-962.
- MOORE, Morris — 1936 — Cultivation and study of *Pityrosporum ovale*, the so-called Bottle Bacillus of Unna. *Arch. of Dermatology and Syphilology*, vol. 31, 661-671.
- MOORE, Morris — 1936 — Dermatitis seborreica. El cultivo del organismo causal y la producción experimental de la dermatitis. *Arch. Uruguayos de Med., Cir. y Especialidades*, tomo VIII, n.º 3, 245-248.
- MOORE, Morris — 1936 — Dermatite seborrheique. La Cultivation de l'organisme causal et production de dermatite experimentale. Trabalho apresentado à Soc. Med. e Cirurgia de S. Paulo, 1.º de Fev. de 1936.
- MOORE, Morris, KILE, Roy L., ENGMAN, Martin F. e ENGMAN JOR., Martin F. — *Pityrosporum ovale* (Bottle Bacillus of Unna, Sopre of Malassez). *Arch. of Dermatology and Syphilology*, vol. 33, 457-471.
- MOORE, Morris e KILE, Roy L. — 1935 — *Pityrosporum ovalis* as a causative agente of seborrheic dermatite. *Science*, March, 15.
- MOSES, Arthur e VIANNA, Gaspar — 1913 — Sobre 'nova micose humana, causada pelo cogumelo ainda não descrito: *Proteomyces infestans*. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, tomo V, fasc. II, Rio de Janeiro.
- NEGRONI, Pablo — 1933 — La desviacion del complemento en las moniliasis cutáneo-mucosas. *Rev. da Soc. Arq. de Biología*, vol. IX, Abril.
- NEGRONI, Pablo — 1933 — Valor comparativo de las reacciones biológicas en las moniliasis cutáneo-mucosas. *Rev. Soc. Arq. de Biología*, vol. IX, n.º 4.
- NEGRONI, Pablo — 1936 — Poder alergico del antígeno capsular de "Mycotorula albicans". *Rev. Arq. de Dermatosisifilologia*, Tomo XX, 2.ª parte.
- NEGRONI, Pablo — 1934 — Reactions biologiques dans les Monilioses cutaneo-muqueuses. Leur valeur comparative, *Révue Su-Américaine de Médecine e Chirurgie*, n.º 2.
- NEGRONI, Pablo — 1930 — Cryptococcus sp. aislados de epidermo-micosis. *Rev. Soc. Arq. de Biología*, vol. VI, n.º 9 y 10.

- NEGRONI, Pablo e FISCHER, Ida — Flora micológica (Eumycetes) de las materias fecales. *Rev. del Instituto Bacteriológico*, vol. IX, n.º 3.
- NEGRONI, Pablo e NOTTEBOHUM, T. — 1940 — Queilitis por *Candida Suavolens* (Lindner) Ciferri. *Rev. Arq. de Dermatosifilologia*, tomo XV, Parte I.
- NEGRONI, Pablo — 1931 — Intertrigo Blastomicético. *Rev. Arq. de Dermatosifilologia*, Tomo XV, Parte I.
- NEGRONI, Pablo — 1931 — La levedura que produce el "Intertrigo Blastomicético" es la monilia albicans, agente causal también del muguet. *Rev. Arq. de Dermatosifilologia*, Tomo XV, Parte I.
- NEGRONI, Pablo — 1936 — Étude de la capsule de *Mycotorula albicans* (Ch. Robin, 1853). *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, tomo XIV, n.º 5.
- NEGRONI, Pablo — 1935 — Flora micológica de la vagina de mujeres no embarazadas. *Rev. del Inst. Bact. del Dep. Nac. de Higiene*, vol. VI, n.º 5, Buenos Aires.
- NEGRONI, Pablo — 1941 — Sobre um tipo particular de "Onixis blastomicética" *Rev. Arg. de Dermatosifilologia* — Tomo XXV. 2.ª parte.
- NEGRONI, Pablo — 1936 — La capsule des levures. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*. Tome XIV, n.º 5.
- NEGRONI, P. — Dermatocosis — 1942 — A. Lopes — Buenos Aires.
- NEGRONI, Pablo y LASTRA, T. de Fillapâne — 1939 — Micosis generalizada y mortal por *Trichosporon proteolyticum* n. sp. *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 1.
- NIÑO, Flavio L. — 1938 — Contribución al estudio de las blastomicosis en la República Argentina. *Boletín del Instituto de Clínica Quirúrgica*. Año XIV, n.º 18.
- NIÑO, Flavio L. — 1938 — Aspectos microscópicos de los granulomas llamados blastomicósicos. *La Prensa Médica Argentina*, Tomo XXV, n.º 47.
- NIÑO, Flavio L. — 1929 — Ensayos de inmunización anticriptocócica en los animales de laboratorio. Quinta Reunión de la Sociedad Arg. de Patología Regional del Norte, Jujuy, 7 a 10 de octubre.
- NIÑO, Flavio L. — 1933 — Algunas observaciones de broncomoniliasis. Octava reunión de la Sociedad Arg. de Patología Regional do Norte. 2 y 3 de octubre.
- PARDO-CASTELLO, V. — 1941 — Diseases of the Nails.
- PERIN, Arrigo — 1925 — Le micosi pulmonari e generalità sui miceti patogeni.
- PUNTONI, V. — 1938 — Studi sul genere *Trichosporon*. *Mycopathologia*, vol. I, fasc. 3.
- RAVAUT, Paul e RABEAU, Henri — 1936 — Levures et Levurides. Nouvelle Pratique Dermatologique. Tome II. Masson et Cie., Editeurs. Paris.
- REDAELLI, P. — 1936 — L'attuale Sistemazione delle cossidette "Blastomicosi". Rassegna Clinico-Scientifica dell'Istituto Biochimico Italiano, n.º 10. Ano XIV.
- REDAELLI, P. e CIFERRI, R. — 1929 — Studies on the *Torulopsidaceae*. Tentative regarding a diagnostic procedure for specific determination. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde und Infektion Krankheiten*. Abt. II. Bd 78.
- REDAELLI, P. CIFERRI, R. et GIORDANO, A. — 1937 — *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) nobis, n. comb. pour les espèces du groupe *Saccharomyces*

- hominis* — *Cryptococcus neformans* — *Torula hyptolytica*. *Bollettino della Sezione Italiana della Società Internazionale di Microbiologia* Fasc. I-II.
- REDAELLI, P. e CIFERRI, R. — 1930 — Note a proposito di micosi polmonari. *Bollet. dell'Istituto Sieroterapico Milaneze*. Fasc. IX.
- REDAELLI, P. — 1930 — Il problema delle torulopsidaceae e dei loro rapporti con l'uomo e con la patologia umana studiato particolarmente in Italia. (Blastomiceti e Blastomicosi) *Rivista di Biologia*, vol. XII, fasc. III-IV.
- RUDGE, WALDEMAR DE SOUSA — 1939 — Tratamento dos corrimentos vaginais. Apontamentos de aula proferida na cadeira de Ginecologia da Fac. Med. S. Paulo.
- SAYUS, Pompeyo — Tratamento de las perionixis. *Rev. Arq. de Dermatosifilologia*, Tomo XIX, 3.^a parte.
- SARTORY, A. e BAILLY, A. — 1923 — Les mycoses pulmonaires et leurs parasites.
- SCHWARTING, Virginia M. — 1937 — Occurrence of Monilias in Tuberculosis sputum. *The Journ. of Bacteriology*, vol. 33, n.º 1, 117.
- SMITH, George e RAISTRICK, Haroldo — 1938 — An Introduction to Industrial Mycology.
- STILES, William W. e CURTISS, Arthur N. — 1941 — *Torula meningoecephalitis*. Report a case; observation of the cerebrospinal fluid. *The Jour. of the American Med. Assoc.*, vol. 116, n.º 15.
- TALICE, R. V. e MACKINNON, J. E. — 1933 — Determinación de algunas cepas argentinas de hongos levuriformes. Octava reunión de la Sociedad Arg. de Pat. Reg. del Norte. Santiago del Estero, 2 y 3 de octubre.
- TALICE, R. V. — 1930 — Le concept actuel des mycoses médicales de l'appareil respiratoire. *Révue Sud-Américaine de Médecine et de Chirurgie*, n.º 2.
- TALICE, R. V. e MACKINNON, J. E. — 1933 — Observaciones sobre algunos hongos levuriformes (Mycotoruleas) aislados en Montevideo. *Arch. de la Soc. de Biología de Montevideo*, vol. V, n.º 1.
- TALICE, R. V. e MACKINNON, J. E. — La valeur du voile des cultures em milieu liquide pour la classification des champignons levuriformes (Mycotorulées). *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie* — Société de biologie de Montevideo — Séances des 2 et 16 juin, 7 juillet et 4 août, 1932. Tome CXI, 534.
- TOBIAS, Norman — 1941 — Essentials of Dermatology. J. B. Lippincott Company.
- TODD, Ramona L. — 1937 — Studies on yeast-like organism isolated from the mouth and throats of normal persons. *The Jour. of Bact.*, vol. 33, n.º 1, 117.
- URBACH, Erich e SACH, Franz — 1930 — Generalisierte Torulose (Europäische Blastomyose). *Arch. f. Dermatologie und Syph.* B. 162, 401-421.
- VERONA, O. — 1939 — A propósito della unificazione dei generi delle "Torulopsidaceae". *Mycopathologia*, vol. II, fasc. 2.
- VUILLEMIN, Paul — 1931 — Les champignons parasites et les mycoses de l'homme.
- WEIDMANN, Fred. D. — 1928 — The affinities between black tongue and trichomycosis. *Arch. of Dermatology and Syphilology*. vol. 18, 647-65.
- WOOLLEY, Mildred T. — 1938 — Mycological findings in Sputum. *The Jour. of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 23, n.º 6.

NEUROMAS DA MUCOSA DO APÊNDICE

JOÃO MONTENEGRO

Biologista chefe do Instituto Adolfo Lutz

Desde 1921 Masson vem publicando seus estudos sobre o que chamou neuromas do apêndice. Extremamente interessantes do ponto de vista histo-patológico ganharam ainda em importância quando Masson, Rössle e outros lhes atribuíram significado clínico.

ORIGEM DOS NEUROMAS DA MUCOSA DO APÊNDICE

Existe na lâmina própria da mucosa do apêndice um delicadíssimo e irregular retículo fibrilar argentafim que sendo, do lado da muscular da mucosa, continuo com o plexo de Meissner, do qual parece ser oriundo, termina na base das células epiteliais da mucosa e suas criptas.

Em condições ainda mal definidas mas que parecem ligadas aos influxos inflamatórios do órgão em apreço, dá-se uma hiperplasia irregular desse retículo com alongamento das fibrilas e formação de neuromas difusos ou esféricos, enovelados ou ainda alongados, penduliformes, situados, geralmente, no espaço que medeia entre as criptas de Lieberkühn (*Fig. 1*).

Masson, quasi simultaneamente com Maresch, atribuiu, em 1921, às ulcerações da mucosa, a formação desses neuromas, pela analogia que apresentam aos neuromas de amputação dos nervos espinhais; mas, o primeiro desses autores, prontamente repudiou essa hipótese por lhe parecer inverossimil, substituindo-a pela de uma possível neurocrinia.

Outro retículo nervoso existe ainda, provavelmente de origem entodérmica, aventa Masson, que, não se impregnando de prata quando tratado pelos métodos em voga, cora-se bem pelo tricrômico desse autor. Este retículo é mais copioso e se entrelaça com o primeiro; nos seus interstícios encontram-se, esparsamente, células cromo-argentafins de um ou mais tipos, isoladas ou em pequenos grupos que, segundo Masson, são emigradas do fundo das criptas

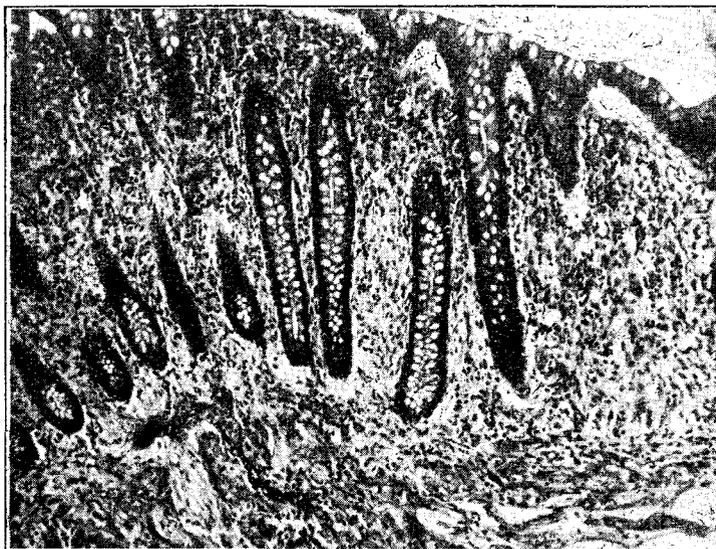


FIG. 1

Entre duas criptas há um neuroma penduliforme. Hipergeneses nervosa junto e ao longo da muscular da mucosa. Ficha: C 871.
One bigger neuroma between two crypts of Lieberkühn. Nervous hypergenesis in the bottom of the mucosa close to the muscularis mucosae.

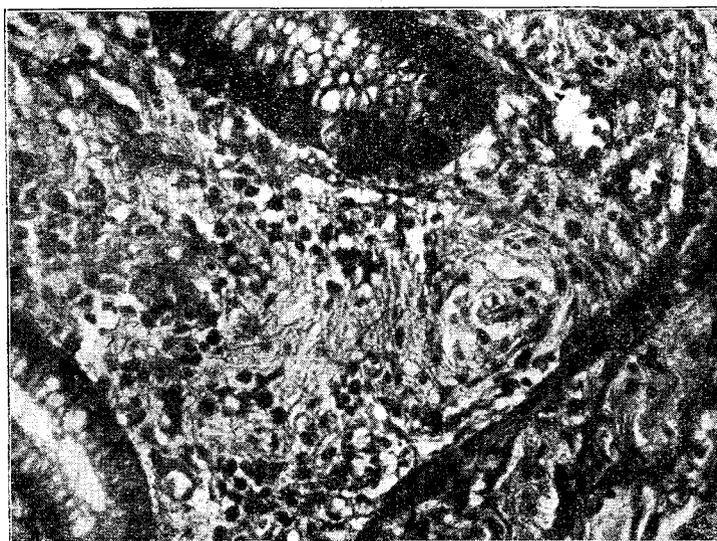


FIG. 2

Entre o fundo das duas criptas e a muscular da mucosa vêm-se dois neuromas enovelados. Ficha: C. 81.
Two whorled neuromata between the tips of two crypts of Lieberkühn and the muscularis mucosae.

de Lieberkühn e adquirem a qualidade cromo-argentafim após a emigração. Os neuromas formados por esse retículo (*Fig. 2*), diz Masson, encerram sempre células argentafins e se localizam entre a muscular da mucosa e o fundo das criptas de Lieberkühn. É esse o tipo de neuroma comumente encontrado nas apendicites obliterantes e classificado por Schweizer como neurinoma (Schwannoma) (*Fig. 3*).

SIGNIFICADO CLÍNICO DOS NEUROMAS DA MUCOSA DO APÊNDICE

Masson, Maresch, Rössle e outros responsabilizam os ditos neuromas do apêndice pela sintomatologia de certos casos diagnosticados clinicamente como apendicite crônica em cujos apêndices patológicos há neuromas mas não reação inflamatória. Aschoff endossa essa teoria mas Porgis nega, indiretamente, qualquer manifestação clínica decorrente dessas estruturas.

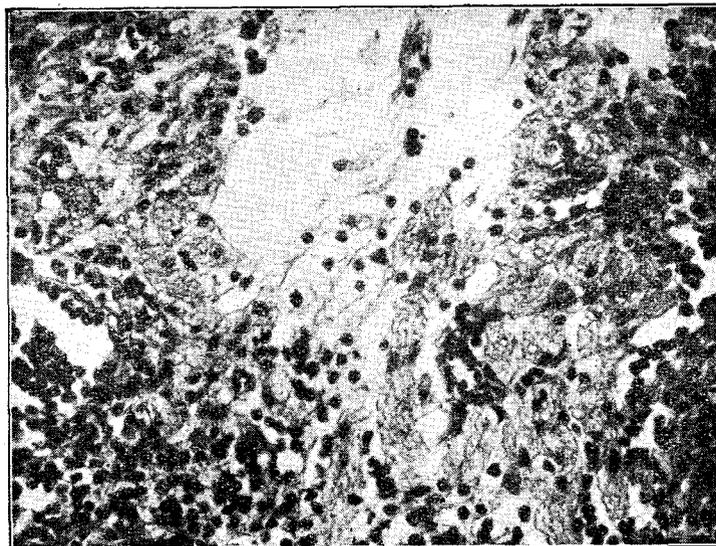


FIG. 3

Neuromas cordoniformes, anastomosantes, no centro de apendicite obliterante.

Ficha: C 596.

Anastomosing cylindrical neuromata in the center of obliterating appendicitis.

A importância dessa controvérsia sobreleva-se, neste momento, em face da crescente legião de pessoas que padecem de dores no quadrante inferior direito do abdomen em consequência de uma patologia mal definida.

O conjunto constituído pelo diagnóstico de apendicite crônica, apendicectomia e cura, tão comum outrora, desnorteou os anátomo-patologistas que, não encontrando processos inflamatórios bem definidos, em muitos desses apêndices, incriminaram exageradamente as pequenas alterações patológicas que encontravam, tais como fibrose e hialinose da submucosa; hiperplasias dos tipos linfático, neuro-muscular e nervosa com formação de neuromas; supostas erosões da mucosa etc.. Chegou-se mesmo a forçar um pouco o conceito de inflamação "crônica" do apêndice, como assinala Brites, para conciliar os resultados clínicos e anátomo-patológicos.

Mas, nestes últimos anos, a observação feita por Guillaume em 1924, de que alguns dos casos operados com o diagnóstico de apendicite crônica continuam com os mesmos sintomas, não só foi confirmada como ultrapassada ao ponto de haver hoje quem classifique de rara e até mesmo quem negue a apendicite crônica, porque a percentagem de verdadeiras curas, nos operados com esse diagnóstico, é pequena, como demonstraram Alvarez e outros. Passou-se então precipitadamente de um extremo ao outro por dois motivos: Observação falha no primeiro caso e insuficiência de diagnóstico no segundo.

A observação falha resulta de dados colhidos muito precocemente após a operação e, mais comumente devido às inexatas informações do paciente, decorrentes de sua mentalidade, da influência das condições mesológicas em seu psiquismo, dos caprichos da moléstia, etc..

Sobre a insuficiência de diagnóstico é preciso, preliminarmente, salientar que a moléstia que mais frequentemente conduz à apendicite crônica comumente diagnosticada afeta, em regra, apêndice e ceco simultaneamente. E como a sintomatologia da apendicite crônica geralmente se confunde com a da tiflite crônica (preferimos dizer colite porque outras partes do colon são, geralmente, afetadas, no correr do tempo), podendo mesmo coexistir, compreende-se que em muitos casos, embora o apêndice esteja inflamado e ativamente participando da sintomatologia dolorosa do quadrante inferior direito do abdomen sua extirpação não elimina a sintomatologia porque ela continua a emanar da tiflite crônica. Trata-se portanto de casos de apendicite crônica e, geralmente, colite crônica concomitantes. Só o exame histo-patológico dos apêndices pode confirmar sua co-participação porque raramente ele se denuncia macroscopicamente. Como os focos inflamatórios encontrados são,

geralmente, milimétricos torna-se necessário examinar grande número de blocos de cada apêndice para surpreender suas lesões.

Expurgando-se as falhas de observação dos casos há muito tempo operados com o diagnóstico de apendicite crônica, verifica-se que pequena percentagem dos pacientes realmente se curam. Destes, a grande maioria, tinha processos inflamatórios bem caracterizados e mais ou menos extensos no apêndice enquanto nos poucos restantes deste grupo havia apenas processos degenerativos, cicatriciais, hiperplásticos ou neoplásticos. Podemos portanto, talvez admitir a possibilidade desses processos cicatriciais, hiperplásticos ou neoplásticos, entre os quais incluímos os neuromas, produzirem, em circunstâncias muito especiais, fenômenos dolorosos na região ceco apendicular, quiçá por embaraço das funções cinéticas do apêndice e mais provavelmente quando por seus volumes produzam estenose na luz apendicular.

Dos 45 apêndices que operamos com o diagnóstico de apendicite crônica, nos quais foi feita a coloração tricolor de Masson por Da. Ana Faraco e Da. Ursula Fróes, encontramos os chamados neuromas em 9. Destes enfermos, um se diz curado, 5 não curados e três sem informações. No apêndice do que se curou havia, na muscular e submucosa um pequeno foco com infiltração leucocitária. Os que não se curaram são portadores de colite crônica, moléstia essa que já devia existir na ocasião da apendicectomia, pois dois deles tinham apendicite obliterante que, a nosso ver é, em pessoas jovens, um índice muito sugestivo de colite crônica concomitante.

CONCLUSÕES

1. Em 20% dos nossos operados com o diagnóstico clínico de apendicite crônica, encontramos os chamados neuromas da mucosa do apêndice.

2. As causas que determinam as pequenas e repetidas inflamações do apêndice, conduzindo ao diagnóstico clínico de apendicite crônica afetam, quasi sempre simultaneamente, o ceco produzindo, portanto, tiflite (colite) concomitante. São provavelmente os influxos dessas pequenas inflamações que, geralmente, condicionam a hipergênese nervosa e formação dos chamados neuromas da mucosa do apêndice.

3. Apenas um dos apendicectomizados, portador de neuroma da mucosa do apêndice, se diz curado mas esse tinha um pequeno foco de infiltração leucocitária na muscular e submucosa do apêndice. Os que não sararam têm colite crônica. Como a sintomatologia de apendicite crônica e a de tífite (colite) crônica geralmente se superpõem torna-se praticamente impossível determinar com exatidão o papel desempenhado pelos neuromas da mucosa do apêndice na sintomatologia dolorosa do quadrante inferior direito do abdomen. Quer nos parecer que, se esse papel existe, só muito excepcionalmente tem significado clínico.

SUMMARY

A general survey was made of the so-called neuromata of the appendix mucosa and the works of Masson, Maresch and Rössle were mainly focussed.

The A. accepts the hypothesis that the nervous hyperplasia that give rise to the so-called neuromata possibly results from inflammation stimuli but these structures are not amputation neuromata.

Regarding the clinical meaning of such structures the A. calls attention to the difficulty in establishing the facts. The wrong conclusions come to a certain extent from a too short follow-up postoperative period but mainly from the unreliable informations of the patients whether conscious or, more commonly, subconsciously. The great cure percentages formerly reported after operations for chronic appendicitis were, in the past, highly exaggerated and, on such false basis, wrong conclusions were drawn regarding the value of the minor pathological findings of the appendicis. Even Masson may have been partially misled. Of course one may admit that, very exceptionally, these so-called neuromata of the mucosa may be so numerous and bulky as to cause stenosis of the appendix lumen and give rise to disease curable by appendectomy; but that is nothing compared to the enormous number of cases operated on for chronic appendicitis in whose appendicis there were neuromata, with or without active inflammation, but which did not obtain cure because a chronic typhlo-colitis and not amputation neuromata of the cut basis of the appendix was at the bottom of the disease.

The A. reports 45 cases operated on by him with the diagnosis of chronic appendicitis. The histological sections of the appen-

dicis were stained by the trichromic method of Masson and some by silver impregnation.

In nine of the above mentioned appendicis there were found the so-called neuromata. One patient was cured, but, in his appendix there was also a focus infiltrated with leucocytes situated in the muscular coats and extending down to the submucosa, occupying an area of about one millimeter. Five of the patients were not relieved of their symptoms and they have now a chronic inespecific colitis which they probably had concomittantly with the appendicitis, from the begining, for two of them had obliterating appendicitis which the A. regards as sugestive of chronic colitis when met with in young people.

Since the symptomatology of chronic appendicitis is as a rule equal to that of chronic typhlitis (colitis) and since these two affections often coexist it is impossible in such cases to assign the roles played by the appendix lesions even when such organ is extirpated.

Various types of these so-called neuromata described by Masson are illustrated.

BIBLIOGRAFIA

- MASSON, P. — 1928, *The Amer. Jour. of Pathol.*, vol. 4, p. 181;
 1930, *The Amer. Jour. of Pathol.*, vol. 6, p. 217;
 1921, *Comptes Rend. de l'Acad. des Sc.*, vol. 173, p. 262.
- MARESCH, R. — 1921, *Wien Klin. Wochenschrift*, vol. 34, p. 181.
- RÖSSLE, R. — 1930, *Mitt. Grenzgeb. Med. u. Chir.*, vol. 42, p. 143.
- ASCHOFF, L. 1934, *Tratado de Anatomia Patol.*, Barcelona.
- SCHWEIZER, P. — 1922, *Schweizer Med. Wochenschr.*, vol. 3, p. 1202.
- Brites, G. — 1940, *Folia Anat. Univ. Coimbr. Coimbr. Univ.*, vol. 15.
- ALVAREZ, W. C. — 1940, *The Jour. Amer. Med. Ass.*, vol. 114, n.º 14.
- FORGIS, O. — *Doenças do Intestino*, 2.ª Edição — S. Paulo.
- GUILLAUME, A. C. — 1924, *Les Colotyphites et le Syndrome de la Fosse Iliaque Droite*, Paris.

SOBRE O PADRÃO BACTERIOLÓGICO DO LEITE EM SÃO PAULO

Leite de Granjas

A. FRANÇIA MARTINS,

Chéfe de subdivisão do Instituto Adolfo Lutz — Ex-bacteriologista
da extinta Inspetoria de Fiscalização do Leite e Laticínios.

AS GRANJAS DE S. PAULO

Há pouco tornamos público os estudos praticados nos leites pasteurizados tipo C, cujos resultados foram coletados dos exames bacteriológicos efetuados de Agosto de 1934 a Dezembro de 1937.

No mesmo período, estudou-se também os leites de granjas. São estes resultados que vamos expor.

As mesmas explicações que fizemos no trabalho anterior (Revista do Instituto Adolfo Lutz, n.º 2, 1941), podem ser trasladadas para aquí. Houve o mesmo espírito de colaboração entre os serviços, muito em especial entre o Inspetor de granjas e o laboratório de bacteriologia.

Em geral, acompanhávamos pessoalmente o referido inspetor nas suas quasi quotidianas visitas aos estabelecimentos, procurando resolver os problemas sanitários, baseado nos resultados dos exames bacteriológicos.

Algumas granjas foram abertas e outras deixaram de funcionar durante o período assinalado, procurando a Inspetoria incentivar o mais possível a produção deste tipo de leite, por preencher condições de alto valor nutritivo e higiênico.

As granjas leiteiras podem ser consideradas como estabelecimentos providos de recursos bastante amplos, tornando-se relativamente facil o aperfeiçoamento das técnicas de manipulação, cuja execução era facilitada pelo elevado padrão de conhecimento dos seus dirigentes. A educação sanitária dos seus proprietários e dos

gerentes muito contribuiu para o bom andamento dos serviços e com algumas exceções, cuja explicação daremos adiante, verificamos uma tendência acentuada de melhoria.

A produção do leite de granjas mereceu da Inspetoria de Leite toda a atenção e, se mais não obteve, foi por razões independentes de nossa vontade. A situação de desigualdade delas ante os estábulos de vaqueiros era notória ocasionando prejuízos não de pequena monta, levando mesmo a algumas delas a cerrarem suas portas definitivamente.

Por questões que não vêm ao caso citar, não foi possível solucionar o problema e as granjas durante a nossa gestão, permaneceram em contínua crise.

Em 1934, existiam apenas quatro granjas registadas na Inspetoria e posteriormente, mais três se abriram. Uma delas foi fechada por não preencher as condições técnicas necessárias, outras duas, antes de Junho de 1938, cerraram suas portas espontaneamente, surgindo em 1938 uma outra, que não incluímos neste nosso trabalho.

Todas elas, com exceção de uma, achavam-se situadas no perímetro suburbano, possuindo espaço necessário para a meia estabulação dos seus gados.

Os estábulos eram em geral de boa construção, bem arejados, higiênicos, servidos por água de poço, a maioria das vezes. As águas desses poços foram examinadas pelo laboratório de bacteriologia da Inspetoria, a título puramente de orientação interna, revelando todas as análises, índice de contaminação coli.

O gado, em geral bem escolhido, era controlado periodicamente pelo Departamento de Indústria Animal, muito bem aparelhado para o mister.

A ordenha se processava em compartimentos especiais, e o leite era resfriado em resfriador plano ou cilíndrico, à salmoura.

O engarrafamento era semi-automático, o fechamento, por meio de máquina manual, do tipo de tampas metálicas comuns. O produto, uma vez engarrafado, era conservado em câmara frigorífica de temperatura não superior a 4°C., e distribuído ao consumo com poucas horas de ordenha.

Em resumo, as condições de manipulação desse tipo de leite, eram em geral boas, sendo servido ao consumo sem sofrer pasteurização.

Mesmo nessas condições, o produto delas originado estava aquém de nossas exigências, como adiante veremos, e carecia de providências mais urgentes.

O estudo efetuado e exposto neste trabalho, revela apenas uma série de análises destinadas a estudar uma situação num período longo, afastando causas de erros possíveis nesta ordem de problema e dependentes de variações de tempo, estações e conseqüentemente, alimentação do gado e temperatura ambiente.

Servem também para documentar uma orientação futura, que não foi aproveitado por razões outras.

ESTUDO DOS GRÁFICOS

Acima dissemos que as granjas eram em número de sete e para melhor sistematizarmos os estudos, vamos numerá-las de 1 a 7. Dessa forma, mantemos anônimos os estabelecimentos, podendo discutir o assunto com desembaraço e livre de explorações comerciais.

CONDIÇÕES GERAIS DA COLHEITA DE AMOSTRAS:

Seguimos o ponto de vista já adotado para o leite pasteurizado tipo C, que consideramos o único razoável como base a estudos para estabelecer um padrão bacteriológico — colheita de amostras no carro ou depósito distribuidor. Sendo este o local onde o público consumidor ia buscar o produto e sendo também este o local onde cessava a fiscalização oficial, julgamos sempre que qualquer estudo sobre exames bacteriológicos em leites dados ao consumo, deveriam ser calcados em amostras colhidas dessa forma. As amostras eram imediatamente levadas ao laboratório e colocadas em geladeira elétrica com temperatura de cerca de 2°C., até a hora do exame, não ultrapassando nunca de 12 horas o espaço de tempo entre a colheita e o exame.

Os métodos empregados para exame eram os mesmos citados no trabalho anterior (Revista do Instituto Adolfo Lutz, n.º 2, 1941, p. 355).

Eis os quadros demonstrativos dos resultados, grupados por classes, representando os exames de contagens pelo método de placas.

GRANJA N.º 1

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos 1934, 1935, 1936, 1937.

N.º de Exames	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
79	—	3 ou 3,79	0 — 10.000	86,03%
		6 ou 7,59	10.001 — 20.000	
		14 ou 17,72	20.001 — 30.000	
		13 ou 16,45	30.001 — 40.000	
		9 ou 11,39	40.001 — 50.000	
		11 ou 13,92	50.001 — 60.000	
		4 ou 5,06	60.001 — 70.000	
		3 ou 3,79	70.001 — 80.000	
		2 ou 2,53	80.001 — 90.000	
		3 ou 3,79	90.001 — 100.000	
		8 ou 10,12	100.001 — 200.000	13,91%
		1 ou 1,26	200.001 — 300.000	
		2 ou 2,53	300.001 — 400.000	
		—	400.001 — 500.000	
		—	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	4	30	33	4	—
Porcentagens	5,55	41,66	45,83	5,55	—

Pesquisas Positivas — 71 — 98,59%
 Pesquisas Negativas — 1 — 1,38%
 Número de Pesquisas — 72

O estudo deste gráfico demonstra que em 79 exames praticados, 86,03% achavam-se até a classe de 100.000.

Tratava-se de um estabelecimento com boas instalações, que primava pelos métodos de trabalho e pela sistematização dos mesmos. Nunca fizemos uma viagem de inspeção a este local, que não encontrássemos tudo em ordem, qualquer que fosse a hora da visita.

No entanto, faltavam ainda certos requisitos técnicos indispensáveis, no terreno da esterilização. Não havia propriamente

esterilização dos vasilhames, mas perfeita limpeza mecânica. Ora, em higiene, os métodos devem ser precisos e completos, sob pena de incorreremos em fracasso. A pouca variação dos resultados dos exames bacteriológicos, já evidenciam método de trabalho, porém o índice "coli" lá estava presente até em diluições elevadas, comprovando o que dissemos. Num total de 72 pesquisas do "coli", somente obtivemos *um* resultado negativo. Levando-se em conta a maior condensação nas classes até 100.000, era este o estabelecimento que melhor colocação arranjava.

GRANJA N.º 2

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos 1934, 1935, 1936, 1937.

N.º de Contagens	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
66	—	20 ou 30,30	0 — 10.000	
		6 ou 9,09	10.001 — 20.000	74,22%
		5 ou 7,57	20.001 — 30.000	
		2 ou 3,03	30.001 — 40.000	
		3 ou 4,54	40.001 — 50.000	
		3 ou 4,54	50.001 — 60.000	
		4 ou 6,06	60.001 — 70.000	
		—	70.001 — 80.000	
		2 ou 3,03	80.001 — 90.000	
		4 ou 6,06	90.001 — 100.000	
		9 ou 13,63	100.001 — 200.000	25,74
		6 ou 9,09	200.001 — 300.000	
		1 ou 1,51	300.001 — 400.000	
		1 ou 1,51	400.001 — 500.000	
		—	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	14	23	8	—	—
Porcentagens	22,95	37,70	13,11	—	—

Pesquisas Positivas — 45 — 73,76%
 Pesquisas Negativas — 16 — 26,22%
 Número de Pesquisas — 61

Eis outra granja que merecia, como a anterior, a primeira colocação. Dirigida habilmente por um dos seus proprietários, equipada com requisitos técnicos indispensáveis para um bom resultado, possuindo até estufa para esterilização do vasilhame e, no entanto, somente 74,22% dos resultados enquadravam-se nas classes até 100.000. A razão de ser é a mesma exposta no caso anterior: falta de meticulosidade na esterilização, e aproveitamento dela, durante as manipulações do leite.

O índice "coli" aqui não ultrapassou as diluições de 1:100, e assim mesmo, com pequena incidência. O número de pesquisas negativas elevou-se a 16 ou 26,32%, bem considerável, mas insuficiente para um tipo de leite que é especialmente destinado ao consumo de crianças e debilitados.

Para demonstrar o valor da fiscalização educativa, isto é, aquela fiscalização que tem por fim incentivar a produção, amparando-a com ensinamentos e mesmo prêmios, quando se depara com organizações desse gênero vamos expor o seguinte fato:

Ocupava esta granja um lugar em classificação, levando-se em conta as contagens bacteriológicas, que não condiziam com suas organização: o 5.º lugar. Seu dirigente, não contente com o fato, procurou recorrer à análises em outros laboratórios oficiais, quando, por iniciativa nossa, fomos colher amostras seriada para exame bacteriológico, desde a ordenha, até o engarrafamento final. Eis os resultados:

Data	N.º da análise	Local da colheita	Contagens em placas	Grupo Escherichia Aerobacter	Peroxidase	
1936	91	granja	10 c.p. 1:10	Negativa	+++	Ordenhado do úbere em frasco estéril.
,,	92	,,	26 c.p. 1:10	Negativa	+++	Colhido do balde de ordenha.
,,	93	,,	4.500	Pos. 1 cc.	+++	Colhido do depósito antes do resfriador.
,,	94	,,	7.000	Pos. 1 cc.	+++	Colhido depois do resfriador.
,,	95	,,	20.000	Identif. A. aerogenes	+++	Colhido da garrafa logo depois do engarrafamento.

Poucos comentários precisamos tecer em vista da evidência dos resultados. À medida que fomos colhendo amostras, desde o úbere, até o engarrafamento, os resultados das contagens foram aumentando rapidamente, demonstrando o contingente de germes que cada recipiente ia acrescentando ao produto. Seria fastidioso repetir e mesmo repisar sobre o valor da esterilização dos utensílios que vão estar em contacto com o leite.

Si, minutos após a ordenha, o leite engarrafado já possuía 20.000 germens por cc., o que não seria várias horas depois, si a geladeira não estivesse à temperatura conveniênte? Lembramos que esta experiência foi feita à tarde, e os resultados constam do relatório anual apresentado pelo Laboratório ao Sr. Inspetor Chêfe da extinta Inspetoria de Fiscalização do Leite e Laticínios (1936, p. 7).

O resultado deste estudo foi que os métodos, não só de trabalho, como os de esterilização do vasilhame, melhoraram consideravelmente e tivemos a enorme satisfação de vermos nossos esforços coroados de êxito, pois as análises bacteriológicas desta data em diante caíram a menos de 10.000 germens por cc. com vários resultados abaixo de 5.000. A incidência do coli baixou nitidamente, pois até aquela data, não havíamos obtido nenhum só resultado negativo, ao passo que nos últimos meses do mesmo ano, (1936), os resultados negativos ascenderam a 8. As contagens pelo método de Breed, acompanharam muito de perto as variações das contagens em placa, aliás em acordo com a técnica. No ano de 1937, ainda melhores foram os resultados, confirmando de forma insofismável o valor da medida tomada, sem coersão, sem penalidades, mas com espírito de educação e colaboração.

As repartições especializadas devem e precisam assistir às partes concorrendo com isto num aumento da economia pública e em benefício da Saude Pública. A coersão está destinada aos fraudadores somente.

GRANJA N.º 3

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos 1935, 1936, 1937.

Contagens N.º de	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
70	1 ou 1,42	13 ou 18,57	0 — 10.000	
		11 ou 15,71	10.001 — 20.000	69,96%
		11 ou 15,71	20.001 — 30.000	
		5 ou 7,14	30.001 — 40.000	
		2 ou 2,85	40.001 — 50.000	
		3 ou 4,28	50.001 — 60.000	
		—	60.001 — 70.000	
		3 ou 4,28	70.001 — 80.000	
		1 ou 1,42	80.001 — 90.000	
		—	90.001 — 100.000	
		10 ou 14,28	100.001 — 200.000	28,55
		—	200.001 — 300.000	
		2 ou 2,85	300.001 — 400.000	
		2 ou 2,85	400.001 — 500.000	
		6 ou 8,57	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	14	28	21	5	1
Porcentagens	19,71	39,43	29,57	7,04	1,40

Pesquisas Positivas — 69 — 97,15%

Pesquisas Negativas — 9 — 2,81%

Número de Pesquisas — 71

O gráfico n.º 3, presta-se a uma interpretação semelhante ao anterior. Apenas aquí as contagens foram mais elevadas, apresentando 28,55% de resultados nas classes acima de 100.000.

A incidência do coli foi até a diluição de 1/10.000, apenas com dois resultados negativos.

Tratava-se de um estabelecimento de construção adequada, ambiente limpo, com boa sala de ordenha, apenas deixando a desejar quanto aos métodos de trabalho.

Inutil é entrarmos em longas explanações sobre esta granja; aí estão os resultados que bem falam a favor de uma medida higiênica, conforme vamos explicar no último capítulo.

GRANJA N.º 4

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos de 1934, 1935, 1936.

N.º de Contagens	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
25	—	4 ou 16,00	0 — 10.000	68,00%
		3 ou 12,00	10.001 — 20.000	
		2 ou 8,00	20.001 — 30.000	
		1 ou 4,00	30.001 — 40.000	
		2 ou 8,00	40.001 — 50.000	
		2 ou 8,00	50.001 — 60.000	
		1 ou 4,00	60.001 — 70.000	
		—	70.001 — 80.000	
		2 ou 8,00	80.001 — 90.000	
		—	90.001 — 100.000	
		2 ou 8,00	100.001 — 200.000	32,00
		2 ou 8,00	200.001 — 300.000	
		2 ou 8,00	300.001 — 400.000	
		—	400.001 — 500.000	
		2 ou 8,00	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia. aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	4	11	5	—	—
Porcentagens	20,00	55,00	55,00	—	—

Pesquisas Positivas — 20 — 100,00%

Pesquisas Negativas — 0

Número de Pesquisas — 20

A granja n.º 4 iniciou com determinada direção em 1934, e em 1937 passou a outra orientação, n.º 4 A, com reformas nas suas instalações, adaptações de maquinários modernos de esterilização e melhoria geral, não só dos estábulos, como da sala de ordenha.

GRANJA N.º 4-A

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos de 1936 — 1937.

N.º de Contagens	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
26	1 ou 3,84	10 ou 38,46	0 — 10.000	61,51%
		3 ou 11,54	10.001 — 20.000	
		1 ou 3,84	20.001 — 30.000	
		—	30.001 — 40.000	
		—	40.001 — 50.000	
		—	50.001 — 60.000	
		1 ou 3,84	60.001 — 70.000	
		1 ou 3,84	80.001 — 90.000	
		—	80.001 — 90.000	
		—	90.001 — 100.000	
		4 ou 15,38	100.001 — 200.000	32,00
		2 ou 7,69	200.001 — 300.000	
		1 ou 3,84	300.001 — 400.000	
		—	400.001 — 500.000	
		2 ou 7,69	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	5	8	10	3	—
Porcentagens	18,51	29,62	37,03	11,11	—

Pesquisas Positivas — 26 — 96,27%
 Pesquisas Negativas — 1 — 3,70%
 Número de Pesquisas — 27

Os métodos de trabalho na sua primeira fase, (n.º 4), eram irregulares; notamos que não houve propriamente nenhuma classe que contivesse número de exames que sobrepujasse as outras, isto é, houve uma certa igualdade na distribuição dos resultados pelas classes. Isto é um fenômeno interessante quando se estuda uma táboa estatística, concluindo-se do que foi dito que os métodos de trabalho não são muito bons e não são também uniformes.

Na 2.^a fase, (n.º 4 A), os resultados pioraram, apesar das novas instalações, denotando que não basta aparelhagem moderna, é obrigatório que os métodos sejam tão rigorosos como constantes.

No quadro n.º 4, a incidência do coli não foi além da diluição de 1/100, e no quadro n.º 4 A, ela subiu a 1/1.000.

GRANJA N.º 5

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos de 1934, 1935, 1936, 1937.

N.º de Contagens	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
55	—	5 ou 9,09	0 — 10.000	
		5 ou 9,09	10.001 — 20.000	59,95%
		8 ou 14,54	20.001 — 30.000	
		4 ou 7,27	30.001 — 40.000	
		4 ou 7,27	40.001 — 50.000	
		1 ou 1,81	50.001 — 60.000	
		1 ou 1,81	60.001 — 70.000	
		2 ou 3,63	70.001 — 80.000	
		1 ou 1,81	80.001 — 90.000	
		2 ou 3,63	90.001 — 100.000	
		6 ou 10,90	100.001 — 200.000	39,97
		1 ou 1,81	200.001 — 300.000	
		1 ou 1,81	300.001 — 400.000	
		—	400.001 — 500.000	
		14 ou 25,45	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	12	19	12	3	2
Porcentagens	24,00	38,00	24,00	6,00	4,00

Pesquisas Positivas — 48 — 96,00%

Pesquisas Negativas — 2 — 4,00%

Número de Pesquisas — 50

Eis aqui, um estabelecimento que poderia fornecer um produto muito melhor que fornecia.

As suas instalações eram boas, suas aparelhagem de primeira ordem, e a sua produção não muito elevada. No entanto, a direção não era satisfatória. Não é a mesma coisa, dirigir um estabelecimento agrícola e uma granja leiteira, granja esta que vai fornecer um leite especial para crianças e doentes.

Técnica só se adquire com estudo e observação, e higiene não se faz quando não há pessoal preparado para o mister. A educação da capatazes e gerentes para granjas é um problema intimamente ligado à melhoria da qualidade do leite, aliás já iniciado pelo Departamento de Indústria Animal.

Não podemos destacar do quadro acima, nenhuma classe com uma porcentagem sensivelmente alta. No quadro representativo da incidência do coli, verificamos que, mesmo na alta diluição de 1/10.000, existia 4.00% dos resultados; e este era um leite que se fornecia cru, para crianças e doentes!

GRANJA N.º 6

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos de 1935, 1936, 1937.

N.º de Contagens	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
122	3 ou 2,45	2 ou 1,63	0 — 10.000	36,81%
		5 ou 4,09	10.001 — 20.000	
		7 ou 5,73	20.001 — 30.000	
		8 ou 6,55	30.001 — 40.000	
		8 ou 6,55	40.001 — 50.000	
		1 ou 0,81	50.001 — 60.000	
		4 ou 3,27	60.001 — 70.000	
		6 ou 4,19	70.001 — 80.000	
		—	80.001 — 90.000	60,62
		4 ou 3,27	90.001 — 100.000	
		10 ou 8,19	100.001 — 200.000	
		5 ou 4,09	200.001 — 300.000	
		8 ou 6,55	300.001 — 400.000	
		6 ou 4,91	400.001 — 500.000	
		45 ou 36,88	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições-	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	15	30	34	29	11
Porcentagens	12,60	25,21	28,57	24,36	9,24*

Pesquisas Positivas — 119 — 100,00%
 Pesquisas Negativas — 0
 Número de Pesquisas — 119

Esta granja foi o primeiro estabelecimento que introduziu na prática, na Capital, a ordenha mecânica. Montada com técnica e dotada de requisitos indispensáveis à uma boa produção, tudo fazia crer que os resultados seriam ótimos.

Contíguo aos estábulos, achava-se a sala de ordenha, limpa, higiene, e bem disposta. Eram os animais tratados antes de receberem os cones das ordenhadeiras, e os recipientes depósitos, uma vez cheios, eram transvasados nos tanques especiais, para sofrerem o resfriamento e em seguida o engarrafamento. A técnica da manipulação era boa, metódica e os primeiros resultados foram bons, baixando o teor de germens à medida que o operariado ganhava prática. Poucos eram os resultados acima de 50.000 germens, mas a incidência do "coli" vinha demonstrando que havia falhas.

Realmente, a aparelhagem para ordenha mecânica é complexa, com peças desmontáveis, mas cheias de junções, necessitando de cuidados extraordinários afim de se obter boa limpeza. Demais, a esterilização das superfícies que entram em contacto com o leite, é imprescindível e delicada, pois não podem ser usados todos os meios físicos ou químicos, devido ao grande número de sobressalentes de borracha ou atacáveis pelos ácidos ou álcalis.

Em resumo, a ordenha mecânica é o ideal, mas obriga necessariamente a gastos bem consideráveis, como complemento "sine qua non" à obtenção de sua finalidade.

Foi o que aconteceu com o estabelecimento que estudamos. O segundo ano de funcionamento primou por um aumento gradativo das contagens bacterianas, raramente descendo abaixo da casa dos milhões. Estas contagens predominaram e no quadro junto, notamos uma diferença sensível entre esses resultados e aqueles obtidos pelos outros estabelecimentos. Evidentemente que não se poderia incluir esta granja entre aquelas que poderiam servir de base ao estabelecimento do primeiro padrão provisório.

Não porque a sua aparelhagem não fosse eficiente, mas porque os métodos de trabalho não eram corretos. Nunca obtivemos resultados da pesquisa de coli negativos, vindo de encontro ao princípio básico da ordenha mecânica, que é o afastamento de contaminações exteriores.

GRANJA N.º 7

Grupamento dos resultados das contagens em Placas, nas diferentes classes.
Anos de 1935 e 1936.

N.º de Contagens	Resultados Incontáveis	Frequência nas Classes	Classes	
42	3 ou 7,14	—	0 — 10.000	
		—	10.001 — 20.000	
		—	20.001 — 30.000	
		—	30.001 — 40.000	
		—	40.001 — 50.000	
		—	50.001 — 60.000	
		—	60.001 — 70.000	
		—	70.001 — 80.000	
		—	80.001 — 90.000	
		—	90.001 — 100.000	
		—	100.001 — 200.000	
	3 ou 7,14	3 ou 7,14	200.001 — 300.000	92,85
	3 ou 7,14	3 ou 7,14	300.001 — 400.000	
	—	—	400.001 — 500.000	
	33 ou 78,57	33 ou 78,57	Mais de 500.000	

Pesquisas de Elementos do Grupo *Escherichia aerobacter*

Diluições	1 cc.	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000
Ex. positivos	—	1	14	14	13
Porcentagens	—	2,38	33,33	33,33	30,95

Pesquisas Positivas — 42 — 100,00%
 Pesquisas Negativas — 0
 Número de Pesquisas — 42

Poucos comentários devem ser feitos sobre os resultados dessa granja. Em 42 contagens, não se obteve nenhum resultado inferior a 200.000.

De tal ordem eram mal feitas as técnicas de trabalho que em ocasião oportuna foi este estabelecimento fechado como granja, pela Inspetoria do Leite.

Relatamos aqui estes resultados, não com o intuito de querer-mos juntá-los aos outros para daí concluir sobre um padrão provisório, mas apenas para demonstrar em que condições higiênicas pode um leite ser produzido, numa região próxima do centro urbano, com enormes possibilidades de recursos. Durante um tempo, a ordenha nesta granja era mecânica, porem quando feita à mão, os resultados eram melhores, de acordo com o que acima dissemos.

2.^a PARTE

Em Julho de 1938, a Inspetoria de Fiscalização do Leite e Laticínios foi extinta, por decreto governamental. As análises bacteriológicas do leite passaram para o Laboratório Bromatológico, seguindo a mesma técnica, apenas mudando o tempo de incubação das amostras semeadas, para 48 horas. Em Novembro de 1940, constituiu-se o Instituto Adolfo Lutz, pela junção dos tradicionais Instituto Bacteriológico e Laboratório Bromatológico, passando então as análises bacteriológicas a serem feitas na subdivisão de Bromatologia e Química da novel organização. As técnicas adotadas sofreram modificações radicais, variando também a temperatura de incubação das amostras e a composição qualitativa dos meios de cultura empregados.

Resultou daí que os dados passaram a ser heterogêneos, não mais podendo ser comparados, perdendo-se um tempo precioso e um material inestimável, bem como dinheiro inútil.

As modificações introduzidas têm o alto mérito de aperfeiçoar a técnica de controle, procurando atingir a perfeição, em prol de uma campanha de melhoria dos gêneros alimentícios. O laboratório técnico tem por obrigação aperfeiçoar os métodos, resultando modificações periódicas daqueles já estabelecidos. O higienista, a polícia sanitária, enfim, deve caminhar em harmonia com o laboratório, afim de utilizar os resultados obtidos de forma racional e proveitosa.

Parece que não foi este o caminho tomado.

Quando catalogamos os resultados das análises bacteriológicas dos leites, e neste caso, os de granjas, foi com o único intuito de comprovar o estado do leite desta espécie, e daí, propor um padrão

provisório consentâneo com o nosso meio e as nossas condições verdadeiras. Não chegamos a formulá-lo por motivos já expostos — falta de continuidade no serviço. Porisso, extranhou-nos sobretudo, quando tivemos conhecimento do decreto 10.395, de 26 de julho de 1939 que em seu artigo 259, dizia:

“O leite pasteurizado tipo “A”, deve preencher as seguintes condições:

- a) ser produzido e beneficiado em granjas leiteiras, de acordo com as exigências legais;
- b) ser distribuído ao consumidor dentro de 18 horas, a contar do seu beneficiamento;
- c) ter acidez entre 16 e 18° Dornic;
- d) conter 20.000 germes por centímetro cúbico no máximo, com predominância da flora acidificante do leite;
- e) apresentar prova de redutase não inferior a 9 horas para o início da descoloração.”

O citado decreto sofreu pequenas modificações posteriormente, mas ainda no mesmo ano, sem grandes transformações para aquilo que vamos expor.

Qual o critério adotado para vir em apóio à fixação do padrão do leite tipo “A” (Granjas) em 20.000 germens por cc., após a pasteurização?

Os estudos por nós praticados referiam-se a resultados obtidos de amostras de leites de granjas, crú, colhidas do carro de distribuição, pois na vigência do decreto 6.603, não era obrigatória a pasteurização do leite tipo “A”. O tempo de incubação das amostras era de 24 horas.

O decreto 10.395, não cogitava do número de germens existentes no leite antes da pasteurização, mas somente depois dela, mas como esta só passou a ser feita em data posterior ao decreto ou, pelo menos, pouco antes dele, julgamos não ter havido estudo nenhum que viesse justificar a medida. O padrão foi arbitrário. Os nossos estudos não serviriam para justificar o que foi feito pela simples razão de se tratar de estudo efetuado em leite crú, e o padrão atual de leite pasteurizado. Serviriam sim, para o estabelecimento de um padrão de leite crú de granjas, antes de ser pasteurizado, deixando-se para mais tarde a fixação do número máximo de germens após a pasteurização.

O número de amostras examinadas de leite de granjas em 1939 e 1940 até a passagem dos laboratórios para o Instituto Adolfo

Lutz, é apenas de oito, sendo que somente um anterior ao decreto 10.395. São os seguintes os seus resultados, dispostos pela ordem cronológica:

Número	Data	Contagem Breed	Contagem placas	Grupo coliforme
2.288	17.5.39	500.000	1.300.000	1/100
5.674	10.8.39	1.200.000	160.000	1/10.000
5.675	10.8.39	1.200.000	17.000	1/100.000
5.676	10.8.39	330.000	300	10 cc.
5.677	10.8.39	230.000	70.000	1 cc.
1.952	29.4.40	—	12.000	1/100
3.242	17.6.40	100.000	1.800	Negativo
3.485	—	90.000	80.000	1/1.000

Aufere-se daí que mesmo sendo pasteurizado, somente 4 resultados ou 50%, acham-se abaixo da classe de 20.000, todos os demais muito acima, equivalendo-se numericamente aos nossos resultados sobre o leite cru. O coli achava-se representado em diferentes diluições, em 7 das amostras.

Pois bem, com resultados assim conseguidos, que demonstram numa orientação higiênica, má manipulação e falta de técnica, ficamos julgando que o padrão ou seria modificado ou intensificadas as colheitas de amostras, afim de, com dados mais amplos, concluir alguma coisa de vantajoso para uma orientação completamente nova entre nós: a pasteurização do leite produzido em condições de excepcionais requisitos técnicos.

Na realidade, isto não aconteceu.

3.^a PARTE

A unificação dos laboratórios de controle sanitário no Instituto Adolfo Lutz, que passou a ser o Laboratório Central de Saúde Pública, veio tecnicamente concretizar uma antiga aspiração de velhos servidores do Estado.

Os exames bacteriológicos de leite sofreram alterações na sua técnica, consoante atrás já expuzemos. Os resultados obtidos até 1938, depois em 1939-40, e em seguida, 1940 (depois de outubro) e 1941, são heterogêneos, conforme as razões expostas. Mas, al-

guma dedução utilitária sempre é possível tirar procurando estabelecer um estudo paralelo entre eles.

Vejam os. Após Outubro de 1940, já no Instituto Adolfo Lutz, somente sete exames foram praticados nos leites de granjas até Dezembro de 1941. Eis os seus resultados:

Número	Data	Contagem placas	Grupo coli-aerogenes
9	13.11.40	100.000	1/10
12	20.11.40	7.000	1/mil
13	20.11.40	75.000	1/mil
40	13.12.40	120.000	1/10 mil
8	13.1.41	14.000	1/100
11	14.1.41	500	1 cc.
26	5.2.41	4.000	1/100

Si bem que com técnicas diferentes, mas segundo informações do Chêfe da Subdivisão de Química, sob cujas vistas acha-se a subsecção de controle de produtos, os métodos introduzidos eram mais rigorosos e portanto mais sensíveis, obtendo-se uma maior porcentagem de colônias, comparativamente aos métodos anteriormente adotados.

Conclue-se daí, que houve indiscutivelmente uma melhora geral dos resultados, provavelmente em razão do aperfeiçoamento da técnica da pasteurização e de suas co-manipulações subsidiárias. Assim mesmo, dos sete exames praticados, somente 4 o 57,14%, acham-se abaixo da classe de 20.000, os restantes muito acima.

Bem, si considerarmos numericamente os resultados do biênio 1939-1940 e do seguinte, 1940-1941, todos eles obtidos de amostras de leites pasteurizados, concluimos que houve evidentemente uma melhora, mas não tão acentuada, capaz de por sí justificar uma nova baixa do padrão bacteriológico marcado pelo decreto 10.395.

Mesmo sem uma justificação numérica, outra havia para que não se processasse tal alteração — a modificação dos métodos de exames.

Porisso, si não julgamos com base satisfatória a fixação do padrão em 20.000 germens por cc., feita pelo decreto 10.395, muito menos nos satisfizemos com a diminuição do mesmo introduzida pelo Decreto 12.216, de 7 de outubro de 1941. Este decreto modificou o art. 259, do decreto 10.395, limitando ao máximo de 5.000

por cc. o número de germes do leite pasteurizado, continuando a não cogitar do número deles antes da pasteurização. Si a simples diminuição do padrão não encontrava justificação plena, muito menos ainda a persistência do erro grave em não se exigir um máximo de germes no leite crú, que deve ser pasteurizado. É imprescindível que se extenda a pasteurização, como se fez, a todos os tipos de leite, mas não basta pasteurizar só, é condição obrigatória que, para se obter um bom produto pasteurizado, este preencha requisitos especiais, antes da pasteurização. No trabalho anterior, entramos em detalhes do porque deste principio que em hipótese alguma deve ser esquecido na higienização do leite.

Com a água não acontece a mesma coisa. Ela pode ser purificada, desintoxicada, quer por processos químicos ou mecânicos, sem no entanto sofrer alteração. O leite é diferente, representa o produto de secreção de células vivas, tem constituição complexa, possui em equilíbrio várias substâncias dissolvidas, cujo rompimento acarreta alterações profundas na sua composição. Além do mais, é ótimo meio de cultura e o crescimento bacteriano não só transforma elementos básicos na composição físico-química do todo, como produz corpos tóxicos que não podem ser removidos sem uma modificação completa do produto.

Há quem diga que “a pasteurização começa na ordenha e termina na entrega ao consumidor”. Preferimos denominar a este todo — higienização — sendo a pasteurização apenas uma parcela, pois isoladamente pouco representa.

A modificação introduzida pelo Decreto 12.216, foi infundada e persistiu num erro grave. Esperamos porém, que qualquer coisa de muito importante esteja se praticando, afim de salvaguardar o interesse do consumidor, que é o único a quem devemos dar todas as nossas atenções.

O decreto 10.395, cogita em seu art. 262, de uma escala de pontos. Esta foi modificada pelo decr. 12.216; ei-la:

I — *Exame geral:*

a) sabor	30 pontos
b) aroma	15 "
c) aspecto (formação de creme)	3 "
d) grau de limpeza (prova de filtração) ..	2 "
	<hr/>
TOTAL	50 "

II — *Exame bacteriológico:*

a) teor de germens	30 pontos
b) ausência de coli	15 "
c) prova de redutase	5 "
TOTAL	50 "

Parece-nos que tal escala é não só de difícil apuração (sabor-
aroma), como incorreta. Como podemos premiar com 15 pontos
a "ausência do coli", si este não deverá existir nunca num leite
entregue ao consumo? O coli é um índice de contaminação, além
de produzir por si alterações tóxicas nos organismos humanos. A
sua ausência não deve ser premiada, mas punida, sim, a sua pre-
sença.

Quanto ao aspecto (formação de creme), é um fato variável.
Sabemos que a camada de creme é formada pelas gotículas de gor-
dura existentes em suspensão no leite. Estas gotículas, de den-
sidade inferior à unidade, sofrem uma impulsão de baixo para cima,
de acordo com as leis da física, e a velocidade de ascensão é varia-
vel, conforme o diâmetro delas — tanto menor o glóbulo de gor-
dura, tanto mais lenta é sua ascensão. Ora o diâmetro dos gló-
bulos varia com a maneira de ordenha, com a maior ou menor
agitação, com o tipo de pasteurização, etc.. Para glóbulos de igual
tamanho, a camada de creme varia com a temperatura de manu-
tenção do leite, tempo de permanência em repouzo, altura da co-
luna líquida, densidade do meio, etc.. Como ajuizar pela simples
espessura da camada de creme, si um leite é melhor que outro?

Estamos saindo um pouco da alçada deste trabalho, mas si
aqui entramos em detalhes, é com o único intuito de esclarecer pon-
tos obscuros para uma desinteressada tentativa de melhoria.

CONCLUSÃO

Pelo exposto conclue-se:

- 1) Até dezembro de 1937, a maior parte dos leites de gran-
jas apresentavam contagens com elevada porcentagem abaixo de
100.000;
- 2) que a pasteurização é uma medida indispensavel na higie-
nização mesmo dos melhores tipos de leite;

3) que, mesmo com requintes de técnica, não pode haver garantia absoluta de que um leite cru esteja isento de germens patogênicos, desde que ele seja produzido em grande escala;

4) para os leites tipo A, mais do que para qualquer outro tipo de leite, a pasteurização deve ser imediata à ordenha;

5) é imprescindível que se fixe o número de germens do leite antes de pasteurizar.

6) o tempo de entrega ao consumidor deve ser contado a partir da ordenha, o que representa a idade real do leite, mas nunca da pasteurização, o que facilita a fraude.

O LEITE, MOLHAGEM E SEU PADRÃO

ANTONIO CARLOS SEIXAS,

Químico do Instituto Adolfo Lutz.

O leite, a carne e o pão, são os alimentos mais antigos e importantes para o homem.

A razão pela qual a indústria leiteira tem sido suficiente à alimentação popular, consiste em que o leite oferece à pobres e ricos uma bebida nutritiva e tolerável; às crianças, o melhor substituto do leite materno e aos enfermos um reconstituente restaurador. Com a manteiga provem a mesa e a cosinha da melhor gordura comestível e proporciona com o queijo um alimento forte e apreciado manjar.

É alimento e bebida ao mesmo tempo, de valor incontestável, contendo todas as substâncias nutritivas indispensáveis em relação sempre à idade dos jovens mamíferos.

O leite de vaca proporciona a melhor manteiga, o de ovelha, o melhor queijo, o de búfala e de cabra os melhores leites fermentados e derivados dos mesmos.

O leite de vaca possui o sabor mais puro e agradável de todas as classes de leite. Sua proporção em matérias nutritivas é em média de 1:3,74. Seu valor terapêutico também é incontestável.

Já na antiguidade, no princípio de nossa era, lugares de saúde havia (sanatórios), onde se podia proceder à cura pelo leite. Por exemplo, segundo narra Flavius Aurelius Cassiodorus, entre Sorrento e Nápoles encontrava-se um sobre o "Monte de Leite" (mons Lactarius) para onde ele mandou um creado tísico chamado Damus, para que se curasse ou melhorasse de sua moléstia.

Muitos admitem que o leite das mães que criam seus filhos, contem não somente a matéria nutritiva necessária, mas também certa força misteriosa, unida à uma "enzima" chamada vitamina que fomenta a nutrição no corpo das crianças e produz uma particular ação fortificante e preservadora.

O leite fresco, de vaca, também possui essa propriedade que não só exerce ação sobre os bezerras como também sobre as crianças de peito alimentadas com ele.

Por isso, acredita-se modernamente que, ferver o leite de vaca destinado à alimentação das crianças é pouco conveniente e contrário a natureza. Hoje procuram-se eliminar os germes nocivos existentes no leite cru pelo processo da pasteurização de modo que possa conservar a citada propriedade.

A porção de substâncias nutritivas do leite de mulher é muito maior que o de vaca e tem o valor médio de 1:16.

Por infelicidade, o modo como se trata ele, ao ordenhá-lo, antes de sua venda, durante a mesma e especialmente em casa, antes de tomá-lo, deixa muito que desejar...

A finalidade desta palestra, se refere somente ao leite de vaca que é o mais comercializado nesta capital.

Desde 1934 vinhamos observando a necessidade de uma demonstração como a que pretendemos fazer. Se não a fizemos há mais tempo foi por falta de dados em que nos pudessemos basear.

Graças à boa vontade e prestígio do Sr. Dr. Bruno Rangel Pestana, agora isso nos foi possível.

Nosso ponto visado é a fraude e a mais comum delas é a molhagem, que trataremos com particularidade.

Antes entretanto, de entrarmos no âmago da questão, queremos fazer certas referências quanto às determinações físicas e químicas do leite e algumas opiniões a respeito.

O leite, como todos sabem, tem como componentes principais o seguinte: Matéria gorda,

Lactose,

Matérias azotadas,

Matérias minerais, cujo conjunto constitui o resíduo, a matéria seca ou o extrato seco do leite que variam de quantidade com a alimentação, o trabalho, o estado de saúde dos animais, a raça, o momento do trato e o tempo decorrido depois do parto.

As determinações físicas e químicas do leite mais necessárias à sua fiscalização são as seguintes:

Densidade
 Acidez
 Extrato seco
 Gordura
 Extrato seco desengordurado
 Refração do soro
 Índice creoscópico
 Densidade do soro.

DENSIDADE:

A densidade absoluta da matéria é a massa da unidade de volume de substância. A densidade a uma temperatura dada é a densidade relativa, isto é, a relação entre a densidade a uma temperatura dada, relativa, e a densidade de uma substância padrão (água), também na mesma temperatura ou para água a 4°C, seu ponto de densidade máxima.

É igualmente uma propriedade aditiva e dependente da quantidade de matéria dissolvida e em suspensão.

A gravidade específica do leite integral com conteúdo de gordura ordinário varia segundo,

Davies	de 1,028 a 1,034
Labarre e Vazques Schmidt	de 1,029 a 1,033
Winton and Winton, Farrinton and Woll	de 1,029 a 1,035
Rogers	de 1,028 a 1,034

Segundo Fleischmann, se se determina a densidade de uma mesma amostra de leite imediatamente depois da ordenha à temperatura inferior a 30°C, e outra vez no espaço de quatro a seis horas, encontra-se sempre na segunda determinação uma densidade mais elevada. A diferença varia de cinco décimos de milésimo (0,0005) a um milésimo e meio (0,0015), em média um milésimo do peso específico.

Este fenômeno observado pela primeira vez por Quevenne em 1841, tem origem em diversas causas: ao escapamento dos gases dissolvidos, à ascensão em massa dos glóbulos gordurosos; à evaporação da água; à dissolução lenta de certos corpos sólidos pouco conhecidos em certos detalhes que se encontram em suspensão; ao aumento de volume posterior da caseína; à modificação na estrutura molecular da lactose e por fim à lenta solidificação da gordura

que permanece líquida durante a ordenha solidificando-se devido ao resfriamento do leite pelo repouso.

É digno de nota e vem contra o que se sabe a respeito da relação existente entre a densidade e o teor de gordura: que o leite rico nessa substância apesar da sua abundância em componentes de pouca densidade, não tem uma densidade baixa, e que o leite pobre em gordura, não possui densidade maior.

E isto é devido a que o leite rico ou pobre em teor de gordura é geralmente rico ou pobre nos restantes componentes sólidos.

Comumente, as oscilações do peso específico seguem exatamente as da porcentagem do leite em extrato seco desengordurado.

IMPORTÂNCIA DO CONHECIMENTO DA DENSIDADE

A água tendo uma densidade inferior à do leite, a adição de água abaixa a densidade. A gordura tendo igualmente uma densidade inferior à do leite, a desnatação a eleva.

O conhecimento da densidade permite pois, suspeitar de molhagem ou desnatação do leite. A molhagem e desnatação bem conduzidas, simultaneamente, permitem conservar ao leite uma densidade normal, mas nesse caso o teor de gordura se acha muito diminuído. Ela variando de um leite a outro, pois que é função do teor de gordura que a abaixa, e do teor de lactose, caseína e sais que a elevam é impossível somente com a densidade, afirmar se um leite é ou não fraudado.

Uma molhagem de 3,3% segundo Pierre Dornic, abaixa de uma unidade a densidade. No laboratório deste Instituto, tivemos a oportunidade de constatar que esta afirmativa de Dornic, se não é exata, pelo menos é aproximada, para menos ou para mais, conforme o comportamento da densidade do leite molhado.

O nosso código sanitário não fixa limites para a densidade.

É uma medida criteriosa, considerando que o leite fornecido à S. Paulo não provem de uma só zona, de uma só raça, etc. Entretanto esses limites poderão ser fixados desde que as autoridades competentes verifiquem, de zona para zona, de raça para raça, etc., até onde os ditos limites poderão alcançar.

Para provar essa afirmativa, embora em número reduzido de leites individuais de diferentes raças fornecidos pela Indústria Animal, por ocasião da X.^a Exposição de Animais, verificamos

oscilações da densidade de uma raça para outra de ordenha para ordenha, no mesmo dia, e que o máximo de densidade foi 1,0354 e o mínimo 1,0284.

ACIDEZ

O leite possui as propriedades de uma emulsão, de um suspensoide e de uma solução salina. A nós interessa considerar-lo como uma solução salina.

Segundo Fleischmann, nunca o leite reage como um líquido neutro. Só pode apresentar uma reação muito fraca em um ou em outro sentido e a questão de referência não pode ser decidida com o auxílio de nossos sentidos.

Somos obrigados a nos servirmos de substâncias químicas, chamadas indicadores que por menor predomínio de uma ou de outra reação, perdem ou trocam sua cor.

Os corpos que intervêm na produção da acidez, comportam-se diferentemente em contacto com os reativos ácidos ou alcalinos em presença dos diversos indicadores coloridos. Os indicadores empregados no estudo do leite são: Metil orange (helianthine), lacmoide (matéria corante extraída do tournesol), o tournesol e principalmente a fenolftaleína.

Atualmente não se emprega como indicador senão esta, cuja zona de viragem afirmada por Dognon, principia com o pH 8,1 e segundo Monvoisen de 8,3 para fenolftaleína vermelha e incolor em pH 7,7.

É evidente que somente os princípios naturalmente solúveis ou solubilizados terão ação sobre a propriedade que possui o leite de ser alcalino, neutro ou ácido em presença de certos reativos coloridos. Os princípios em solução existem em proporções muito diferentes.

A lactose que os leites contêm em quantidades muito notáveis, 45 a 50 gramas por litro, não têm nenhuma influência sobre o grau de acidez do mesmo.

Age indiretamente favorecendo a solução do fosfato de cálcio pelos citratos alcalinos. O cloreto de sódio e alguns outros constituintes das cinzas não têm nenhuma ação. Não acontece o mesmo com outras substâncias minerais principalmente os fosfatos, que no leite de vaca são os seguintes: fosfato dí-sódico e fosfato tri-cálcico.

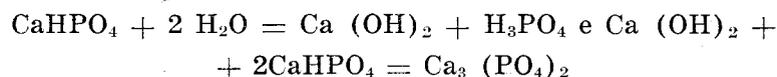
Somente o primeiro é solúvel mas o segundo é solubilizado facilmente em presença da lactose pelo citrato de sódio que se encontra no leite.

Os fosfatos ácidos intervêm nitidamente na produção da acidez.

Em fim, o leite não sendo aquecido, contém por litro, 30 a 60 cm³ e às vezes até mais de ácido carbônico dissolvidos e sua ação sobre a acidez não deve ser desconsiderada.

Os resultados da determinação da acidez propriamente ditos, deixam bastante que desejar em segurança, pois como se sabe estão relacionados com a reação que experimentam os fosfatos do leite ao efetuar-se a dosagem.

Na opinião de L. von Slyke, o fosfato di-cálcico se decompunha por hidrólise: formava-se primeiramente hidróxido di-cálcico livre e ácido fosfórico livre, e logo com o hidróxido e nova quantidade de di-fosfato, se produzia fosfato tri-cálcico.



COMO EXPRESSAR A ACIDEZ DO LEITE

Seria lógico exprimir a acidez do leite pela concentração em ions hidrogênio. Monvoisen acha que ela não é expressa dessa maneira pelo fato de ordinariamente ser determinada por meio de solutos alcalinos titulados por números de cm³; "graus de acidez" Soxhlet-Henkel, Thorner, Dornic etc., para saturar um volume determinado de leite, 100 cm³, 50, 10, um litro.

Entretanto na nossa opinião os motivos apresentados por Monvoisen não bastam para explicar porque razão a dosagem da acidez não se faz considerando a concentração em ions de hidrogênio.

É que o leite tem um comportamento todo especial para com o pH.

C. Foa, estudando a reação real do leite considerando os ions de hidrogênio constatou que os mais usuais tinham uma reação muito visinha da neutralidade.

Constatou também para o leite de uma mulher após 6 meses de lactação o log. cH = — 7,66 e para o leite de jumenta o log.

CH = — 7,64, o que corresponde a mais ou menos a reação de uma solução de soda $\frac{N}{60.000.000}$.

Para o leite de vaca achou o log. CH = — 6,68; para o de cabra — 6,59 o que corresponde a uma solução de ácido clorídrico $\frac{N}{60.000.000}$.

O sôro do leite de vaca coagulado espontaneamente em quatro dias, havia uma acidez correspondente à de uma solução de ácido clorídrico $\frac{N}{100.000} = \text{log.CH} = -5,008$.

Os graus de acidez Soxhlet-Henkel empregados na Suíça, indicam o número de Cm³ de soda 1/4 normal, saturando a acidez de 100 cm³ de leite. Porém, como o leite tem uma reação ácida parece mais lógico indicar a que quantidade de um ácido dado corresponde a reação do leite examinado. Certos autores expressaram essa acidez em ácido sulfúrico.

Esta maneira de proceder é irracional, porque sobre a existência de sulfato no leite, ha muitas opiniões divergentes.

Vaudin calculou a acidez em anidrido fosfórico, mas não em ácido orto fosfórico. Os fosfatos intervêm bastante para dar ao leite seu caráter ácido, mas a acidez devida à eles está ainda longe de ser sequer a metade da acidez total.

Diante da impossibilidade de exprimir de maneira satisfatória a acidez indicando os elementos que nela intervêm, resolveu-se em França, exprimi-la em ácido láctico. Este não preexiste nos leites mas se produz — muito rapidamente quando eles são contaminados e mantidos em temperatura favoravel à pululação dos micro-organismos.

A formação do ácido láctico verdadeiro é pois um índice sério de alteração dos leites e como determinação da acidez tem por fim unicamente esta constatação, este modo de expressar é vantajoso.

Para comodidade dos cálculos e facilidade de expressão, em França empregam-se soluções alcalinas (soda, de maneira que 1/10 de cm³ dessa solução venha saturar aproximadamente 0,001 gr. de ácido láctico, que é o grau Dornic. Para essa correspondência

prepara-se uma solução $\frac{N}{9}$ de soda, que vem a ser 4,444 grs. por litro.

Entre nós, na indústria leiteira, a acidez é expressa em graus Dornic sobre 10 cm³ de leite.

Soldner, em 1888 mostrou que a adição de água ao leite diminuía notavelmente sua acidez.

100 cm³ de leite eram saturados por 6 cm³ de soda $\frac{N}{4}$ em presença da fenolftaleína e não precisavam mais que 3,5 cm³ da mesma solução para 100 cm³ de leite, adicionado de 1.000 de água.

Um leite com 1,94 grs. de ácido láctico por litro ou 19,4° Dornic, diluído 5 vezes seu volume com água destilada neutra, não dá mais que 1,44 de ácido láctico. Diluído 10 vezes seu volume encontram-se 1,25 grs. do mesmo ácido por litro. Dornic diz que a adição de 10% de água abaixa a acidez de dois a três graus se sua determinação tem lugar pouco tempo depois da fraude de maneira que a acidez adquirida não venha mascarar esse abaixamento.

A diminuição da acidez do leite pela adição de água, maior que a correspondente pela diluição, deve ter origem em uma dissociação mais acentuada dos elementos minerais do leite, dos fosfatos principalmente, traduzindo-se por um aumento do teor em ions (OH).

Van Dan constatou que a concentração em ions H passava de $0,16 \times 10^{-6}$ para o leite, a $0,10 \times 10^{-6}$ quando o mesmo era diluído com igual volume de água.

Dão-se naturalmente fenômenos de hidrólise sobretudo com os fosfatos. Estes fenômenos são fáceis de se pôr em evidência; sobre o leite titulado com a fenolftaleína como indicador e adicionado de água destilada neutra e quando a quantidade juntada é suficiente, vê-se aparecer uma coloração rósea muito pronunciada, bem maior que o róseo da viragem.

A fervura abaixa a acidez, sendo uma parte pela perda de gás carbônico. O resfriamento inferior a 6°C, abaixa a acidez. A adição de alcalinos também age da mesma maneira.

Um leite normal coalha à 70° Dornic, e quando molhado, com acidez nitidamente inferior. E' ainda Dornic quem nos diz que os

leites com acidez superior à 22° são: ou leites doentes, ou adicionados de colostro ou em vias de alteração.

A acidez permitida pelo nosso código está compreendida entre 16° e 20° Dornic.

REFRAÇÃO DO SORO

Quando um ráio luminoso passa obliquamente de um meio menos denso qualquer, para outro mais denso, sofre um desvio que é possível ser medido à custa de aparelhos especiais chamados refratômetros. Devido à opacidade do leite, sua refração é determinada geralmente no soro.

Este é preparado de vários modos principalmente pela coagulação da caseína, pela natural acidez ou ácido acético ou pela precipitação da proteína total com o sulfato de cobre ou cloreto de cálcio à quente. E' claro que o soro obtido pelos diversos precipitantes é de composição diferente, e em consequência disso os resultados para cada método não são comparáveis, mas sim, comparados a cada um dos precipitantes.

O aparelho usado é o refratômetro de imersão, no qual um prisma mergulha na solução contida em um banho de temperatura constante; a luz refletida de um espelho cai sobre a "solução e prisma" e a escala é movida até o ponto de "insidência" com um retículo, sendo o limite da sombra de luz obtido sobre a escala.

O aparelho é graduado arbitrariamente de -5° até 105° e estes são chamados "graus Zeiss".

Segundo Davies, as séries de valores obtidos de soros preparados diferentemente são:

Soro ácido	38° a 40°
Cloreto de cálcio	37,5° a 41°
Ácido acético	39° a 41°
Soro cúprico	37° a 39°

No caso deste último, muito poucas amostras excedem de 39°.

E' ainda de opinião que pela processo do sulfato de cobre a precipitação é mais facil, mais rápida e menos censuravel.

Beckel expõe que o soro assim obtido mostra a presença de água adicionada mais sensivelmente do que o cloreto de cálcio.

No laboratório deste Instituto estamos observando se essa afirmativa é ou não verdadeira.

Elsdon e Stubbs estabelecem que de 1.000 amostras de leites misturados, menos de 10 deram leitura inferior à 37°. Pela nossa legislação sanitária, o soro é preparado pelo cloreto de cálcio cujos limites são 36,5° e 41° Zeiss.

Este método foi introduzido por Ackermann em 1906.

Para o leite de vaca achou que o poder refrangente no soro pelo cloreto de cálcio não abaixa de 38° refratométricos na maioria dos casos. Em geral está compreendido entre 38° e 41°.

A determinação refratométrica do soro tem sido usada como meio de se verificar a adição de água ao leite. Para o de cloreto de cálcio na opinião de Fleishmann a adição de 10% de água abaixa o grau refratométrico de 2,5° a 2,6° e que este grau de refração é proporcional em geral, nem sempre exatamente, à porcentagem de extrato seco desengordurado.

O desenvolvimento da acidez aumenta a leitura e tanto isto é verdade, que Davies verificou que a diminuição da leitura devida à adição de 5% de água é impedida quando se conserva o leite por três dias.

Quanto à eficiência do cloreto de cálcio e ácido acético, ficará esclarecida no quadro de molhagem que procedemos neste laboratório.

CRIOSCOPIA

Crioscopia consiste em medir o abaixamento do ponto de congelação das soluções em relação ao ponto de congelação do solvente puro.

Raoul chamou crioscopia “a procura dos pontos de congelação dos corpos dissolvidos”.

Winter, em 1895, teve a ideia de aplicar este método ao leite, para descobrir a adição de água no mesmo.

A mais constante propriedade física do leite é seu ponto de congelação, isto é, a temperatura em que o leite, líquido, está em equilíbrio com o gelo, sólido. O valor de sua determinação como um meio de se distinguir o leite pobre do leite no qual foi adicionado água, não pode ser superado. O abaixamento do ponto de congelação do leite é uma propriedade aditiva mais concisa do que a densidade na qual influem fatores devidos à gordura. Esta não produz nenhum efeito na sua determinação e o resultado das proteínas é demasiado pequeno para medidas crioscópicas. Os consti-

tuintes que concorrem para o abaixamento crioscópico do leite, segundo Coste e Sheblourne, são:

<i>Constituintes</i>	<i>Porcentagem</i>	Δ (<i>Índice crioscópico</i>)
Lactose	4,7	0,25
Cloretos alcalinos	0,1	0,11
Outros sais e ions	—	0,20
TOTAL		0,56

Stoecklin asseverou que o leite recentemente retirado de qualquer variedade de gado; de boa raça ou inferior; de qualquer região do paiz; de animais de estábulo ou pasto; pobre ou substancialmente alimentado; tirado durante um período próximo ou remoto do parto; no inverno ou no verão; de manhã ou de tarde; ou se o produto é escasso ou abundante; tem um ponto de congelação definido, mais ou menos $-0,55^{\circ}$ C, não obstante, sobre várias influências, a composição química se altere em enormes proporções.

A ordem de variação do ponto crioscópico segundo vários autores, é a seguinte, citada por Davies:

<i>Autoridades</i>	<i>Números de amostras</i>	<i>Ordem de Δ (abaixamento crioscópico)</i>	<i>Média Δ</i>
Stoecklin	2.500	0,545 — 0,565	—
Henderson e Neston ...	grande	0,540 — 0,560	0,550
Mac Laurin	270	0,545 — 0,565	0,550
Winter	49	0,540 — 0,570	0,555
Ducrose e Imbert	?	0,533 — 0,575	—
Goorem	20	nenhuma abaixo de 0,540	—
Hummelinck	grande	0,542 — 0,570	—
Van Raalte	155	0,540 — 0,570	—
Keister	31	0,541 — 0,574	—
Stuber	262	0,530 — 0,562	0,546
Hortvet	75	0,534 — 0,562	0,548
Golding	91	0,543 — 0,564	0,550
Murphy	676	— — —	0,548
Buchanan e Lowman ..	133	0,537 — 0,582	0,577

As pequenas variações observadas nos máximos e mínimos dessa tabela não sabemos se são devidas ou não à falta de uniformidade dos métodos e de aparelhos usados pelos diferentes autores.

O índice de refração e o ponto de congelação, não guardam entre si nenhuma relação especial.

A transformação da lactose em ácido láctico, aumenta a concentração molecular abaixando sensivelmente o ponto de congelação.

Segundo Fleischmann, cada grau Soxhlet-Henckel faz abaixar o ponto de congelação de $0,0063^{\circ}$ a $0,008^{\circ}$ e raramente $0,009$, o que corresponde ao grau Dornic a $0,0025^{\circ}$ a $0,004^{\circ}$.

A adição de substâncias solúveis também o abaixa. Temos observado que a fervura do leite ao ar livre concorre para o abaixamento crioscópico do mesmo. Toda adição de água diminui a concentração molecular do leite, diminuindo seu ponto de congelação.

Se a diluição é levada ao infinito, ter-se-á quasi água pura, congelando-se cerca de 0°C ., isto é, a $0,55^{\circ}$ acima do ponto de congelação do leite normal.

Todos os intermediários são possíveis entre os dois extremos e, se uma elevação do ponto de congelação de cinquenta e cinco centésimos de grau faz passar do leite puro à água pura, é fácil calcular a qual proporção de água (sobre um volume total de 100 cm^3), corresponderá a elevação de um centésimo. É a relação entre a maior quantidade de leite na menor diluição, ou seja 1% dividida por 0,55 que é igual a 1,8.

Constata-se assim que é necessário uma adição de 1,8% de água pobre em sais para elevar o ponto de congelação de $0,01^{\circ}\text{C}$.

E Monvoisen ainda nos diz: "Os autores que se têm ocupado da crioscopia operando corretamente, são unânimes em reconhecer o valor desta para determinação da molhagem e o valor de suas taxas, sendo este o único processo que permite chegar à este resultado". Esta afirmativa foi satisfatoriamente confirmada pelas nossas molhagens efetuadas neste Instituto, como veremos adiante.

DENSIDADE DO SORO

Soro clorocálcico:

Tão sensível como o índice refratométrico é o peso específico do soro cloro-cálcico, na concepção de Ackermann.

Ambas determinações têm sensivelmente o mesmo valor. Fleischmann em diversas análises sobre o soro de coagulação espontânea, de coalho e de ácido acético, verificou que as diferentes classes de soro derivadas de uma mesma amostra de leite se distinguem

pelo fato de ser o peso específico do soro acético 0,0008 a 0,0012 mais elevado que o soro espontâneo do mesmo leite não pasteurizado.

Que a densidade do soro do leite ordinário e misturado, obtido pelo coelho ou pelos ácidos, só pode ser menor que 1,0260 a 15°C.

MOLHAGEM

De acordo com a quantidade de água potável adicionada ao leite, podemos dividir a molhagem do mesmo em duas: a pequena e a grande.

Um leite molhado tem geralmente uma densidade fraca, um teor em extrato seco e desengordurado igualmente fracos, uma acidez inferior a 16° Dornic, quando ele é fresco. Como a água possui uma densidade inferior à do leite, adicionando-se-lhe água abaixa a densidade e os limites desse abaixamento são relativos, dependendo como sabemos, das condições de equilíbrio entre os constituintes do produto. No leite normal, harmônico, esses constituintes variam todos em direções determinadas, mas no leite ao qual se lhe adicionou água ou uma substância estranha, eles serão modificados. Na grande molhagem, todos se acham diminuídos. Na pequena, nem todos do mesmo modo, isto é, abaixo do mínimo admitido pelo padrão em vigor, concluindo-se que não é possível a um fraudador, o mais habil, corrigir a adição de água. Se a ele lhe é permitido mascara-la com relação à uma determinação, lhe será impossível fazer correções para os outros e assim, por simples indicações, conclue-se que o produto foi tocado.

Um leite pode estar molhado sem que sua acidez se manifeste. Tratar-se-á então, de um leite ácido e molhado ou que a molhagem não foi suficiente para atingir seu limite mínimo.

Um fraudador bem experimentado, baseando-se em que a desnatação eleva a densidade, simultaneamente pode adicionar água e retirar matéria gordurosa em proporções tais que a densidade permaneça normal, ocultando assim a fraude nessa determinação. Nesse caso, porém, o teor de gordura, bem como os outros, estarão em diminuição.

A adição de água modifica a concentração molecular do leite, aumentando a temperatura de abaixamento de congelação do mesmo, isto, é aproximando-se da temperatura de congelação da água que é 0°. Infelizmente a adição de conservadores, substâncias solúveis, modificam este aumento de temperatura em sentido in-

verso, disto servindo-se os deshonestos e inteligentes, para desfazer a eficiência desta determinação, tornando-a normal pela concentração, encobrendo-se assim a molhagem, pela crioscopia. O mesmo pode acontecer quanto à refração do soro e sua densidade.

Tem-se proposto para denunciar essa fraude, constantes baseadas na apreciação das relações mais ou menos invariáveis que existem entre os constituintes individuais ou entre esses e constantes físicas, todas elas não dispensando uma análise completa do produto e segundo os autores, seus valores serão maiores, quando os resultados são comparados com leites autênticos fornecidos pelo mesmo indivíduo (vaca) ou pela mesma mistura.

Elas são em grande número e as citadas pelos autores são:

Constantes de Gross, Ackermann, Conalba, Bordin-Tourplain, Koesther, Kopatschek, Founze-Diacon, Marthieu-Ferré, etc..

Entre elas, a mais empregada é a que os franceses Marthieu e Ferré estabeleceram: a "constante molecular simplificada", que repousa sobre o equilíbrio que existe entre a lactose e o cloreto de sódio. Esta constante se obtém somando-se ao teor de lactose o seu equivalente isotônico em cloreto de sódio:

Uma grama desse sal, equivale isotonicamente a 11,9 de lactose, ou seja 360 grs. de lactose correspondendo a 30,25 grs. de cloreto de sódio, um grama desse corresponderá a $\frac{360}{30,25} = 11,9$.

E' suficiente pois multiplicar o peso do cloreto de sódio por 11,9, juntar ao peso de lactose para se ter a concentração molecular simplificada. Tem-se assim a C. M. S. Bruta.

$$C.M.S.B. = L + (Na Cl \times 11,9)$$

Mas esta C.M.S.B. se refere a um litro de leite e o certo seria a um litro de soro. Para se corrigir, isto é, avalia-la em um litro de soro, o mais facil foi diminuir do volume de um litro, o volume ocupado pelos insolúveis, (caseína, matéria gordurosa). Porém, como esses elementos são determinados em peso, e para se obter o seu volume correspondente, dividiram-se seus pesos pelas suas densidades, tendo a constante molecular simplificada real:

$$C.M.S.R. = \frac{C.M.S.B \times 1000}{1.000 - \frac{\text{albuminoides}}{1,35} + \frac{\text{graxa}}{0,93}}$$

que é o mesmo que:

$$\frac{\text{C.M.S.B.} \times 1.000}{\text{Soro}}$$

Porchet, tendo mostrado que o complexo coloidal intervinha na erioscopia, para -0,25 a -0,30, portanto tendo influência sobre a concentração molecular, porpoz determinar a C.M.S. real do seguinte modo:

$$\text{C.M.S. real} = \frac{\text{C.M.S.B.} \times 1.000}{1.000 - \frac{G}{0,93}}$$

De acordo com Dornic, a mínima achada para a C.M.S.R. é de 70 para os leites não fraudados.

Mas, para essa determinação, a dosagem dos cloretos deve ser rigorosa pois todos os erros possíveis são multiplicados por 11,9. E no caso de leites alterados, é necessário levar em conta para se calcular a lactose primitiva, não somente a acidez adquirida, porem ainda a hidrólise possível da lactose em glicose e galactose. Esta constante apresenta, como meio de pesquisa da molhagem 2 (dois) pontos falhos:

1.º) Quando ao em vez de água pura, o fraudador adicionar água salgada.

Nesse caso, veremos que somente pelo excesso de Na Cl dosado pode-se concluir pela fraude.

2.º) Muito mais grave do que o 1.º caso é a adição de soro do próprio leite.

Neste, a molhagem, isto é, o aumento do volume do leite ao em vez de apresentar meios para a pesquisa, servindo-se da concentração molecular, vem complicar ainda mais, pois quanto mais soro, maior a concentração. Somente com uma amostra de comparação poder-se-ia concluir pela fraude.

Por esses inconvenientes e outros de ordens técnicas e administrativas, na fiscalização, com relação às constantes citadas, técnicos na indústria do leite, não podendo achar uma constante entre os elementos químicos, só encontraram, considerando ainda a

concentração molecular, e em uma propriedade física desta, a mais simples, mais rápida, e sem dúvida, mais certa, que se faz por meio do abaixamento do ponto de congelação que é a crioscopia.

REFERÊNCIAS SOBRE NITRATOS

Normalmente o leite não contém nitratos, assim dizem os autores; Orla Jensem, Henseval, Mullié, Marcas, Huyghe, etc.

Entretanto, alguns destes mostraram que uma dose forte de nitratos administrada durante a lactação, podia fazer passar no leite uma dose nitidamente apreciável à análise. Fuchs, em 1881, afirmou que a presença de nitratos no leite era devida à adição de água.

Ufferman utilizou em 1883 a difenilamina e ácido sulfúrico para demonstração de nitratos no soro. Soxhlet precipitava a caseína pelo cloreto de cálcio e por meio da solução sulfúrica de difenilamina, procurava a presença de oxidantes e apesar de saber que a água oxigenada dava coloração azul pela difenilamina, achou que os únicos oxidantes que se podiam encontrar no leite, eram os nitratos. Fleishmann assinala que essa reação só dá resultado nas regiões em que as águas contêm nitratos e que em nenhum caso isto é absolutamente garantido. O leite em suas manipulações no estábulo facilmente pode tomar pequenas quantidades das substâncias consideradas, produzidas por decomposição do esterco no estábulo.

Na nossa opinião, quanto à reação positiva de nitratos no leite, achamos que, pelo fato dela ter sido positivada na grande maioria dos leites francamente molhados, esta reação não é sinão ocasionada por nitratos e não por outro oxidante.

Se ela é rarissimamente, levemente positiva em leites considerados normais pelo nosso padrão, não nos afastamos ainda da mesma hipótese, pois sabemos até onde o nosso padrão permite a molhagem.

Constatamos mais que, em leites cuja origem era insuspeita, esta reação não foi positivada. E' preciso não esquecer que nem toda água contém nitratos, portanto um leite pode ser molhado, sem que a reação seja positiva.

COMO SE PODE FRAUDAR UM LEITE

Partindo de um produto o melhor possível, pode um fraudador, desde que conte com os recursos de laboratório, adicionar água a um leite cuja pesquisa poderá trazer dúvidas quanto à conclusão.

A começar pela densidade já vimos que fica diminuída de uma unidade, com a adição de 3,3% de água.

Sábe-se portanto, até onde é possível baixa-la.

A desnatação simultânea um pouco acima do padrão, traz melhores vantagens:

1.º) Compensar a densidade perdida pela diluição.

2.º) O aproveitamento do excedente em gordura para o fabrico de manteiga, se se tratar de um fabricante desse produto.

Na acidez, como já verificamos, a adição de 5% de água abaixa de 1.º a 2.º Dornic. Não será difícil deixá-la no mínimo admitido.

A refração do soro, se diminui de 2 a 3º cada 10%, também está nas possibilidades de cálculo.

A crioscopia, sabemos que 1,8% oscila de 0,01º de temperatura aproximando-se de 0º.

Esta determinação é a mais difícil de ser reajustada, devido à dissociação iônica, alcalinidade da água adicionada, etc.. Se ela não se encaixar no limite desejado, então o técnico terá que recorrer à adição de substâncias solúveis e bastante dissociáveis.

Quando ao em vez de água, o fraudador aumentar o volume do leite com soro, não terá ele necessidade de compensar a perda dessas características físicas, pois elas até se elevarão com o natural aumento da concentração molecular.

Neste caso, o industrial não só aproveita o soro, como os outros elementos como sejam: gordura para manteiga, e caseína para matérias plásticas.

Uma verificação prévia dos índices referidos pelo padrão após a fraude é aconselhável pois os cálculos de molhagem são aproximados.

Apresentamos abaixo um quadro de molhagem que efetuamos em 22 amostras de leites de fiscalização, "tidos" como normais, aos quais adicionamos 5 e 10% de água. Essas diluições provocaram abaixamento da densidade, acidez, crioscopia e refração do soro. Esses abaixamentos, com exceção da crioscopia, se colocaram em níveis ainda muito acima dos mínimos admitidos pelo padrão.

QUADRO DE MOLHAGEM

N.º de Amostra	Dens. primitiva	Diluição a 5 %	Diluição a 10 %	Acidez primitiva	Diluição a 5 %	Diluição a 10 %	F. deseng. primit.	Cresc. primit.	a 5 %	a 10 %	Refração Cl ² Ca			Refração A. acetico		
											primitiva	a 5 %	a 10 %	primitiva	a 5 %	a 10 %
1	327	315	296	17,5	16,5	15,5	9,18	-0,56	-0,51	-0,47	38,6	37,5	36,2	42,3	41,1	39,7
2	335	—	—	18	16,5	15,5	9,39	-0,54	-0,51	-0,48	38,4	37,1	35,8	40,5	39,2	38
3	333	315	295	19	17,5	16	9,36	—	—	—	38,7	37,5	36,2	42,5	—	39,7
4	340	—	—	18,5	17,5	16	9,39	-0,55	-0,52	-0,49	39,3	38,1	36,8	42,8	41,5	40,4
5	332	—	—	17,5	16	15	9,32	-0,55	-0,52	-0,49	39,1	37,1	36,6	42	40	39,3
6	335	325	314	17	16	15	9,34	-0,54	-0,49	-0,46	38,8	38	36,1	43	41,7	40
7	330	315	396	17	16,5	15,5	9,22	-0,54	-0,50	-0,47	38,4	37,2	36	41,7	40,3	39,2
8	330	318	299	17	16	15	9,28	-0,54	-0,49	-0,47	38	36,8	36	40,5	39,3	37,8
9	334	321	305	18,5	17,5	16,5	9,35	-0,54	-0,51	-0,48	38,8	37,2	36,2	40,9	39,5	38,3
10	331	317	301	18,5	17,5	16,5	9,33	-0,54	-0,51	-0,49	39,1	37,7	36,4	41,3	39,7	38,6
11	336	324	313	17,5	16,5	15,5	9,33	-0,54	-0,52	-0,49	39,6	38,5	37,1	42,8	41,4	39,9
12	331	318	296	17,5	16,5	15,5	9,38	-0,54	-0,51	-0,48	38,1	37,2	35,7	41,8	39,7	38,5
13	335	322	301	18,5	17,5	16,5	9,38	-0,55	-0,51	-0,48	39	37,8	36,5	42,4	40,1	39,7
14	339	327	306	17,5	16,5	15,5	9,47	-0,55	-0,51	-0,49	39	37,7	36,4	41,6	40,3	39,3
15	340	325	311	18	17	16	9,46	-0,55	-0,51	-0,49	39,5	38	36,9	42,6	41,3	40
16	336	323	310	18	17	16	9,39	-0,55	-0,53	-0,49	39,2	38,1	37	42,9	41,2	40
17	335	320	309	17,5	16,5	15,5	9,38	-0,54	-0,51	-0,48	38,5	37,5	36,7	42,3	41	39,4
18	334	—	—	18	16,5	15,5	9,32	-0,54	-0,52	-0,50	39,5	38,3	37	43	41,8	39,6
19	330	315	294	18	17	16	9,33	-0,56	-0,53	-0,51	39,3	38	37	43,5	42	40,5
20	331	317	301	18	17	16	9,26	-0,55	-0,53	-0,50	38,5	37,3	36,5	42,7	41,2	39,7
21	335	320	304	18	17	16	9,36	-0,54	-0,51	-0,48	39	38	36,5	41	40	38,8
22	332	314	303	17	16	15	9,33	-0,56	-0,51	-0,49	38,9	37,6	36,6	42,8	41	40
Med.	332	319	303	17,8	16,7	15,5	9,33	-0,54	-0,51	-0,48	38,8	37,6	36,4	42,1	40,6	39,3
%	—	—	—	—	100	45,4	—	—	0%	0%	—	100	54,5	—	100	77,2

Vê-se pois, que, a molhagem é francamente possível dentro dele.

Quanto ao fato da crioscopia, acusar molhagem em 100% de suas determinações, explica-se por se ter partido de leites com um máximo de crioscopia de -0,56, mas no caso de se partir de um ponto crioscópico mais baixo, isto é, mais afastado de 0°, como foi encontrado em grande número de amostras de leites fornecidos à este Instituto para estudos, mesmo este índice deixaria de acusar.

A 10% de molhagem, verificamos quanto à densidade, que ela se poz em nível encontrado comumente em grande quantidade de leites que são aceitos como normais. A acidez a 5% de diluição, 100% das amostras não acusaram molhagem e a 10%, também 45,4% não acusaram.

As determinações de refração do soro-cálcico na primeira diluição, 100% não denunciaram a presença de água e a 10% ainda 54,5% procederam da mesma maneira.

Comparando-se a título de experiência o soro cloro-cálcico com o acético, verificamos que este, na primeira diluição, do mesmo modo que aquele, 100% das determinações não acusaram, enquanto que a 10%, 77,2%, muito mais do que o soro cloro-cálcico, deixaram de indicar a adição de água, considerando 39° Zeiss como mínimo de acordo com os autores.

CRÍTICA AO PADRÃO

Alem das dificuldades próprias que o leite oferece para conclusões quanto à sua integridade, o nosso padrão, numa desarticulação incrível, acresce outras derivadas da benevolência e exagero em algumas de suas características. Exemplifiquemos: os teores de gordura, o extrato seco desengordurado e em particular, a tolerância exagerada, quanto ao grau de refração do soro cloro-cálcico e o incomparável desacordo entre o mínimo de refração e a correspondência da densidade do mesmo soro.

Aqueles dois teores, gordura e extrato seco desengordurado, quando acusam molhagem, é porque ela já foi quasi diluviana.

E' por essa razão que não fizemos referências a esses dois índices nestas observações e apenas achamos que na reforma do nosso padrão, elas sejam impiedosamente elevados para que fiquem no mesmo nível dos outros modificados como veremos a seguir.

Observações escrupulosas feitas por nós, neste Instituto, vieram confirmar felizmente o que Ackermann nos mostra no quadro de correspondência entre a refração e densidade do mesmo soro.

Vê-se perfeitamente, nele, que o grau de refração correspondente ao mínimo de densidade do nosso padrão, 1,0260, é 39° Zeiss, quando o mesmo exige para mínimo, 36,5° cuja correspondência de densidade na tabela é 1,0235, densidade essa que como se verá na coluna seguinte, acusa molhagem de 11%.

Com relação à referência ao mínimo de refração do soro cloro-cálcico, servimo-nos ainda das observações feitas pelo Dr. Marcos Miglievich, químico chefe do Serviço de Fiscalização do Leite e Laticínios, do Departamento Nacional de Saude Pública, no qual faz notar que, partindo-se de uma refração de 39° Zeiss para um leite integral, as molhagens de 5, 10, 15 e 20%, abaixam a refração para 37,7° — 36,7 — 35,7° e 34,8°, o que está de acordo com as afirmativas de Ackermann e conosco em nosso quadro de molhagem.

Partindo de 38,8°, fomos a 36,4° com 10%, e iríamos a mais se tivéssemos partido de 39° como observou Dr. Marcos Miglievich.

Diante desta chocante contradição entre os dois mínimos referidos no padrão atual, concluímos que os mesmos não representam a realidade como característicos do leite.

Observações feitas por nós neste laboratório, com leites individuais, gentilmente fornecidos pelos Drs. Reveillon, chefe da X.^a Exposição de Animais, e Amancio Esquibel, diretor da divisão de leite, do Departamento de Industria Animal, leites de integridade insuspeita, verificamos que em diversos, a densidade do soro cloro-cálcio era de 1,0250 e raros acima de 1,0260. Dois deles atingiram 1,0280.

Se encontramos em leites desta natureza o mínimo de densidade igual a 1,0250, cujo correspondente em refração é 38° e que dá para esta densidade o limite entre a molhagem e o leite fraco, concluímos ser inaceitável 1,0260 para o mínimo, o que corresponde em refração a 39° o que é exagerado.

Coerentemente com o que temos observado, a refração do soro abaixo de 38° dá margem à molhagem. E' justo e lógico que este seja o mínimo admitido, e não absurdamente 36,5°.

Quanto ao mínimo de crioscopia referido pelo nosso padrão -0,54 achamos que apesar deste índice ter se revelado o mais eficiente na pesquisa da molhagem, ainda pode ser benevolente, se levarmos em conta o seguinte:

Nas amostras de leites individuais e de pequenas misturas que nos têm sido enviadas antes de sua entrega aos industriais, constatamos uma média de $-0,59^{\circ}$.

Ora, sabendo-se por cálculo, quanto de água este mínimo pode admitir com relação à esta média, aconselhamos que ele seja elevado para $-0,55$.

CONCLUSÃO

Dar parecer sobre a qualidade de um leite é uma tarefa difícil e complexa, segundo se trata de um leite padronizado ou somente considerado como alimento.

No caso deste, que é o mais interessante, mais estudado é também o que apresenta maior complicação.

Para se fazer juízo merecido sobre seu valor é preciso observações, estudos seguindo os indivíduos, as raças, os tratos, as estações, as lactações, etc.

Quanto aos padrões, não traduzem eles em grande maioria, a real integridade dos leites. O produto sendo variável em suas diversas modalidades como já vimos, o certo seria fazer com que o padrão representasse o seu verdadeiro valor.

Entretanto, não é isso que se verifica em grande parte das regiões dos países onde se padroniza o leite.

Concluir sobre a qualidade de um produto padronizado é muito fácil mas fazer-lhe justiça é difícil.

Em todas as partes do mundo o leite forma problemas. Entre nós eles são grandes, mas não insolúveis. Sugestões sobre sugestões podem ser apresentadas para sua solução. A mais acertada de todas seria, depois de meticolosos estudos como já referimos, organizar um padrão de acordo com o verdadeiro valor do nosso leite. Outra sugestão é a seguinte: Se de fato o leite coletivo não apresenta qualidades iguais ou pouco afastadas das do leite individual, como afirmam os industriais, seria oportuno classificar o leite em tipos correspondentes à sua integridade, isto é, dar a ele três padrões: um máximo, um médio e um mínimo, com seus respectivos valores comerciais evitando assim que, como atualmente acontece, um leite considerado bom, seja nivelado ao de um leite fraco (e porque não dizer molhado?).

E' permitir a molhagem limitada, mas é também reduzi-la pelo pouco lucro que pode oferecer.

TABELA DE ACKERMANN

Refracção em Zeiss a 17,5°C	Densidade a 15°C	Refracção em Zeiss 17,5°C	Densidade a 15°C	Água %	Refracção em Zeiss a 17,5°C	Densidade a 15°C	Água %	Refracção em Zeiss a 17,5°C	Densidade a 15°C	Água %
42,0	1,0290	39,2	1,0262	—	36,4	1,0234	—	33,6	1,0206	28
41,9	289	1	261	—	3	233	12	5	205	—
8	288	39,0	260	—	2	332	—	4	204	29
7	287	38,9	259	—	1	231	13	3	203	30
6	286	8	258	—	36,0	230	—	2	202	31
5	285	7	257	—	35,9	229	14	1	201	—
4	284	6	256	—	8	228	—	33,0	200	32
3	283	5	255	—	7	227	15	32,9	199	33
2	282	4	254	—	6	226	—	8	198	—
1	281	3	253	—	5	225	16	7	197	34
41,0	280	2	252	—	4	224	—	6	196	35
40,9	279	1	251	—	3	223	17	5	195	36
8	278	38,0	250	—	2	222	—	4	194	37
7	277	37,9	249	4	1	221	18	3	193	—
6	276	8	248	—	35,0	220	19	2	192	38
5	275	7	247	5	34,9	219	—	1	191	—
4	274	6	246	—	8	218	20	32,0	190	39
3	273	5	245	6	7	217	—	31,9	189	40
2	272	4	244	—	6	216	21	8	188	41
1	271	3	243	7	5	215	—	7	187	42
40,0	270	2	242	—	4	214	22	6	186	—
39,9	269	1	241	8	3	213	23	5	185	43
8	268	37,0	240	—	2	212	24	4	184	44
7	267	36,9	239	9	1	211	—	3	183	45
6	266	8	238	—	34,0	210	25	2	182	46
5	265	7	237	10	33,9	209	26	1	181	47
4	264	6	236	—	8	208	—	31,0	180	48
3	263	5	235	11	7	207	27	30,9	179	49
—	—	—	—	—	—	—	—	8	178	50

Se por acaso nenhuma das sugestões apresentadas possa resolver a questão, que se aproveite pois, o que o padrão atual tem de certo e se eleve o que está francamente de mãos dadas com a fraude e se corrija o que se acha desarticulado, para que as proporções da fraude fiquem mais reduzidas.

Se futuramente nos responsabilizarem pela elevação arbitrária do nosso padrão, quando ha leites que podem se apresentar com algumas características do antigo (atual), não nos impressionaremos com isso.

O nosso desencargo de consciência se firmará em que, se não fizemos a devida justiça a esta minoria de leites considerados fracos, pelo menos evitamos que a grande maioria de leites mais que integrais fossem reduzidos a fracos pela molhagem.

Um grande médico paulista, Dr. Luiz Pereira Barreto, já disse-ra que “a nossa defeza nacional dependia do valor nutritivo do nosso leite”.

Achamos oportuno dizer que já é hora de melhorar o nosso produto.

INTERFERÊNCIA DA VITAMINA D NA REAÇÃO DE CARR-PRICE (*)

RENATO F. RIBEIRO

Químico chefe do Instituto Adolfo Lutz

C. FONSECA

Química do Instituto Adolfo Lutz

Sabe-se que para dosagem de vitaminas os processos biológicos são os de maior exatidão, fornecendo resultados realmente seguros. Entretanto, dado o custo e a morosidade dos ensaios biológicos, recorre-se às provas químicas, cujos resultados menos exatos são na maioria dos casos bastante satisfatórios.

Para a vitamina A a reação de Carr-Price tem prestado relevantes serviços, pois que a prática tem demonstrado a equivalência entre a intensidade da coloração azul decorrente desta reação com produtos contendo vitamina A, e sua atividade biológica. Pode-se mesmo afirmar que é possível pela reação de Carr-Price determinar com precisão o número de U. I. correspondente à atividade biológica de uma solução de vitamina A ou caroteno.

É frequente nos preparados farmacêuticos a associação de vitaminas, encontrando-se no mercado vários produtos contendo vitaminas A e D.

Assim sendo, é frequente haver necessidade da determinação da vitamina A em presença do fator D; isto nos levou a verificar si a reação de Carr-Price não perderia em sensibilidade no caso da existência dessas vitaminas na mesma solução.

Tomamos amostras de óleo contendo vitamina A e fizemos várias séries de diluições em clorofórmio: 1:10; 1:100; 1:1.000; etc. e às mesmas diluições que serviriam para determinar a vitamina A, juntamos quantidades variáveis de vitamina D.

Verificamos de início:

a) que a intensidade de coloração azul característica é menor nas soluções adicionadas de vitamina D;

(*) Recebido para publicação em 25-5-42.

b) que a mudança de coloração azul para o roxo se processa mais rapidamente nos casos de haver misturada a vitamina *D*.

Para medir o grau de interferência da vitamina *D* na reação de Carr-Price adotamos o seguinte protocolo de experiência:

a) amostras de vitamina *A* diluídas em clorofórmio em proporções conhecidas são pesquisadas com reativo de Carr-Price, adotando-se para a leitura a célula foto-elétrica;

b) às mesmas diluições são acrescentadas quantidades conhecidas de vitamina *D* e repetidas as determinações pelo Carr-Price nas mesmas condições acima.

Os resultados foram sempre concordantes e do tipo abaixo transcrito, que representa uma das muitas experiências realizadas.

PROVAS REALIZADAS COM 2 cc. DE SOLUÇÃO EM CLOROFÓRMIO DE SOLUTO DE VITAMINA *A*, SEM E COM INTERFERÊNCIA DA VITAMINA *D*

Tempo em minutos		0	1	2	3	4	5
T R A N S P A R É N C I A	Vitam. <i>A</i> Dil. 1:10	42	52	56	62	Roxa 65	Roxa 68
	Vitam. <i>A</i> + <i>D</i> A=1:10 D=1:10	54	66	70	Roxa 74	Roxa 76	Roxa 76
	Vitam. <i>A</i> Dil. 1:50	16	18	21	24	Roxa 26	Roxa 29
	Vitam. <i>A</i> + <i>D</i> A=1:50 D=1:5	21	28	Roxa 34	Roxa 36	Roxa 38	Roxa 38
	Vitam. <i>A</i> Dil. 1:50	27	34	41	46	Roxa 50	Roxa 53
	Vitam. <i>A</i> + <i>D</i> A=1:50 D=1:10	36	46	Roxa 50	Roxa 53	Roxa 55	Roxa 56
	Vitam. <i>A</i> Dil. 1:100	60	75	81	86	Roxa 89	Roxa 90
	Vitam. <i>A</i> + <i>D</i> A=1:100 D=1:5	70	Roxa 64	Roxa 64	Roxa 64	Roxa 64	Roxa 64

A observação deste quadro mostra que, quando se trata de uma solução pura de vitamina *A* (*), a leitura da absorção de luz na célula foto-elétrica acusa valores que sobem gradativamente até um máximo de 3 minutos e, a partir de cujo tempo, já aparece tonalidade roxa que daí por diante se vai acentuando. A intensidade e a persistência da coloração roxa são dependentes da concentração da solução de vitamina *A*. Quando presente a vitamina *D* os números indicativos de leitura da absorção na célula foto-elétrica são sistematicamente maiores, o que indica uma menor intensidade de cor, além do que o aparecimento da coloração roxa é mais precoce, às vezes mesmo antes de um minuto (maior diluição da vitamina *A* em presença de maior concentração de vitamina *D*).

Pudemos verificar ainda que a vitamina *K* manifesta também interferência na dosagem química da vitamina *A* e isto será objeto de futura comunicação.

RESUMO

Na dosagem de vitamina *A* pela reação de Carr-Price a presença da vitamina *D* interfere, diminuindo os resultados e a estabilidade da cor azul; tanto maior seja a proporção relativa da vitamina *D* para a *A*, maior se manifesta o efeito perturbador.

SUMMARY

In the dosing of Vitamin *A* by the Carr-Price reaction the presence of Vitamin *D* interferes, diminishing the results and the stability of the blue color; the greater the proportion of Vitamin *D* in relation to *A*, the greater the perturbing effect.

(*) Para estas experiências empregamos como solução de vitamina *A* ampolas várias de "Vitamina Dutra A+ caroteno" e para vitamina *D* usamos "Vigantol".

BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS OU REFRIGERANTES

RUTH DE LIMA CORRÊA

Química do Instituto Adolfo Lutz

Sob o nome de bebidas não alcoólicas e refrigerantes consideramos gasosas, soda, limonadas, guaraná e semelhantes, isto é, bebidas não alcoólicas, artificiais, ou naturais, não fermentadas e distribuídas em recipientes fechados, de vidro. Por esse enunciado percebe-se que podem ser bebidas de diferentes qualidades e composições, mas que apresentam sistematicamente entre si pontos de contacto; assim é que essencialmente possuem uma certa quantidade de CO_2 , apresentam uma acidez maior ou menor e contêm quantidades variáveis de açúcares, sejam mono ou dissacarídeos, essências, etc..

Nas análises bromotológicas procedidas sobre tal tipo de bebidas, temos observado que muito frequentemente os resultados obtidos discordam grandemente daqueles que corresponderiam às fórmulas, mais ainda, entre amostras de uma mesma partida. Algumas destas diferenças podem ser explicáveis pelo próprio método de fabricação, que frequentemente é conduzido do seguinte modo: colocam-se em meias garrafas 40 a 60 cm^3 de xarope obtido pela dissolução em água, de açúcar de cana, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fosfórico, essências, corantes, além de outras substâncias.

O frasco de meia garrafa é considerado normalmente como tendo volume de 333 cm^3 e é enchido com água saturada de CO_2 . Isto feito, tais recipientes já fechados devem sofrer um processo de esterilização, que no caso será a pasteurização.

Compreende-se facilmente que tal método rudimentar de fabricação justifica diferenças entre diversas amostras da mesma partida, diferenças estas que dependem, de um lado da precisão com que foi medido o xarope, de outro lado das variações de capacidade de cada recipiente.

Si, como vimos, a grande parte dos constituintes destas bebidas é colocada em cada recipiente, sob forma de pequena quantidade de xarope concentrado (média de 50 cm^3), é lógico que um pequeno erro na medida desta quantidade acarretará sensíveis di-

ferenças na diluição final. Citemos um exemplo: si a mistura final, isto é, a bebida já pronta para ser entregue ao consumo deve dosar o equivalente a 1% de ácidos cítrico-tartárico, em cada recipiente de 333 cm³, estariam compreendidas 3,33 gr. de cada ácido. Estas quantidades de ácidos calculadamente deveriam ser fornecidas suponhamos por 50 cm³ de xarope. Ora, si ao envez deste volume empregar-se em um caso 40 cm³ e em outro 60 cm³, os resultados seriam, respectivamente, 0,8% e 1,2%, para cada um dos ácidos. Vê-se, pois, que as diferenças entre duas amostras da mesma partida atingiriam porcentagens enormes, si o xarope foi muito concentrado. Entretanto, não é este o único fator que deve ser levado em linha de conta; outros, não menos importantes, apresentar-se-ão frequentemente, ora aumentando, ora diminuindo os valores encontrados pela análise:

1 — *Procedência da matéria prima* — São, principalmente, dois tipos diversos de circunstâncias que aquí interferem: em primeiro lugar as diferentes qualidades do mesmo produto, que pode apresentar porcentagens variadas de substâncias consideradas em estado de pureza; e, em segundo lugar, as falsificações que no momento atual vêm assumindo maior importância, dada a impossibilidade de importação regular.

2 — *Fermentações* — Embora, como dissemos de início, estas bebidas não devam ser fermentadas, pela sua própria constituição representam elas um adequado meio de cultura para certos microorganismos de fermentação e, assim, tal processo pode ocorrer, principalmente si houver maior intervalo de tempo entre a preparação de mistura e sua esterilização. Acresce ainda que a contaminação pode ser realizada depois do processo de pasteurização.

3 — *Manipulação defeituosa* — Este item tem sua justificativa baseada não nas deficiências de aparelhagem, senão principalmente na ignorância de alguns produtores.

Os comentários anteriormente feitos a propósito da quantidade de xarope a ser empregada por unidade do produto pronto cabem dentro deste parágrafo. Ajunte-se ainda que uma fase delicada do método de preparação é representada pela esterilização, visto depender do tempo de aquecimento, da sua intensidade, da rapidez do resfriamento, etc., enfim, de um conjunto de causas que, quando não completamente satisfeitas, trariam possibilidades ao desenvolvimento de microorganismos que podem destruir este ou aquele componente da mistura. É claro que quando o microorga-

nismo é de natureza a atacar preferencialmente os ácidos presentes, ocorrerá, fatalmente, uma queda da acidez, enquanto que subirá o teor em ácidos si houver fermentação dos açúcares.

4 — *Potabilidade da água empregada* — A água é o componente quantitativamente mais importante na preparação das bebidas ou refrigerantes. É evidente a necessidade da perfeita potabilidade da água empregada para obtenção de um produto bromatologicamente perfeito. Infelizmente não é isto o que ocorre em uma grande porcentagem de casos; não é raro que a água que se destina a tais tipos de bebidas, principalmente no Interior, seja obtida de poços superficiais abertos em condições precárias de técnica, muitas vezes ao lado de fonte de contaminação.

Daí apresentar-se esta água contaminada por microorganismos ou por substâncias químicas indesejáveis, como sejam nitratos, substâncias orgânicas diversas, compostos de amônia, etc..

Damos abaixo um quadro com os resultados de análises por nós procedidas em várias águas procedentes do Interior do Estado.

Estas águas são todas destinadas à alimentação e, como se vê, devem ser consideradas, sinão impróprias para o consumo, pelo menos suspeitas de poder ocasionar danos mais ou menos graves a quem as ingerir. É sabido que a presença ou ausência de substâncias orgânicas ou minerais, como nitritos, nitratos, etc. na água não quer dizer que esta água esteja contaminada com germes patogênicos. Entretanto, é bem verdade que a presença de tais substâncias na água é um índice de contaminação microbiana que pode, de um momento para outro, construir perigo iminente.

Nestas condições é evidente que é de importância primordial a perfeita potabilidade da água que vai servir de matéria prima na fabricação de bebidas ou refrigerantes.

Vejamos um exemplo:

Há pouco tempo foram requeridas diversas análises prévias de bebidas de várias procedências, tendo-se constatado quantidades apreciáveis de sujidades, nitratos e turvação. Ora, tais impurezas dificilmente poderiam correr por conta de outras matérias primas que não a água. Solicitou, então, o Instituto Adolfo Lutz amostras nas águas empregadas na fabricação dessas bebidas. Tivemos assim a oportunidade de constatar na amostra de água que nos foi remetida a confirmação de nossa suspeita: Tratava-se realmente de água de poço francamente contaminada.

Ora, no preparo das bebidas não alcoólicas, não se empregam matérias primas que contenham nitratos e, nestas condições, a presença de nitratos em tais bebidas somente pode correr por conta da água empregada na fabricação. Assim sendo, é indispensável que nas análises de bebidas não alcoólicas seja efetuada a determinação da quantidade de nitratos. Verificado que a bebidas contem mais de 0,002 gr. de nitratos por 1.000 cm³ (limite aceito para a potabilidade da água), deve o produto ser considerado impróprio para o consumo.

Damos a seguir alguns resultados de análises de águas por nós procedidas (Quadro n.º 1).

QUADRO I

RESULTADOS PARCIAIS DE ANÁLISES POR NÓS PROCEDIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA PROCEDENTES DO INTERIOR DO ESTADO

Procedência da amostra	Oxigênio consumi- do em meio ácido	Cloretos em cloro	Resíduo seco a + de 120°C	Resíduo mi- neral fixo	Perda pela calcinação	Nitrogênio amomiacal	Nitrogênio nitroso	Nitrogênio nitroso
ÁGUAS DE FONTE								
Fonte Saude - Piracicaba..	1,2	10,36	146,4	80,8	65,6	ausência	ausência	10,4
Fonte São Jorge - Socorro	0,4	6,39	109,4	95,4	14,0	ausência	ausência	3,71
Fonte em Sorocaba.....	0,88	3,55	48,0	38,4	9,6	reação positiva	ausência	1,365 ⁵
Fonte em Jacareí.....	0,88	1,13	92,0	76,0	16,0	ausência	ausência	5,2
Fonte Saude - Piracicaba.1	1,20	10,36	146,4	80,8	65,6	ausência	ausência	10,4
Fonte São Jorge - Socorro	0,40	6,39	109,4	54,4	14,0	ausência	ausência	3,71
ÁGUAS DE POÇO								
Ibirá.....	0,88	1,42	56,0	42,0	14,0	ausência	ausência	0,88
Pindorama.....	0,48	12,78	263,2	165,6	97,6	ausência	ausência	26,0
Vila Bertoga.....	1,28	2,27	56,4	40,0	16,4	ausência	ausência	1,99
Itaquera.....	1,92	9,51	46,4	30,0	16,0	ausência	ausência	1,23
São Caetano.....	1,28	40,82	274,4	244,4	30,4	positiva	ausência	33,33
Freguezia do O.....	5,52	1,27	24,8	16,8	8,0	ausência	ausência	vestígios
Indianópolis.....	2,48	19,52	—	—	—	francamente positiva	francamente positiva	26,0
Água Fria.....	4,8	4,40	46,16	41,44	4,7	positiva	positiva	1,19
Vila M. Rosa.....	0,88	7,10	69,6	54,4	15,2	ausência	ausência	5,2
ÁGUAS DE NASCENTE								
Fernão Dias.....	0,72	6,39	27,0	19,2	7,8	ausência	ausência	8,65
Santos.....	0,7	23,4	120,0	89,2	31,6	ausência	ausência	3,25
Campinas.....	0,64	1,84	52,8	44,0	8,0	ausência	ausência	1,99
Pirassununga.....	0,80	1,42	36,0	26,4	9,6	ausência	ausência	traços
Ribeirão Preto.....	0,48	7,10	70,4	46,4	24,0	ausência	ausência	8,65
Faz. Ponte Matão.....	3,28	1,56	20,8	14,4	6,4	ausência	ausência	0,44
Tremembé.....	0,64	2,55	40,8	28,8	12,8	ausência	ausência	0,74
Tremembé.....	0,32	13,06	66,4	44,0	2,14	ausência	ausência	2,21
ÁGUA DE ABASTECI- MENTO								
Monte Azul.....	1,20	5,68	104,0	72,0	32,8	ausência	ausência	13,0
ÁGUA PARA PREPA- RAR BEBIDAS								
Tupan.....	3,60	3,19	24,8	18,0	6,8	ausência	ausência	3,63

As cifras grifadas representam quantidades que ultrapassam os limites admitidos para as águas potáveis.

QUADRO II

PROVA DE RECUPERAÇÃO DOS ACIDOS CITRICO-TARTARICO												
Condições em que foram realizadas as determinações	Solução A ácido citrico		Solução B ácido tartárico		Solução C volumes iguais R+B		Solução D 250 cc. sol. C + 25 grs. de açúcar		Solução E 250 cc. sol. F. + 25 grs. de açúcar		Solução E 250 cc. sol. B + 25 grs. de açúcar	
	Quantidade teórica 0/0	Quantidade encontrada 0/0	Quantidade teórica 0/0	Quantidade encontrada 0/0	Quantidade teórica 0/0	Quantidade encontrada 0/0	Quantidade teórica 0/0	Quantidade encontrada 0/0	Quantidade teórica 0/0	Quantidade encontrada 0/0	Quantidade teórica 0/0	Quantidade encontrada 0/0
Solução não fervida	1,000	1,022	1,000	0,952	1,000	0,994	1,000	0,938	1,000	0,966	1,000	0,889
Solução fervida 1 hora	1,000	1,022	1,000	1,952	1,000	0,994	1,000	0,938	1,000	0,939	1,000	0,889
Solução fervida 4 horas	1,000	1,008	1,000	0,952	1,000	0,994	1,000	0,938	1,000	0,952	1,000	0,882

Feitas estas ligeiras considerações sobre as bebidas não alcoólicas ou refrigerantes, vamos abordar a questão da dosagem dos ácidos cítrico-tartárico, componentes obrigatórios da maioria destas bebidas.

Os métodos por nós empregados para proceder as determinações quantitativas dos ácidos cítrico-tartárico são os oficialmente adotados pelos laboratórios bromatológicos de quasi todo o mundo.

Não havendo processo específico para a separação quantitativa desses dois ácidos, forçoso é o procedimento indireto, preconizado pelo método em apreço que é o seguinte:

Toma-se um volume conhecido de amostra, junta-se fenolftaleína como indicador e titula-se pelo Na OH. Calcula-se a acidez percentual em soluto normal. O número de centímetros cúbicos de soluto normal por cento, multiplicado por 0,07 dá o peso do ácido expresso em ácido cítrico.

Dada a discordância, por vezes verificada, entre os dados encontrados pela análise e os que deveriam ser obtidos de acordo com as fórmulas apresentadas, resolvemos verificar a exatidão desse método, realizando a prova de recuperação em soluções por nós cuidadosamente preparadas.

Como a maneira de preparar essas bebidas varia, segundo o fabricante, e, sabendo-se que há produtores que na fabricação de

tais bebidas costumam juntar o açúcar antes de completar o volume e outros o fazem depois, resolvemos preparar as soluções seguintes:

- 1 — Solução A — 10 gr. de ácido cítrico elevado em 1.000 cm³ de H₂O
- 2 — Solução B — 10 gr. de ácido tartárico elevado em 1.000 cm³ de H₂O
- 3 — Solução C — 250 cm³ de solução A + 250 cm³ de solução B
- 4 — Solução D — 250 cm³ de solução C + 25 gr. de sacarose (volume final 280 cm³)
- 5 — Solução E — 250 cm³ de solução A + 25 gr. de sacarose (volume final 280 cm³)
- 6 — Solução F — 250 cm³ de solução B + 25 gr. de sacarose (volume final 280 cm³).

Ora, é claro que o açúcar aumentando o volume alterará as porcentagens dos constituintes da solução, diminuindo-as. Fácil seria, pela quantidade de açúcar juntado a determinado volume de solução, calcular qual a baixa da concentração, em função do aumento do volume. Entretanto, preferimos realizar determinação experimental.

O quadro n.º 2 * mostra não só que os dados analíticos se aproximam sensivelmente das quantidades teóricas, como também que a junção do açúcar depois de feita a solução diminui a porcentagem dos ácidos cítrico-tartárico, como era de esperar.

Pelos resultados acima, constata-se facilmente que o método por nós empregado, si não é de exatidão absoluta, os resultados que ele nos oferece são bastante aproximados da realidade, considerando a acidez total. Entretanto, isto não impede que os estudiosos procurem outros de maior exatidão, tornando praticável a dosagem desses ácidos em separado. É também oportuno lembrar que esse método pode ser seguido somente quando não houver mistura de outros ácidos, ou, havendo, será necessário dosá-lo em separado, fazendo em seguida a dedução da acidez correspondente.

Uma vez que o açúcar de cana é largamente empregado no fabrico dessas bebidas não alcoólicas e que no preparo das nossas soluções testemunhas usamos também este composto, achamos que

seria interessante acompanhar a hidrólise que ele sofre em presença dos ácidos cítrico-tartárico.

Verificamos que nas soluções recentes e não aquecidas não há, praticamente, transformação dos glicídios não redutores em redutores, mas à medida que a solução envelhece a transformação se dá quantitativamente. À temperatura de ebulição o desdobramento da sacarose é completado no espaço de uma hora.

Verificamos ainda que esta reação de desdobramento não provoca praticamente nenhuma alteração na acidez total, nem nos ácidos dosados volumetricamente pelo atual processo. Convém frisar que essas transformações do açúcar tanto se faz processar pelo aquecimento como pelo tempo, não afetando os teores dos ácidos cítrico-tartárico contidos nos produtos, a menos que haja, como dissemos, uma interferência biológica estranha, como fermentações, etc..

Assim também o gás carbônico empregado está excluído na apreciação da acidez, porquanto é eliminado anteriormente pela agitação ou aquecimento do produto.

CONCLUSÃO

Do exposto é lícito concluir que certa quantidade das bebidas e refrigerantes distribuídas no nosso mercado carece de técnica perfeita de fabricação e não apresenta a constituição química declarada nas fórmulas; essas divergências são devidas a vários fatores, entre os quais se devem salientar então:

- a) o grau de pureza da matéria prima;
- b) as possibilidades de fermentações indesejáveis;
- c) carência de conhecimentos técnicos por parte de fabricantes;
- d) impropriedade bromatológica da água utilizada.

Neste último particular seria de se aconselhar que a amostra da bebida, nos casos de análises prévias, deve ser acompanhada de amostra de água a ser utilizada. A amostra da água deve ser colhida por técnico especializado.

EM TORNO DO TEOR DE NICOTINA NAS FOLHAS DE *NICOTIANA TABACUM* E NOS CIGARROS (*)

RENATO FONSECA RIBEIRO

Químico chefe do Instituto Adolfo Lutz

LÚCIA ACHÉ

Química do Instituto Adolfo Lutz

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR

Químico do Instituto Adolfo Lutz

O tabaco, conhecido entre nós com o nome de fumo, pertence à família das *Solanaceas* e, as inúmeras variedades aqui cultivadas, pertencem todas à espécie "*Nicotiana tabacum*".

Originário das regiões tropicais da América, é hoje cultivado em quasi todas as zonas quentes do globo.

Em nosso paiz, a cultura se faz regularmente em todos os Estados, destacando-se entre eles — Pará, Amazonas, Rio Grande do Norte, Goiás, Baía, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro.

É uma planta herbácea (Fig. 1), sub-arbustiva, de 1 a 2 metros de altura, no máximo; caule reto, cilíndrico, viscoso e aveludado; grandes folhas pubescentes, alternas, verde escuro na parte superior e verde pálido na inferior; flores róseas ou purpurinas, dispostas em panícula terminal; corola gamopétala, campanulada ou em forma funil, com 5 lobos; estames, em número de cinco, encontram-se colocados em volta do pistilo; o fruto é uma cápsula encerrando inúmeras sementes pequeníssimas e escuras (cada gramo contem mais de 15.000 grãos). Todas as partes da planta exalam um cheiro viroso, intenso e característico.

Faremos um estudo mais circunstanciado da folha, não só por ser ela a parte da planta que interessa a indústria na manufatura de charutos, cigarros, fumo em corda, etc., como porque, no exame microscópico, o conhecimento dos seus caracteres botânicos e histologia facilita a identificação da folha verdadeira, permitindo as-

(*) Recebido para publicação em 26-5-42.

sim a determinação da presença de folhas estranhas, por acaso, existentes no produto.

CARACTERES BOTÂNICOS

A folha de fumo mede, geralmente, de 20 a 60 cms. de comprimento por 8 a 35 de largura; é simples, oval ou oblongo-lanceolada,

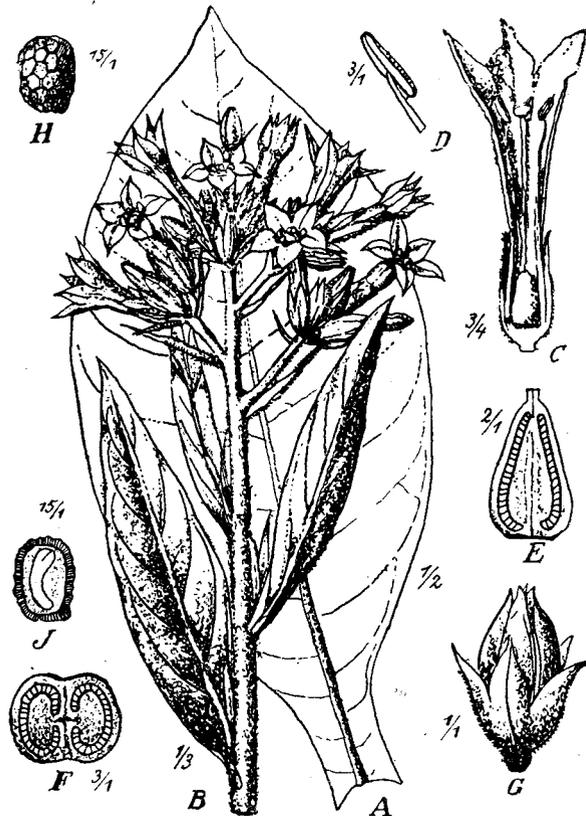


FIG 1 *Nicotiana tabacum*

A) Folha caulinar mediana; B extremo de um ramo; C) Flôr em córte longitudinal; D) estame; E) Ovário em córte longitudinal; F) Ovário em córte transversal; G) fruto; H) semente; J) semente em córte longitudinal.

inteira, sem nenhum recorte no limbo, amplexicaule, hispida, de consistência mole, viscosa e untuosa, quando verde; quando seca é sedosa-aveludada e de cor amarelo clara, com variantes até o

pardo escuro. Sua nervação é peninérvia; a nervura mediana, que parte do pecíolo e atravessa toda a folha, é bastante volumosa, formando uma espécie de fita ou cordão, bem visível nas duas faces da folha; as nervuras secundárias, salientes na face dorsal, anastomosam-se antes de atingirem o bordo da folha, de modo que as suas últimas ramificações formam uma rede de malhas mais ou menos estreitas. A folha possui aspecto, cor e tamanho diferentes, conforme a variedade de que procede, tendo, por este motivo, aplicação vária na indústria, como seja: fabricação de fumo em rolo ou em corda (forte ou fraco), charutos, cigarros, fumo picado, desfiado ou em pó (rapé). A secagem não a faz perder o cheiro acre vivo e sui-generis que possui. As folhas destinadas à manufatura dos produtos já citados, são previamente submetidas à fermentação e a um processo de cura especializado. Entretanto, não sofrem alteração dos seus caracteres exteriores típicos e detalhes anatômicos, mesmo depois de passarem por todas as fases de elaboração industrial.

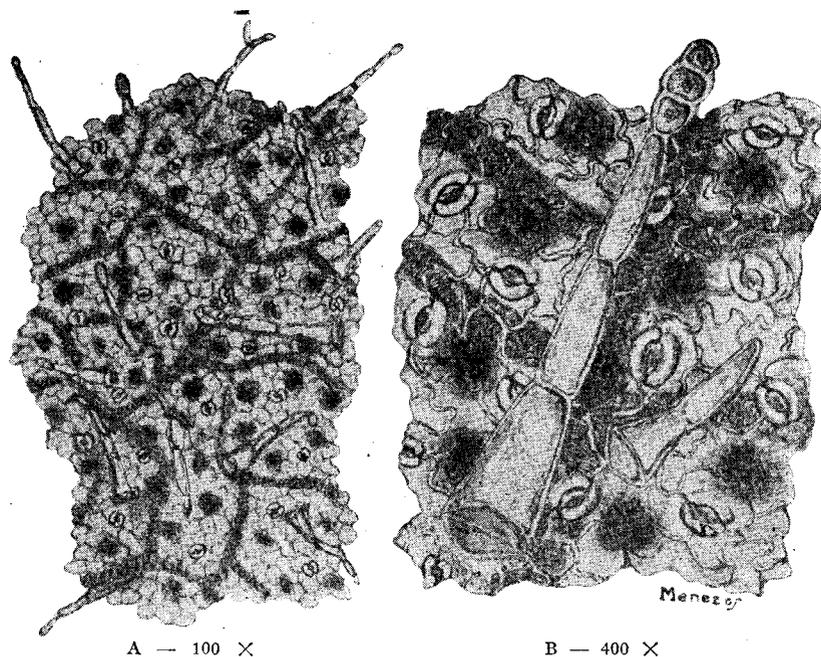
Por este motivo o exame microscópico do fumo é facilitado grandemente, necessitando poucas vezes de se recorrer a cortes, visto que o exame de superfície de ambas as faces da folha descorada satisfaz plenamente, na maioria dos casos.

Ensáio preliminar — Em um tubo de ensáio 20x20, com água, junta-se um pedaço de folha de tabaco de 1 cm.², aproximadamente; aquece-se até a ebulição; retira-se do fogo e deixa-se esfriar. Decanta-se e adicionam-se em seguida 10 cc. de soluto de hipoclorito de sódio. Aquece-se repetidas vezes, sem atingir a fervura, pelo espaço de uma hora, ou mais, quando necessário. Decanta-se, lava-se muito bem, retira-se o pedaço da folha, corta-se ao meio, tendo-se o cuidado de colocar uma das metades voltada para cima e outra para baixo, sobre uma lâmina, coberta por uma lamínula. Quando se tratar de fumo desfiado ou picado, pesa-se 1 gr. da amostra, aproximadamente, decora-se por esse mesmo processo, recolhendo-se por fim as partículas mais finas e mais claras, das folhas e nervuras, que serão examinadas ao microscópio com pequeno e grande aumentos, em preparação a fresco.

A Fig. 2 mostra uma folha de fumo, descorada, vista pela sua face inferior ou dorsal e que, observada com dois aumentos diferentes, revela as seguintes particularidades essenciais:

A) *Pequeno aumento* — Epiderme constituída por uma camada de células de paredes notadamente arqueadas; vasos das ner-

vuras e ramificações; pelos glandulares e articulados, simples e ramificados; estômatos e número consideravel de pontos enegrecidos correspondentes às células cristalíferas de oxalato de cálcio — um dos elementos mais característicos da folha.



A — 100 X

B — 400 X

FIG. 2

Fôlha descorada. — (superfície inferior).

B) *Grande aumento* — Pelos diversos; nervuras bem salientes; inúmeros estômatos com células anexas e manchas escuras, mais ou menos esféricas das células repletas de cristais diminutos de oxalato de cálcio. Pela parte superior a folha deixa ver os mesmos caracteres já descritos, notando-se, porém, menor quantidade de estômatos; nervuras menos salientes e o tecido da epiderme com paredes de células mais ou menos retas, formando uma espécie de rede.

ESTRUTURA MICROSCÓPICA

Folha — O corte transversal da folha (Fig. 3) deixa ver, de cima para baixo, os seguintes elementos: epiderme superior, apresentando células sinuoso-ondeadas, entre as quais estão implantados pelos de variados tipos e alguns estômatos; uma única assentada de células paliçádicas, pouco alongadas; o parênquima espon-

joso, constituído por células de malhas bastante largas, onde se encontram numerosas células ricas em tenuíssima areia cristalina de oxalato de cálcio e, uma outra fila de células sinuoso-ondeadas da epiderme inferior, apresentando pelos idênticos aos da face ventral e número mais elevado de estômatos. Com exceção das células da epiderme, todas as outras do mesófilo contêm clorofila.

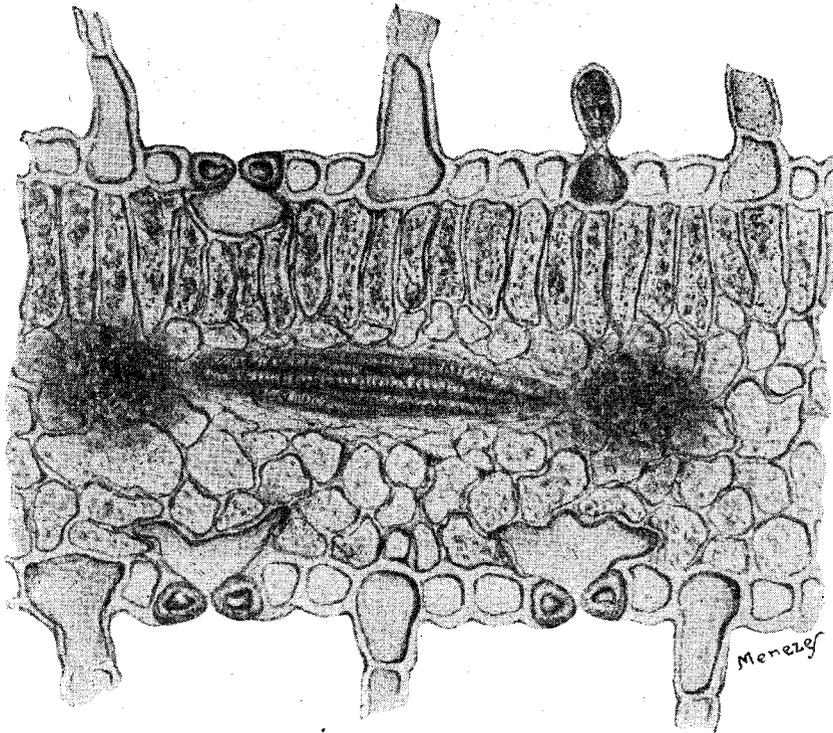


FIG. 3

Folha de fumo — corte transversal — (360 x).

Nervura — Seccionando transversalmente uma nervura secundária (Fig. 4), notam-se, na periferia, células sinuoso-ondeadas da epiderme, muito semelhantes às da folha; contornando a epiderme, uma fila de células contendo clorofila constitue como que um prolongamento dos tecidos do mesofilo; o colênquima, ocupando quasi que a totalidade da nervura, apresenta pontos escuros característicos das células oxalíferas e, na parte central, ainda rodeados por uma zona de colênquima, acham-se dispostos, radialmente, dutos do acessório vascular. A nervura mediana da folha de fumo, vulgarmente chamada "talo", é encontrada comumente

nos cigarros de qualidade inferior, tem a mesma estrutura da nervura secundária, diferenciando somente no contorno que procura imitar perfeitamente as letras *u* ou *o*.

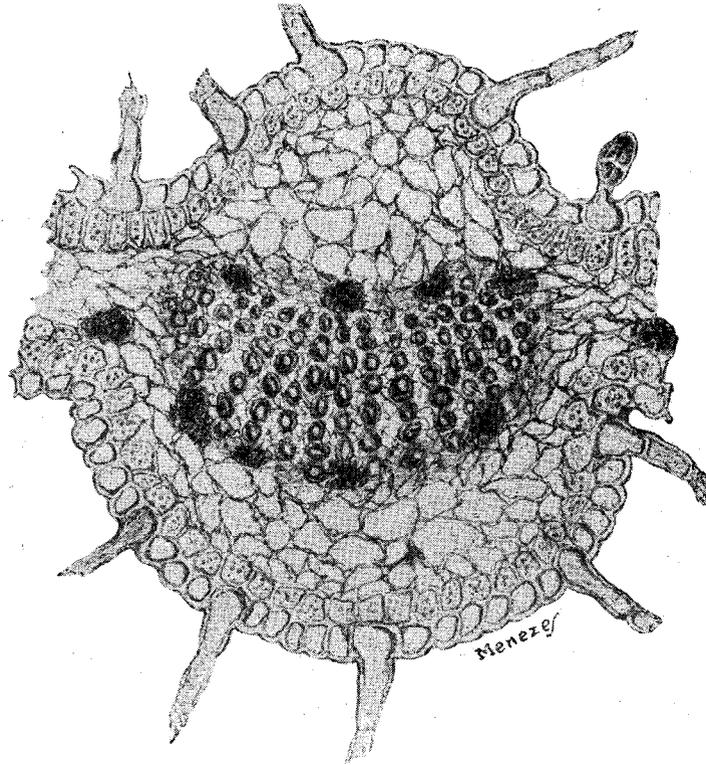


FIG. 4

Nervura mediana — Corte transversal — (180 x).

O fumo em pó ou rapé, pode perfeitamente ser reconhecido ao microscópio, pela presença dos diversos tipos de pelos — ou seus fragmentos — e ainda pelas células cristalíferas que se encontram em todas as espécies de "*Nicotiana*".

Os pelos, que envolvem toda a folha, são de múltiplas e variadas formas (Fig. 5): pelos glandulares de pedicelo curto, simples e com cabecinha secretora, de uma ou mais células e ainda pelos simples e articulados, de 2 a 8 células, afilados ou em ponta ligeiramente arredondada e raras vezes ramificados, apresentando no ápice um prolongamento ou bifurcação. O bulbo é, na sua maioria, bastante dilatado em forma de tonel e de dedal.

A presença de folhas estranhas, pétalas diversas, raízes em pó, etc., seriam facilmente notadas, quando adicionadas ao fumo, como é comum em muitos paizes, afim de lhes dar melhor sabor e aroma. Casos há em que a folha estranha é incorporada com intuito fraudulento como sóe acontecer com a da batatinha (*Solanum tuberosum*).

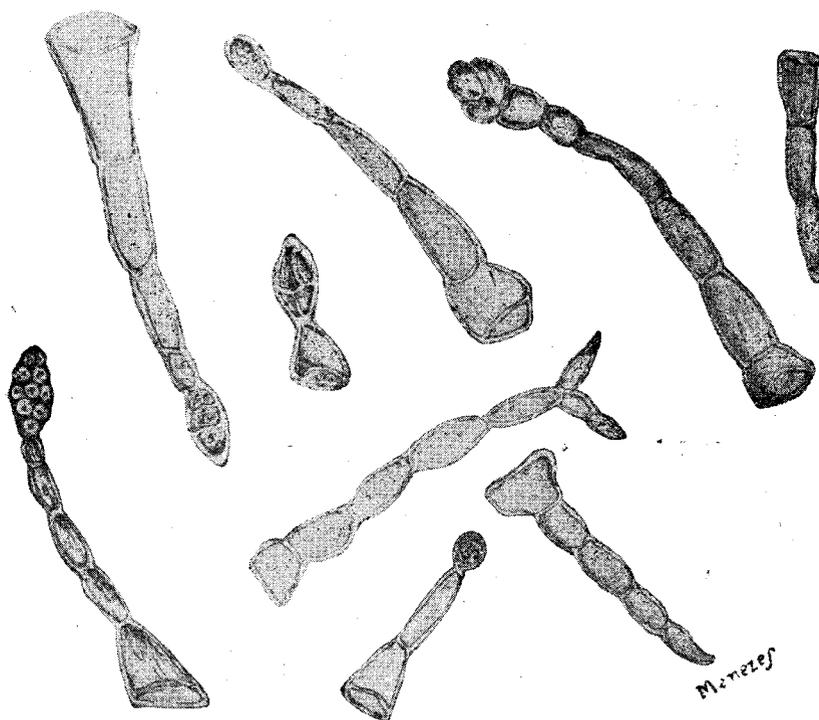


FIG. 5

Tabaco — "*Nicotina tabacum*" — Pêlos — (diversos tipos) — 300 x

Sendo típicos os caracteres anatômicos e histológicos da folha da *Nicotiana tabacum*, o seu reconhecimento pelo microscópio não oferece dificuldades.

O exame microscópico procedido em 20 amostras de cigarros de marcas e qualidades diferentes revelou a presença exclusiva de elementos histológicos da folha do tabaco (*Nicotiana tabacum*).

PARTE EXPERIMENTAL

Iniciamos o nosso trabalho, realizando a dosagem de nicotina em folhas de fumo de procedências diferentes, com o intuito de termos um ponto de referência para ajuizar das quantidades de alcalóide contidas no cigarro. Os resultados foram os seguintes:

DOSAGEM DE NICOTINA EM FOLHAS DE FUMO

<i>Amostra N.º</i>	<i>Nicotina Gr.% sobre substância seca</i>
1	0,550
2	0,972
3	1,198
4	1,134
5	0,713
6	1,490
7	1,450
8	1,260

O método empregado para as nossas dosagens da nicotina para as folhas de fumo e nas que se seguiram foi o de Kissling¹. (*)

Damos a seguir os resultados em nicotina por 100 grs. de produto seco, classificando as amostras por ordem crescente dos preços.

a) *Cigarros de \$400:*

DOSAGEM DE NICOTINA EM CIGARROS

<i>Amostra N.º</i>	<i>Nicotina Gr.%</i>	<i>Substância seca Gr.%</i>
9	1,684	91,99
10	1,198	91,00
11	1,458	92,71

b) *Cigarros de \$600:*

12	1,430	92,82
13	0,972	91,59
14	1,450	92,26
15	1,587	92,74

(1) KONIG, 3 vol., pg. 308.

(*) Adotamos de preferência o método citado em lugar do modernamente preconizado pelo Standard and Tentative Methods of Analysis, A. A. C., pg. 141, Ed. 1940.

<i>Amostra N.º</i>	<i>Nicotina Gr.%</i>	<i>Substância seca Gr.%</i>
16	1,522	91,91
17	1,618	92,53
18	1,254	92,47
19	1,263	91,20
20	1,587	90,75
21	1,522	90,46
22	1,134	90,32
23	1,522	90,20
24	0,972	92,21
25	1,004	91,05

c) *Cigarros de \$700:*

26	1,296	91,58
27	1,620	92,27

d) *Cigarros de \$900:*

28	1,134	90,75
29	1,522	91,55
30	1,760	91,90
31	1,198	90,65
32	1,234	89,36
33	1,166	90,37
34	1,296	90,68
35	1,458	90,64
36	1,380	90,45
37	1,522	91,64
38	1,425	90,45
39	1,522	90,33
40	1,296	90,68
41	0,956	90,47
42	0,972	90,41
43	0,907	90,60
44	1,620	90,66
45	1,126	90,65

e) *Cigarros de 1\$200:*

46	1,166	91,13
47	1,198	91,08
48	0,810	89,83
49	0,745	90,38

<i>Amostra N.º</i>	<i>Nicotina Gr.%</i>	<i>Substância seca Gr.%</i>
50	0,907	90,62
51	1,620	92,26
52	1,380	90,91
53	1,069	90,97
54	1,380	90,85
55	1,231	89,15
56	1,296	90,71
f) <i>Cigarros de 2\$500:</i>		
57	1,380	90,82
58	1,263	90,73
59	1,134	89,30
60	1,263	89,13
61	1,231	89,31
g) <i>Cigarros de 3\$500:</i>		
62	1,198	89,50
63	1,101	89,15
64	1,198	90,37
65	0,972	89,48
66	1,587	89,49
h) <i>Cigarros de 4\$000:</i>		
67	0,810	89,30

Desvio padrão referente ao coeficiente de correlação = 0,12

Coeficiente de correlação — r — = 0,27

CONCLUSÃO

Pela análise estatística dos dados acima vê-se que há uma ligeira tendência à diminuição do teor de nicotina à medida que aumenta o preço dos cigarros, tendência esta evidentemente muito pequena.

CONCLUSION

By the statistical analysis of the above data there is observed a slight tendency to the diminution of the amount in nicotine as the cigarette's price increases, this tendency being evidently very small.

DA CONVENIÊNCIA DE UMA LEGISLAÇÃO SOBRE FISCALIZAÇÃO DO TABACO E DE SUA INCLUSÃO NO CÓDIGO SANITÁRIO

R. FONSECA RIBEIRO

Químico Chefe do Instituto Adolfo Lutz

L. ACHÉ

Química do Instituto Adolfo Lutz

J. B. FERRAZ DE MENEZES JR.

Químico do Instituto Adolfo Lutz

Os resultados sobre o teor em nicotina contida em 67 amostras de tabaco manipulado e amostras de folhas de fumo (esta revista pg. 423) mostram que, mesmo em produtos que asseguram ausência de nicotina, este alcalóide se mostra presente, às vezes em quantidades bastante grandes. Até o momento nenhuma tentativa de legislação foi realizada entre nós, ao que sabemos. Compreende-se sua necessidade, principalmente pelo fato do consumo extraordinariamente grande do tabaco, atualmente representado, na grande maioria dos casos pelos cigarros, charutos e fumos para cachimbo. Podem-se considerar vários prismas em que a fiscalização do tabaco tem a sua justificativa:

1.º — Fraude consistindo na inclusão de folhas outras que não a do próprio tabaco. Do conjunto de observações já realizadas não verificamos nenhum caso de fraude deste tipo, o que não exclue a sua possibilidade e, portanto, esta prática não pode ser negligenciada.

2.º — Quantidades de nicotina diferentes das apregoadas pelos produtores. No trabalho citado vê-se claramente que não são raras as marcas de cigarros que, embora com a asserção de “isento de nicotina”, mostram um teor deste alcalóide tão elevado ou mais do que outros que não são acompanhados dessa afirmativa.

3.º — Existência de conservadores capazes de mostrar toxicidade para o consumidor. A perfeita conservação do tabaco é normalmente feita à custa de agentes químicos determinados, tais como

o ácido sulfuroso, ácido fórmico, ácido benzóico, benzoato de sódio, etc.. Si, de um lado se faz necessária essa conservação, por outro lado deve-se evitar que um excesso de tais conservadores venha constituir um perigo para a saúde do consumidor.

4.º — Existência de substâncias variáveis artificialmente juntados com fins especiais, como os de melhorar o aroma, impedir o ressecamento, etc.. Neste item deve ser referido, principalmente, o emprego da glicerina como agente higroscópico, capaz de impedir o ressecamento do tabaco. Experiências realizadas entre nós (D. Fonseca Ribeiro — Archivos de Higiene e Saude Pública, Junho de 1937, ano II, n.º 3 — S. Paulo) mostram que tal prática é absolutamente condenável, pois que, sendo a glicerina por si mesma inofensiva, o mesmo não acontece com os produtos de sua combustão (formação de aldeído acrílico, grandemente tóxico e irritante).

Tais considerações justificam uma tentativa de legislação que permita fiscalizar o tabaco natural e manufaturado e, por questões de facilidade na execução, deverá tal legislação ser incluída na legislação bromatológica.

Sugerimos, a propósito, o seguinte ante-projeto:

ART. 1.º — Sob a denominação de tabaco ou fumo só se poderão expor à venda as folhas da *Nicotiana tabacum*.

ART. 2.º — O tabaco, os charutos e os cigarros devem ser isentos de chumbo, zinco e arsênico.

ART. 3.º — As folhas de metal destinadas a envolver diretamente o tabaco, charutos e cigarros não devem conter mais de 1% de chumbo e devem ser isentas de arsênico e antimônio.

ART. 4.º — É permitido juntar ao tabaco para sua conservação conservadores, desde que as suas porcentagens não ultrapassem os limites seguintes: ácido sulfuroso 0,05 g.%; ácido benzóico 0,08 g.%; benzoato de sódio 0,1 g.%; ácido fórmico 0,15 g.%. Para fumos de cachimbo é permitido juntar 0,1 g.% de ácido bórico.

ART. 5.º — Fica interdito o emprego de glicerina no preparo do tabaco, embora seja facultado o uso do dietilenoglicol como agente higroscópico.

ART. 6.º — Os fumos, cigarros, e charutos expostos ao consumo como “pobres em nicotina” ou expressão semelhante não devem conter mais de 0,6% de nicotina.

ART. 7.º — Os fumos, cigarros e charutos expostos ao consumo com a designação de “sem nicotina” ou equivalente não devem conter mais de 0,2% de nicotina.

Art. 8.º — Fica interdito para o tabaco e derivados o emprego de denominações ou anúncios, tais como: atóxicos, desintoxicado ou outros semelhantes.

Í N D I C E

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

(VOLUME II — 1942)

INDICE DE AUTORES

- ACHÉ Lúcia — Vide RIBEIRO, Renato Fonseca
- ALMEIDA, Floriano de, Carlos da Silva Lacaz e Olga de Barros — Levedurosas humanas (Visão geral do assunto), 326.
- ÁLVARES CORREA, Marcelo Oswaldo — Vide CORREA, Marcelo Oswaldo Álvares
- ARANTES, Maria — Vide CALAZANS, S. C.
- ASHCAR, Hassib — Contribuição ao estudo morfo-biológico do *Penicillium notatum*, 309.
- BARROS MAGALDI JORDÃO, F. de — Vide JORDÃO, F. de Barros Magaldi
- BARROS, Olga de — Vide ALMEIDA, Floriano de
- BRITO E SILVA, Manoel de — Vide SILVA, Manoel de Brito e
- BÜLLER SOUTO, Ariosto — Vide SOUTO, Ariosto Büller
- CAGNO, Nelson — Sobre alguns aspectos importantes do guaraná (*Paulinia cupana*). Estudo e caracterização do seu alcalóide, 69.
- CALAZANS, S. C. e Maria Arantes — Antígenos adicionados de lanolina e sua aplicação na produção de soros aglutinantes, 236.
- CARVALHO LIMA, J. P. de — Vide LIMA, J. P. de Carvalho
- CORREA, Marcelo Oswaldo Álvares — Vide TAUNAY, Augusto de E.
- CORREA, Ruth de Lima — Bebidas não alcoólicas ou refrigerantes, 416.
- FARACO, Maria José — Vide PESTANA, Bruno Rangel
- FARACO, Maria José — Vide TAUNAY, Augusto de E.
- FERRAZ DE MENEZES JR., J. B. — Vide MENEZES JR., J. B. Ferraz de
- FIGUEIREDO, Gabriel Garcia de — Vide TAUNAY, Augusto de E.
- FONSECA, Cândida — Vide RIBEIRO, Renato Fonseca
- FONSECA RIBEIRO, Renato — Vide RIBEIRO, Renato Fonseca
- FRÂNCIA MARTINS, A. — Vide MARTINS, A. Frância
- GARCIA DE FIGUEIREDO, Gabriel — Vide FIGUEIREDO, Gabriel Garcia de
- GODOY, Olivia de — Vide SOUTO, Ariosto Büller
- GOMES, Luís de Sales e F. Barros Magaldi Jordão — Suscetibilidade de *Cebus versuta* Elliot ao-virus da paradenite inguinal, 3.

- GOMES, Luís de Sales e Manoel de Brito e Silva — Aglutininas heterófilas na infogranulomatose de Nicolas-Favre, 212.
- GOMES, Luís de Sales — Nota a propósito de *Salmonella pauloensis*, 231.
- JORDÃO, F. de BARROS MAGALDI — Vide GOMES, Luís de Sales
- LACAZ, Carlos da Silva — Vide ALMEIDA, Floriano de
- LIMA, Ema de — Vide PESTANA, Bruno Rangel
- LIMA, J. P. de Carvalho e Lúcia de Queiroz Teles — Demonstração de cápsulas bacterianas, 190.
- LIMA CORREA, Ruth de — Vide CORREA, Ruth de Lima
- MARTINS, A. Frância — Sobre o padrão bacteriológico do Leite em São Paulo — Leite de granjas, 369.
- MAGALDI JORDÃO, F. de Barros — Vide JORDÃO, F. de Barros Magaldi
- MENEZES JR., J. B. Ferraz de — Vide RIBEIRO, Renato Fonseca
- MENEZES JR., J. B. Ferraz de — Do exame microscópico do guaraná em Bromatologia, 45.
- MONTENEGRO, João — Neuromas da mucosa do apêndice, 362.
- PESTANA, Bruno Rangel e Ema de Lima — Estudo comparativo da contagem de germes do leite em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado, e incubadas às temperaturas de 32 e 37°C., 18.
- PESTANA, Bruno Rangel e Maria José Faraco — Exame bacteriológico de Fezes, 269.
- QUEIROZ TELES, Lúcia de — Vide TELES, Lúcia de Queiroz
- RANGEL PESTANA, Bruno — Vide PESTANA, Bruno Rangel
- RIBEIRO, Renato Fonseca, Lúcia Aché e J. B. Ferraz de Menezes Jr. — Em torno do teor de nicotina nas folhas de *Nicotiana tabacum* e nos cigarros, 423.
- RIBEIRO, Renato Fonseca, Lúcia Aché e J. B. Ferraz de Menezes Jr. — Da conveniência de uma legislação sobre fiscalização do tabaco e da sua inclusão no Código Sanitário, 433.
- RIBEIRO, Renato Fonseca e C. Fonseca — Interferência da vitamina D na reação de Carr-Price, 413.
- ROSSETTI, Nicolau — *Achorion gallinae* (Méglin-Sabrazès, 1890-93) — Caso de infestação espontânea, 288.
- RUGAI, Ettore — Meios de cultura econômicos preparados pela digestão triptica da carne, segundo Hottinger, 253.
- SALES GOMES, Luís de — Vide GOMES, Luís de Sales
- SEIXAS, Antonio Carlos — Leite, molhagem e seu padrão, 390.
- SILVA, Manoel de Brito e — Vide GOMES, Luís de Sales
- SILVA, Manoel de Brito e — Surto epidêmico de Mononucleose infectuosa, 42.
- SILVA LACAZ, Carlos da — Vide LACAZ, Carlos da Silva
- SOUTO, Ariosto Büller e Olivia de Godoy — Investigações sobre produtos de tomate, 100.

- TAUNAY, Augusto de E., Marcelo Oswaldo Álvares Correa e Gabriel Garcia de Figueiredo — A reação de fixação do complemento no diagnóstico da amebíase, 34.
- TAUNAY, Augusto de E. — Comparação entre a centrifugação de uma hora e o emprego de clorofórmio e alumen de potássio no diagnóstico das meningites tuberculosas, 245.
- TAUNAY, Augusto de E. e Maria José Faraco — Comportamento da *Shigella alcalescens*, 248.
- TELES, Lúcia de Queiroz — Vide LIMA, J. P. de Carvalho.

ÍNDICE DE ASSUNTO

<p><i>Achorion gallinae</i> (Mégnin-Sabrazès, 1890-93) — Caso de infestação humana espontânea 288</p> <p>Aglutininas heterófilas na linfogranulomatose de Nicolas-Favre 212</p> <p>Amebíase, a reação de fixação do complemento no diagnóstico da 34</p> <p>Antígenos adicionados de lanolina e sua aplicação na produção de soros aglutinantes 236</p> <p>Apêndice, neuromas da mucosa do 362</p> <p>Bebidas não alcoólicas ou refrigerantes 416</p> <p>Cápsulas bacterianas, demonstração de 190</p> <p>Carr-Price, interferência da vitamina D na reação de 413</p> <p>Caso de infestação humana espontânea por <i>Achorion gallinae</i> 288</p> <p><i>Cebus versuta</i> Elliot, suscetibilidade ao vírus da poradenite inguinal 3</p> <p>Cigarros, teor de nicotina nas folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> e nos 423</p> <p>Cinquentenário do Instituto Adolfo Lutz — Laboratório Central de Saúde Pública 181</p> <p>Classificação das principais leveduras humanas 329</p> <p>Código Sanitário, conveniência de legislação sobre fiscalização do tabaco e sua inclusão no 433</p>	<p>Comparação entre a centrifugação de uma hora e o emprego de clorofórmio e alumen de potássio no diagnóstico das meningites tuberculosas 245</p> <p>Comportamento sorológico da <i>Shigella alkalescens</i> 248</p> <p>Contagem de germes do leite em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado incubadas às temperaturas de 32 e 37°C., estudo comparativo 18</p> <p>Contribuição ao estudo morfo-biológico do <i>Penicillium notatum</i>. 309</p> <p>Conveniência de legislação sobre fiscalização do tabaco e sua inclusão no Código Sanitário 433</p> <p>Demonstração de cápsulas bacterianas 190</p> <p>Diagnóstico clínico das principais leveduras humanas 329</p> <p>Diagnóstico da amebíase, a reação de fixação do complemento no 34</p> <p>Diagnóstico das meningites tuberculosas, comparação entre a centrifugação de uma hora e o emprego de clorofórmio e alumen de potássio no 245</p> <p>Digestão triptica da carne, segundo Hottinger, meios de cultura econômicos preparados pela 253</p> <p>Estudo comparativo da contagem de germes do leite em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado incubadas 245</p>
---	--

das às temperaturas de 32 e 37°C.	18	peraturas de 32 e 37.C, de ger- mes do	18
Estudo e caracterização do alcalóide do guaraná	69	Leite, molhagem e seu padrão ..	390
Estudo morfo-biológico de <i>Penicillium notatum</i> , contribuição ao	309	Leveduroses humanas (Visão geral do assunto)	326
Exame bacteriológico de fezes ..	269	Linfogranulomatose de Nicolas-Favre, aglutininas heterófilas na	212
Exame microscópico do guaraná em bromatologia	45	Meios de cultura econômicos preparados pela digestão triptica da carne, segundo Hottinger .	253
Fezes, exame bacteriológico de .	269	Meningites tuberculosas, comparação entre a centrifugação de uma hora e o emprego de clo-rofórmio e alumen de potássio no diagnóstico das	245
Fiscalização do tabaco, conveniência de uma legislação sobre	433	Molhagem do leite	390
Fixação do complemento no diagnóstico da amebiose, a reação de	34	Mononucleose infectuosa, surto epidêmico de	42
Germes do leite, estudo comparativo da contagem em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado incubadas às temperaturas de 32 e 37°C. ..	18	Mucosa do apêndice, neuromas da	362
Guaraná em bromatologia, exame microscópico do	45	Neuromas da mucosa do apêndice	362
Guaraná, sobre alguns aspectos importantes do. Estudo e caracterização do seu alcalóide .	69	Nicolas-Favre, aglutininas heterófilas na linfogranulomatose de	212
Hottinger, meios de cultura econômicos preparados pela digestão triptica da carne, segundo	253	<i>Nicotiana tabacum</i> , teor de nicotina nas folhas de	423
Instituto Adolfo Lutz, cinquentenário do	181	Nicotina, teor nas folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> e nos cigarros	423
Interferência da vitamina D na reação de Carr-Price	413	Padrão bacteriológico do leite de granjas em São Paulo	369
Investigações sobre produtos de tomate	100	<i>Paullinia cupana</i> , sobre alguns aspectos importantes da. Estudo e caracterização do seu alcalóide	69
Lanolina, antígenos adicionados de	236	<i>Penicillium notatum</i> , contribuição ao estudo morfo-biológico ...	309
Leite de granjas em São Paulo, sobre o padrão bacteriológico do	369	Poradenite inguinal, suscetibilidade de <i>Cebus versuta</i> Elliot ao vírus da	3
Leite, estudo comparativo da contagem em placas de agar "standard" e agar-leite-triptona-glicosado incubadas às tem-		Produtos de tomate, investigações sobre	100

Reação de Carr-Price, interferência da vitamina D na	413	Elliot ao virus da poradenite inguinal	3
Reação de fixação do complemento no diagnóstico da amebiase	34	Tabaco, conveniência de legislação sobre fiscalização do	433
Refrigerantes, bebidas	416	Teor de nicotina nas folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> e nos cigarros	423
<i>Salmonella pauloensis</i> , nota a propósito de	231	Tomate, investigações sobre produtos de	100
<i>Shigella alkalescens</i> , comportamento sorológico da	248	Virus da poradenite inguinal, suscetibilidade de <i>Cebus versuta</i> Elliot ao	3
Soros aglutinantes, antígenos adicionados de lanolina e sua aplicação na produção de	236	Vitamina D, interferência na reação de Carr-Price	413
Surto epidêmico de mononucleose infectuosa	42		
Suscetibilidade de <i>Cebus versuta</i>			