

**PACULDADE DE MEDICINA DA PORTO ALEGRE**

# TESE

apresentada à

**PACULDADE DE MEDICINA DA PORTO ALEGRE**

a 14 de novembro de 1950

por

**Oscar Belmiro Manoel May Pereira**

Natural do Estado do Rio Grande do Sul

Filho legítimo do Dr. Oscar Bernardo Pereira e de D.<sup>a</sup> Adília May Pereira

## **As Novas Técnicas Microbiológicas em Tisiologia**

(CADEIRA DE MICROBIOLOGIA)

**TESE INAUGURAL**

1960

Of. Gráficas da Livraria do Globo S. A. — Porto Alegre



Bib. Fac. Med. UFRGS

T-0723

As novas técnicas microbiológicas

P 436 m

FACULDADE DE MEDICINA DE PORTO ALEGRE

Diretor: Prof. LUIZ FRANCISCO GUERRA BLESSMANN

Secretário: JOSÉ ALMEIDA PINTO

PROFESSORES CATEDRÁTICOS

José Carlos Fonseca Milano .....	Anatomia
Francisco de Castilhos Marques Pe- reira .....	Histologia e Embriologia Geral
Ney da Costa Cabral .....	Física Biológica
Mário Bernd .....	Química Fisiológica
Raul Pilla .....	Fisiologia
Pery Riet Corrêa (int. subst.) .....	Fisiologia
Manuel José Pereira Filho .....	Microbiologia
Manuel Loforte Gonçalves .....	Farmacologia
Raul Franco Di Primio .....	Parasitologia
Walter Hugo Castilho .....	Patologia Geral
Paulo de Queiroz Telles Tibiriçá ....	Anatomia e Fisiologia Patalógicas
Mário Degni .....	Técnica Operatória e Cirurgia Experi- mental
Rubens Mário Garcia Maciel .....	Clínica Médica Propedêutica
Elyseu Paglioli .....	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Alberto de Souza .....	Clínica Otorrinolaringológica
Carlos Leite Pereira da Silva .....	Clínica Dermatológica e Sifiligráfica
Paulo Maurell Moreira .....	Higiene
Celestino Moura Prunes .....	Medicina Legal
Eduardo Zacaro Faraco (int.) .....	Terapêutica Clínica
Homero Kroeff Fleck .....	Clínica Urológica
Basil Sefton .....	Clínica de Moléstias Tropicais e Infec- tuosas
Antônio Saint Pastous de Freitas ..	3.ª Clínica Médica
Eduardo Sarmento Leite da Fonseca Filho .....	4.ª Clínica Médica
Jacy Carneiro Monteiro .....	1.ª Clínica Cirúrgica
Luiz Francisco Guerra Blessmann ...	2.ª Clínica Cirúrgica
Gert E. S. Eichenberg (int. subs.) ..	2.ª Clínica Cirúrgica
Othon Soares de Freitas .....	Clínica Obstétrica
Thomaz Larangeira Mariante .....	1.ª Clínica Médica
Álvaro Barcellos Ferreira .....	2.ª Clínica Médica
Martim Gomes .....	Clínica Ginecológica
Ari Borges Fortes .....	Clínica Neurológica
Celso M. de Aquino (int. subst.) ....	Clínica Neurológica
Ivo Corrêa Meyer .....	Clínica Oftalmológica
Décio Soares de Souza .....	Clínica Psiquiátrica
Raul Moreira da Silva .....	Clínica Pediátrica e Higiene Infantil
César Augusto da Costa Ávila .....	Clínica Cirúrgica Infantil e Ortopédica

PROFESSOR HONORÁRIO

Olimpio Olinto de Oliveira

2628

## PROFESSORES EM DISPONIBILIDADE

Alvaro Fróes da Fonseca .....	Anatomia
Mário de C. Pinheiro Bittencourt ....	Fisiologia

## PROFESSOR JUBILADO

Manuel Gonçalves Carneiro .....	Clínica Pediátrica Médica e Higiene Infantil
---------------------------------	--

## PROFESSORES APOSENTADOS

Fernando de Paula Esteves .....	Terapêutica
Moyisés Menezes .....	Anatomia
Raymundo Gonçalves Vianna .....	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Ulisses de Nonoai .....	Clínica Dermatológica e Sifiligráfica

## PROFESSORES DA ESCOLA DE FARMÁCIA

Antônio Bottini .....	Farmácia Química
Germano Roman Ros .....	Química Analítica
Henrique Oliveira .....	Química Toxicológica e Bromatológica
Fernando Lartigau .....	Farmácia Galênica
Vago .....	Farmacognózia
Alfredo Silveira Netto .....	Botânica Aplicada à Farmácia
Enio Moniz Vasconcellos .....	Química Industrial Farmacêutica

## PROFESSORES DA ESCOLA DE ODONTOLOGIA

Antônio Veríssimo de Mello .....	Ortodontia e Odontopediatria
Adalberto da Câmara .....	Clínica Odontológica
João Rache Vitello .....	Prótese Dentária
José Chahér .....	Patologia e Terapêutica Aplicadas
Oton Santos e Silva .....	Técnica Odontológica
Aurelino Santos Reis .....	Metalurgia e Química Aplicadas
Osman Velasques (interino) .....	Prótese Buco-Facial

## DOCENTES LIVRES — A) MEDICINA

Adayr Eiras de Araujo .....	Clínica Urológica
	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
Alberto Vianna Rosa .....	Clínica Urológica
Almir Alves .....	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
Álvaro Murillo da Silveira .....	Clínica Neurológica
Antero do Prado Lisboa .....	Clínica Médica
Antônio P. Louzada .....	Clínica de Moléstias Tropicais e Infecciosas
Antônio de Souza .....	Clínica Otorrinolaringológica
Antônio de Paula Alves Azambuja ..	Clínica Propedêutica Médica
Apoio Corrêa Gomes .....	Clínica Médica
Argemiro Dornelles .....	Clínica Ginecológica
Artur Coelho Borges .....	Clínica de Moléstias Tropicais e Infecciosas
Artur S. Mascarenhas .....	Clínica Otorrinolaringológica

Artur Mickelberg .....	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Ary Barcellos Ferreira .....	Clínica Propedêutica Médica
Athayde de Simões Pereira .....	Química Fisiológica
Bruno Marsiaj .....	Anatomia
Carlos Machado Carrion .....	Física Biológica
Carlos Candal dos Santos .....	Patologia Geral
Carlos de Britto Velho .....	Clínica Médica
Cássio Annes Dias .....	Clínica Médica
Celso Cesar Papaléo .....	Medicina Legal
Celso Machado de Aquino .....	Clínica Neurológica
Cesar José dos Santos .....	Clínica de Moléstias Tropicais e Infec- tuosas
Coradino Luppi Duarte .....	Clínica Obstétrica
Custódio Vieira da Cunha .....	Histologia e Embriologia Geral
Darcy Farias Lima .....	Parasitologia
Darcy José da Rocha .....	Clínica Dermatológica e Sifiligráfica
Décio de Almeida Martins Costa ....	Clínica Pediátrica Médica e Higiene In- fantil
Duilio Perrone .....	Clínica Cirúrgica
Eduardo Assis Brasil .....	Clínica Oftalmológica
Eduardo Zacaro Faraco .....	Terapêutica Clínica
Enio Marsiaj .....	Clínica Obstétrica
Ervino João Carlos Presser .....	Técnica Operatória e Cirurgia Experi- mental
Felicíssimo Difini .....	Química Fisiológica
Fradique Correia Gomes .....	Clínica Ginecológica
Gorki Mecking de Lima .....	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Heitor Masson Cirne Lima .....	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Hélio Lopes Medeiros .....	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Helmuth Fischer Weinmann .....	Física Biológica
Hermes Rodrigues .....	Histologia e Embriologia Geral
Ivo Barbedo .....	Higiene
Jaime Guimarães Domingues .....	Clínica Oftalmológica
Jaime Vignoli .....	Fisiologia
Jandyr Maia Fallace .....	Clínica Oftalmológica
João de Almeida Antunes .....	Higiene
João Cahen Fischer .....	Clínica Cirúrgica
João Carlos Gomes da Silveira .....	Clínica Ginecológica
Jorge Mazon Fonyat .....	Clínica Ginecológica
José Eboli .....	Clínica Propedêutica Cirúrgica
José dos Anjos Vasconcellos .....	Técnica Operatória e Cirurgia Experi- mental
José Maria Santiago Wagner .....	Clínica Cirúrgica Infantil e Ortopédica
Leônidas Palmeiro Escobar .....	Medicina Legal
Leônidas Soares Machado .....	Clínica Médica
Luiz Soares Sarmiento Barata .....	Higiene
Luiz Assupção Osório .....	Clínica Urológica
Luiz Germano Rothfuchs .....	Clínica Oftalmológica
Manuel J. Gonzales .....	Clínica Psiquiátrica
Manuel Madeira da Rosa .....	Terapêutica Clínica
Maria Clara Marliano da Rocha .....	Clínica Médica
Mário Araujo Azambuja .....	Clínica Pediátrica Médica e Higiene In- fantil
	Clínica Oftalmológica



Mário Rangel Ballvé .....	Clínica Médica
Mário Corrêa Staedter .....	Farmacologia
Newton Prates de Lima .....	Clínica Ginecológica
Nino Marsiaj .....	Clínica Médica
Norman Sefton .....	Medicina Legal
Oddone Marsiaj .....	Clínica Obstétrica
Oscar Bernardo Pereira .....	Microbiologia
Osmar Pilla .....	Farmacologia
Otávio Couto Barcellos .....	Patologia Geral
	Higiene
Paulo F. Ludvig Becker .....	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Paulo Luiz Vianna Guedes .....	Clínica Psiquiátrica
Pedro Álvaro José Sirangelo .....	Farmacologia
Pery Riet Corrêa .....	Fisiologia
Rafael Cabeda Sobrinho .....	Parasitologia
Raul Jobim Bittencourt .....	Medicina Legal
	Clínica Psiquiátrica
Ramiro Frota Barcellos .....	Química Fisiológica
Ruy Lauer Simões .....	Histologia e Embriologia Geral
Taufick Saadi .....	Anatomia
Telêmaco Estivalet Pires .....	Clínica de Moléstias Tropicais e Infec- tuosas
Tenack Wilson de Souza .....	Clínica Propedêutica Médica
Victor Rabello Miranda .....	Clínica Neurológica
Victor Salazar Rangel .....	Microbiologia
Waldemar de Ávila Castro .....	Anatomia e Filosofia Patológicas
Waldemar da Silva Job .....	Terapêutica Clínica
Waldemar Niemayer .....	Clínica Oftalmológica
Walter Ghezzi .....	Anatomia
Elias Kanan .....	Clínica Cirúrgica Infantil e Ortopédica

## B) ODONTOLOGIA

Antônio Rosat .....	Prótese Dentária
Aurora Nunes Wagner .....	Ortodontia e Odontopediatria
Enio Pessoa .....	Metaurgia e Clínica Aplicadas
Hardy Ebling .....	Patologia e Terapêutica Aplicadas
Januário Marques da Costa .....	Técnica Odontológica
João Benedito de Souza .....	Prótese Dentária
Luiz Carlos Guimarães .....	Clínica Odontológica
Miguel Saldanha .....	Metalurgia e Química Aplicadas
Nicolau Fonseca Milano .....	Técnica Odontológica
Osman Velasques .....	Prótese Buco-Facial
Paulo P. Louro Filho .....	Patologia e Terapêutica Aplicadas
Waldemar Barbedo .....	Prótese Buco-Facial

## C) FARMÁCIA

Francisco Chagas e Souza .....	Microbiologia
José Vianna Rocha .....	Farmácia Química
Rubens Green Ribeiro Dantas .....	Química Toxicológica e Bromatológica

MED

05300474

T

WF200 P4336n 1950

{000143910} Pereira, Oscar Belmiro Manoel May.  
As novas tecnicas microbiologicas em  
tisiologia. 1950. 69 p. : il.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O gênero *Mycobacterium* Lehmann e Neumann, constituído por bastonetes ácido-resistentes, com extremidades intumescidas, cuneiformes ou ramificadas, apresenta reais afinidades com os cogumelos inferiores.

Crescem lentamente nos meios ordinários em aerobiose.

As duas espécies patogênicas *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, representam capítulos da Microbiologia com muitos pontos a resolver.

Do agente etiológico da lepra, não se conhece suficientemente nem o seu cultivo, nem mesmo a microbiologia hodierna possui animal de laboratório que ofereça, aos trabalhos experimentais, condições cientificamente completas. Tampouco êsse germe se cultiva em série, nem mesmo se conseguiu ainda provar, com clareza, tôdas as condições de contágio.

Quanto ao germe de Koch, as condições são bem diversas. Animais de laboratório, cobaio e coelho, oferecem ao pesquisador tôdas as condições para um estudo experimental.

Nos nossos dias, o cultivo do *Mycobacterium de Koch* recebeu novo incremento com técnicas eminentemente práticas, desde os trabalhos de Loewenstein e Petraghani até as inovações recentes, propostas por Dubos, que abreviam sobremodo o crescimento do germe. Pode-se dizer que essa técnica está nivelada, em valor e rapidez, aos cultivos das diversas bactérias patogênicas.

Quanto aos estudos de microscopia, novos dados foram ultimamente propostos para as práticas correntes: ao lado da verificação de álcool e ácido-resistência, característica das micobactérias, Hagemann (1937), propôs estudá-las ao microscópio em fluorescência secundária. Para isso, ativou a fluorescência dêsses germes impregnados pelos fluorocromos, graças a

fonte de raios ultra-violetas ou, mais simplesmente, com raios outros, vizinhos dos ultra-violetas.

Está claro que dêsse sistema ótico especial eliminou-se totalmente tôdas matérias capazes de dar essa fluorescência. Assim, na rotina, escreve-se uma nova expressão: micróbios fluorescentes, ao lado das conclusões de álcool e ácido-resistência.

Praticado êsse estudo cuidadoso de microscopia, convém passar à realização das provas experimentais em cobaios, não esquecendo nelas pormenores técnicos que forneçam achados mais rápidos, sem as possíveis causas de êrro, que porventura possam dificultar o diagnóstico etiológico.

Acompanhando, há cêrca de cinco anos, os diagnósticos laboratoriais no Hospital-Sanatório Belém, quer nos escarros, pela microscopia direta ou pela prova indireta, quer ainda pelos exames dos lavados gástrico e tráqueo-brônquico, bem como pelas culturas e inoculações em cobaios, julgamos trazer algumas contribuições pessoais e também juízo seguro do valor dos processos utilizados, atualmente, nos laboratórios de pneumologia.

**AS NOVAS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS  
EM  
FISIOLÓGIA**



## PRIMEIRA PARTE

### CAPÍTULO I

#### Aspeto microscópico do “*Mycobacterium tuberculosis*”

##### I — MORFOLOGIA

O germe da tuberculose apresenta, nos exsudatos, morfologia característica. Ora é um bastonete isolado, ora forma grupos de 2 ou 3 elementos. Vêm-se disposições em V, X ou L, de formas bacilares, longas, médias e curtas. Excepcionalmente notam-se elementos filamentosos que atingem, por vêzes, 10 micra de comprimento.

A coloração dessas formas é ora uniforme, ora descontínua. As formas curtas são mais homogêneas, ao passo que as formas longas são as mais das vêzes granulosas. Todavia formas longas homogêneas são também observadas. Nos bacilos granulosos há sucessão de cilindros vermelhos separados por espaços incolores. Em certos exemplares o aspeto do germe assemelha-se a curtas cadeias de estreptococos e outros casos, o bastonete apresenta na parte central um grão mais corado de forma arredondada ou ovóide com extremidades afiladas e mais claras. A existência de formas ramificadas ou intumescidas, descritas por Marpman e Craig, não são mais admitidas.

Meyer e Ophuls são de opinião que devem ser consideradas como *streptothrix*.

Bezançon e Philibert nunca observaram nos escarros o *Mycobacterium de Koch* sobre forma de elementos ramificados ou em clava. Nos tecidos ao contrário o germe tuberculoso apresenta formas intumescidas. No pus e no líquido céfaloraquidiano da meningite tuberculosa o aspeto do germe é em bastonete. Nas urinas e na bÍlis os exemplares são mais longos e segmentados. Em lesões tuberculosas, em via de desintegração ca-

seosa, as formas, o aspeto e os agrupamentos são inteiramente iguais aos observados nos escarros.

São clássicas as observações de Magrou que demonstram a possibilidade do germe de Koch dispor-se em grupos radiados. Essa disposição tão curiosa é vista com freqüência no cérebro e nos rins.

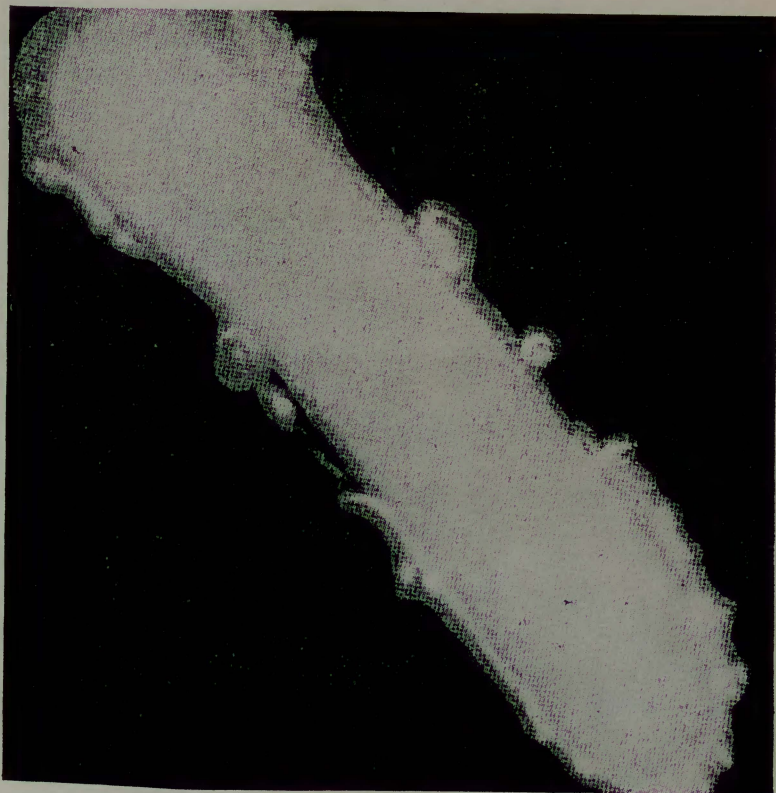
Corpúsculos cromófilos no interior dos corpos bacilíferos são visíveis graças à sua forte refringência, mesmo em preparados não corados. Quando o corpúsculo é único, fica situado no centro bacilar ou numa das extremidades e é de forma esférica ou oval. Outras vêzes, os elementos bacilares possuem três corpúsculos, um central e dois subterminais. Quando há no corpo bacilar numerosos corpúsculos a disposição é irregular. Nas culturas verificam-se por vêzes corpúsculos isolados que possuem a mesma refringência que os corpúsculos intracelulares, o que faz pensar tenham saído do interior de bacilos.

Nos escarros ao lado de germes providos de um ou de muitos corpúsculos há outros elementos sem granulações.

Em preparados bem corados pelo método de Ziehl Neelsen o germe apresenta duas partes, o protoplasma central de cor vermelho-bordeau e a membrana periférica de vermelho-claro. É fácil verificar no protoplasma fragmentos primários de divisão que por sua vez se subdividem em fragmentos secundários. Entre os fragmentos primários a membrana se estrangula ligeiramente. Não é raro ver-se fragmento primário inteiramente transformado em grânulo negro, que representa o protoplasma condensado. Pela deisência da membrana os corpúsculos negros intrabacilares tornam-se livres; observação comum em culturas que permanecem no laboratório mais de dois anos na temperatura ambiente. Segundo Nedelkovitch, de Belgrado, os grânulos negros livres germinam para recomeçar a vida ativa: suas propriedades então são muito próximas das dos esporos. Ao contrário, os grânulos negros intrabacilares alongam-se e depois fragmentam-se. O grânulo negro livre alonga-se, a membrana se diferencia e o protoplasma começa logo a fragmentar-



ESTAMPA



MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Imagem eletrônica 20.000 X 1

Giutini e Brotey, Instituto Pasteur

(Images électroniques en Microbiologie. C. Levaditi, pg. 24)

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**

se, iniciando-se então a multiplicação habitual por divisão transversa. Representam um estado irreversível, ao passo que os grânulos negros intrabacilares evidenciam um estado reversível.

Hauduroy, conclui que os bacilos novos não são ácido-resistentes adquirindo essa propriedade na maturidade. Entretanto Nedelkovitch não admite a não ácido-resistência como fase de desenvolvimento normal do germe de Koch. No material humano vêm-se balisadas de bastonetes ácido-resistentes fragmentados.

O modo habitual de multiplicação dos germes é a divisão transversa direta. Boehm (1947), estudou ao microscópio eletrônico a estrutura dos micobactérios tuberculosos muito virulentos, concluindo serem êles constituídos de u'a massa homogênea. Atenuada a virulência pelo envelhecimento cultural, surgem elementos granulares. As granulações exteriorizadas (granulações de Much) são constituídas de lipídeos, cêras, fosfátides e de ácido nucleico, parecendo conter a parte ativa da tuberculina. Essas granulações livres das culturas velhas são filtráveis e possuem poder de absorção máximo para os raios de um comprimento de onda de 2.537 A a 2.750 A. A técnica de microcultura sôbre lâmina (Pryce, 1941), permite apreciar a morfologia dos germes em desenvolvimento. O tipo médio humano é mais longo, delgado e curvo e apresenta habitualmente disposição granulosa. A coloração do tipo bovino é, ao contrário, uniforme e os elementos são curtos, retos e grossos. Todos êsses bacilos ácido-resistentes são gram-positivos.

Sordelli e Arena (1934), julgam que a propriedade de ácido-resistência depende da existência de uma membrana semipermeável em tórno dos germes intatos, permitindo a fuscina básica fenicada difundir-se nêles, não deixando porém, que dêles saia a fuscina ácida

Os trabalhos de Nègre demonstraram que os germes tuberculosos de 3 ou 4 dias têm poder patogênico muito menos pronunciado que os micobactérios mais antigos. O poder patogênico começa a aparecer no 6.º dia depois da sementeira. Andrejew (1947) conclui que há uma relação direta de ordem

geral, entre as mudanças respiratórias do germe de Koch e a sua virulência. Na multiplicação do bacilo aviário Bretey e Imelik (1949), verificaram uma fase inicial de multiplicação por divisão rápida; segue-se uma fase de maturação onde os elementos divididos adquirem o seu desenvolvimento normal; depois, surgem fenômenos de desintegração que chegam à lise microbiana e à formação de corpos amorfos; por fim, a cultura mostra nova fase de desenvolvimento que evolui da mesma maneira que a precedente.

Dos trabalhos de Antonio Fontes sôbre o “Ultra-virus tuberculoso”, deduziu-se inicialmente:

- 1.º — a unidade viva infectante é o grânulo;
- 2.º — o elemento regenerador da forma bastonete ácido e álcool-resistente é essa granulação;
- 3.º — a existência do vírus é possível, mesmo sôbre a forma de bastonete álcool e ácido-resistente na intimidade dos tecidos do animal parasitado, constituindo então a tuberculose latente;
- 4.º — os germes apresentam um ciclo de vida que se pode esquematizar da maneira seguinte:

A. — *Fase germinativa.*

Poeira granular.

Granulações livres.

B. — *Fase de crescimento.*

Multiplicação granular.

Organização celular { Emissão e organização granular intracelular.  
Emissão e organização granular extracelular.

Divisão e reprodução celular.

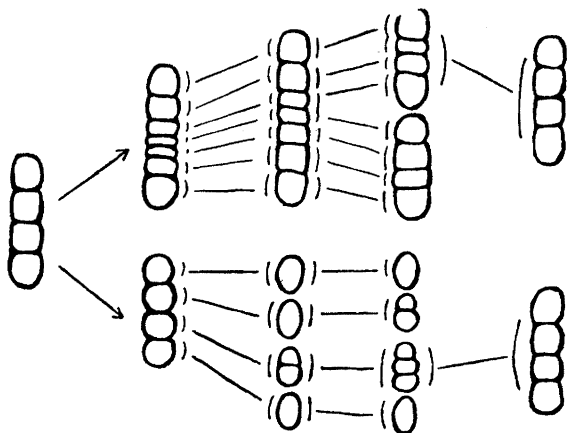
C. — *Fase de desintegração.*

Desintegração celular.

Poeira granular. Granulações livres.

Desintegração granular. Lise. Multiplicação granular.

Organização celular.

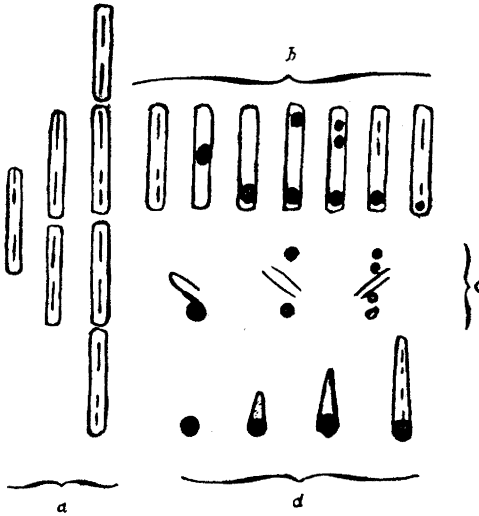


MODOS ALTERNATIVOS DE DIVISÃO DAS MICOBACTÉRIAS E DAS CORINEBACTÉRIAS

- 1) Proliferação das células por simples divisão
- 2) Fragmentação em células individuais que, pelo crescimento e divisão, voltam à condição original

(Journal of General Microbiology) — THE  
CYTOLOGY AND LIFE-HISTORY OF  
BACTERIA, BISSET — pg. 69

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA



REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA  
MULTIPLICAÇÃO DO MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS

SEGUNDO JEVREM NEDELKOVITCH

- a) Divisão direta
- b) Formação de grânulos negros intraba-  
ciliares
- c) Libertação dos grânulos negros
- d) Germinação dos grânulos negros livres  
e passagem à divisão direta

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA

Vê-se, pois, que o ciclo do *Mycobacterium tuberculosis* é iniciado por uma poeira germinativa cianófila que passa depois à forma granular-cianófila e bacilar-cianófila, e chegando finalmente à forma bacilar-ácido-resistente típica.

A existência dos elementos filtráveis nos produtos tuberculosos e nas culturas é um dos pontos mais discutidos em microbiologia. Nem todos os espécimes de *Mycobacterium tuberculosis* apresentam riqueza igual desses elementos (Calmette).

Valtis e van Deirse verificaram que as culturas de virulência mais elevada são as mais ricas em elementos filtráveis que diminuem, a medida que a virulência do germe se atenua.

É um capítulo da tuberculose que merece ainda estudos mais completos e experimentações mais acuradas feitas com as novas técnicas da pneumologia.

## II — ÁLCOOL E ÁCIDO-RESISTÊNCIA

Carácter específico e hereditário dos germes tuberculosos e de outras micobactérias, a ácido e álcool-resistência apresenta variações que constituem o denominado *ciclo tintorial* dependente das alterações profundas metabólicas na evolução desses seres microbianos. Nas formas jovens e também nas formas em via de degeneração, as micobactérias são descoradas, completa ou quase completamente, pela ação do álcool ou dos ácidos fortes muito diluídos.

Hauduroy acredita que as formas jovens do micobactério tuberculoso, desprovidas de ácido e álcool-resistência, possuem propriedades biológicas bem diversas do germe no estado adulto.

Na verdade, os germes paratuberculosos apresentam o mesmo ciclo tintorial que os tuberculosos autênticos, porém, com uma instabilidade nítida de sua álcool e ácido-resistência.

Ferran, em 1897, conclui que, pelas passagens em meios pobres, transforma-se o *Mycobacterium tuberculosis* em saprófita desprovida de toda a sua álcool e ácido-resistência.

Arloing, obteve culturas homogêneas, nas quais foi fácil verificar a presença de *bacilos nus*.

Auclair (1903), afirma ter conseguido o saprofitismo do germe de Koch autêntico.

Antônio Fontes, por sua vez, em suas notáveis publicações, admite formas saprofíticas do germe de Koch.

Vaudremer, San Felice, entre outros pesquisadores, confirmam a existência dessas formas próximas de fungos microscópicos não ácido e álcool-resistentes.

Também todos os observadores estão acordes em afirmar que nas culturas dos micobactérios tuberculosos há elementos não álcool e ácido-resistentes.

Das pesquisas memoráveis de Anderson (1929, 1938 e 1940) e sua escola, sobre a química desses germes, deduz-se que a substância responsável pela álcool e ácido-resistência é o ácido micólico ( $C_{27}H_{46}O_4$ ).

Asselineau e Lederer (1949), separam pela cromatografia sobre alumina, dois ácidos micólicos provavelmente isômeros; um, o ácido alfa-micólico e o outro, o ácido beta-micólico. O primeiro tem o ponto de fusão entre 55 e 56°, e o segundo, de 71 a 73°.

Em 1948, Fethke e Anderson, identificaram ácidos micólicos bovinos e aviários, ácido fleimicólico e ácido leprosimico que são também ácido e álcool-resistentes.

Nine Choucroune (1939 e 1948), conseguiu isolar duas frações, uma protéica e outra lipopolisacáridica, responsável pela álcool e ácido-resistência.

Desembaraçados os germes tuberculosos dessa fração liposacáridica, as micobactérias perdem a álcool e ácido-resistência, tornam-se mais finas, formam então longas cadeias e demonstra-se mesmo que sua carga elétrica é abaixada, graças às verificações pelo electroforeno.

Goris (1920) já havia concluído em suas importantes investigações sobre a análise química do germe de Koch que substâncias bacilares céricas e o micol ( $C_{27}H_{46}O_4$ ) são ácido e álcool-resistentes.

Kahn e Nonidez (1933), em colônias dos germes de Koch sôbre meio de ôvo observadas em cortes, descreveram uma parte externa composta de germes e grânulos não ácido-resistentes, assim como germes ácido-resistentes com elementos intracelulares intensamente corados. Viram ainda, na parte média, germes ácido-resistentes e grânulos e na parte inferior, sob o meio cultural, germes ácido-resistentes com poucos elementos não ácido-resistentes, retirados das fissuras das colônias.

Essa existência de bactérias apresentando propriedades tintoriais idênticas a do germe da tuberculose, já fôra aliás prevista pelo genial Robert Koch em seu trabalho sôbre a etiologia da tuberculose, divulgado em 1884.

As pesquisas sucessivas de Alvarez e Tavel (1885) demonstraram no smegma humano, saprófita banal, reconhecido com a denominação de bacilo de Lustgarten, que foi o primeiro bacilo ácido-resistente, não tuberculoso, individualizado.

Há necessidade, pois, de recorrer a um método que permita diferenciar fàcilmente o agente etiológico da tuberculose das outras micobactérias.

Giusepe Penso, de Roma, introduziu o ácido paraminosalicílico (PAS) na técnica laboratorial para distinguir o *Mycobacterium tuberculosis* de outros micobactérios.

Em poucos dias consegue-se verificar se um germe isolado é um verdadeiro micobactério tuberculoso ou não.

A técnica a adotar consiste em adicionar  $\frac{1}{2}$  cc de uma solução de PAS (1) em 4,5 cc do meio de Dubos.

Nesse meio semeia-se 1/10 de cc de uma suspensão de germe a examinar (1 miligrama de germes por cc.).

Há bloqueamento total do *Mycobacterium tuberculosis* pelo PAS, que perde, totalmente, sua virulência.

Se quisermos verificar se micobactérios isolados da urina de um doente devem ser considerados germes tuberculosos verdadeiros, devemos utilizar o meio de Penso (Dubos + PAS).

O resultado pode ser dado em 5 ou 6 dias.

A classificação dos micobactérios no entender de Penso pode ser baseada, pois, nos seguintes itens:



- 1.º — Sensibilidade a doses diferentes de PAS.
- 2.º — Presença em côr de pigmento.
- 3.º — Temperatura máxima da cultura.
- 4.º — Necessidade ou não de fatores determinados para o crescimento.
- 5.º — Utilização dos glicídeos.
- 6.º — Determinação pelos fagos.

O quadro diagnóstico é complementado pelas reações tuberculínicas, poder patogênico específico e sôro diagnóstico.

---

(1) Solução de PAS: dissolvida uma quantidade estechiométrica de bicarbonato de sódio em solução aquosa, filtrada em Seitz, de maneira a obter no meio uma concentração de PAS de 1  $\gamma$ , 10  $\gamma$ , 100  $\gamma$ , 1000  $\gamma$  por cc.

## CAPÍTULO II

### Fluoromicroscopia

A microscopia em fluorescência foi descoberta na Alemanha em 1911, por Heimstädt e Lehmann e aplicada, pela primeira vez, ao estudo do *Mycobacterium tuberculosis*, por Hagemann em 1937.

A visibilidade dos microrganismos ou dos vírus tornados fluorescentes pelos fluorocromos depende da combinação de quatro fatores variáveis:

- 1.º — Espectro de absorção do écran destinado a selecionar a luz excitadora;
- 2.º — Espectro de absorção do fluorocromo;
- 3.º — Seu espectro de fluorescência;
- 4.º — Espectro de absorção do filtro de proteção, que, colocado na ocular, é destinado a neutralizar os raios da luz excitadora, transmitindo somente os raios secundários emitidos pelo preparado.

Para praticar-se, então a fluoroscopia ou a pesquisa da fluorescência é indispensável:

- 1.º — Uma fonte luminosa rica em raios ultra-violetas.
- 2.º — Um écran destinado a reter os raios visíveis superfluos e deixar passar somente as radiações ultra-violetas excitadoras da fluorescência.

As fontes luminosas que fornecem raios ultra-violetas são numerosas: lâmpadas em quartzo e vapor de mercúrio, lâmpadas de arco com eletrodes metálicos quase sempre em ferro especial. Atualmente, aconselham-se ampôlas de vidro de Wood que contêm um tubo de quartzo e vapor de mercúrio em alta pressão.

O écran de Wood é um vidro com óxido de níquel e deixa passar ultra-violeta entre 3.000 a 4.000 A.

Os microscópios especiais de fluorescência de uso mais freqüente são os de Reichert e de Zeiss, com lâmpada de arco e banco ótico, tendo um condensador e écrans sólidos e líquidos.

Nos fenômenos de fluorescência, Haitinger considera *fluorescência própria* dos objetos ou *fluorescência primária* e ainda *fluorescência secundária*, resultante da impregnação por solutos diluídos de substâncias fluorescentes: são os chamados fluorocromos de Haitinger. A fluorescência primária dá um *espectro contínuo* que se estende do vermelho ao azul-esverdeado, ao passo que a fluorescência secundária fornece *espectros de faixas*.

Como material de montagem utiliza-se unicamente a água destilada, a água fisiológica, a glicerina, a vaselina líquida pura. O óleo de cedro, sendo fluorescente, é inaplicável. Augier aconselha como mais conveniente o benzoato de metila neutro ou u'a mistura de óleo de vaselina e alfa-bromo-naftaleno, cuja fórmula é a seguinte:

Alfa-bromo-naftaleno .....	24 partes em volume.
Óleo de vaselina .....	76 partes em volume.

### Funcionamento

- 1.º — Regular a posição da ampôla, na lâmpada, de modo a ter a imagem do filamento a vários metros.
- 2.º — Colocar a lâmpada a 10 cms. do espelho do microscópio.
- 3.º — Deitar uma gôta de óleo não fluorescente sôbre o condensador.
- 4.º — Ajustar a preparação na platina e levantar o condensador.
- 5.º — Colocar uma gôta de óleo não fluorescente sôbre a lâmina e depor uma lamínula.

- 6.º — Focalizar com uma objetiva 20 X.
- 7.º — Regular a altura do condensador para que os objetos fluorescentes do campo microscópico se tornem tão brilhantes quanto fôr possível.

Augier aconselha empregar primeiro a objetiva 40 X para o pesquisador adquirir com mais facilidade a imagem do germe de Koch em fluorescência. Sòmente depois de examinar muitas lâminas com essa objetiva, é que se deve empregar a objetiva 20 X.

Não se esqueça, todavia, que as lâminas e lamínulas usadas devem ser novas e cuidadosamente lavadas na mistura de bicromato de potássio-ácido sulfúrico, depois lavadas abundantemente em água pura e em álcool não fluorescente (álcool de destilação recente).

Os preparados destinados ao exame em microscopia fluorescente são obtidos por uma das técnicas que passamos a enumerar.

### Técnicas de colorações

#### I — TÉCNICA DE HAUDUROY E POSTERNACK

- 1.º — O produto a examinar é distendido em camada fina sôbre uma lâmina. Deixa-se secar e fixa-se ao álcool em chama.
- 2.º — Aquecer o soluto de auramina a 1/1000 colocado sôbre o esfregaço até desprendimento de vapores, durante 10 minutos, até a coloração amarela.
- 3.º — Lavagem em água.
- 4.º — Tratar por um soluto álcool-ácido:
 

Ácido clorídrico concentrado . . . . .	4 cc.
Água destilada . . . . .	100 cc.
Álcool a 90º . . . . .	90 cc.

 durante 1 minuto e meio, para descorar o preparado.  
 Repetir essa operação.
- 5.º — Lavar abundantemente nágua corrente.

6.º — Corar o fundo, durante 3 a 5 segundos, com a mistura seguinte:

A. — Azul de metileno . . . . .	1 gr.
Álcool absoluto . . . . .	} 50 cc.
Ácido acético cristalizável . . }	
Água destilada q. s. q. . . . .	100 cc.
B. — Cristal violeta . . . . .	1 gr.
Álcool . . . . .	10 cc.
Água destilada . . . . .	300 cc.

Misturar uma parte da solução B com 3 partes da solução A e diluir a mistura ao 1/10.

7.º — Lavagem em água corrente. Secar.

## II — TÉCNICA DE AUGIER (1949)

1.º — Mergulhar a lâmina com o esfregaço no clorofórmio (5 minutos), depois na acetona e em seguida lavar.

2.º — Recobrir a preparação com soluto de rodamina B a 0,5 por mil, durante 5 minutos.

3.º — Tratar a frio o esfregaço durante 10 minutos, com soluto aquoso de auramina O, dissolvida a frio e filtrada em papel. Lavagem água corrente.

4.º — Praticar a diferenciação com álcool a 70º adicionado de 4 por 1000 de ácido clorídrico, duas vezes seguidas:

a) primeira vez: 30 segundos

b) segunda vez: cerca de 1 minuto.

Lavagem água corrente.

5.º — Mergulhar as lâminas no soluto de permanganato de potássio a 1 por 1000 (2 segundos) e lavar água corrente.

6.º — Corar o fundo emergindo a lâmina 3 a 5 segundos na mistura seguinte diluída ao décimo:

Sol. aq. de azul de metileno a 2% 2 partes

Violeta de genciana fenicada . . . . 1 parte

Lavar água corrente e secar.

Justifica-se êste processo que emprega o clorofórmio, a rhodamina B, o permanganato de potássio e o azul-violeta.

O primeiro desengordura as lâminas e atenua a ácido-resistência dos bacilos paratuberculosos; o segundo dá um tom mais luminoso a fluorescência da auramina e o terceiro age como antilfluorescente sôbre todo o material que não é ácido-resistente e o último mascara a fluorescência primária dos elementos não bacteriológicos atenuando também a fluorescência dos paratuberculosos.

Augier e Prudhomme (1948), substituem os filtros de vidro por écrans líquidos mais fâcilmente adaptáveis a um fluorocromo.

Emprega-se como filtro azul, numa cuba de 5 mm. de espessura, um soluto contendo:

Sulfato de cobre .....	20 gr.
Água destilada fervida, quente ...	100 cc.
Amoníaco (9,5 N) .....	30 gr.

Filtrar o precipitado e adicionar 2 cc. de amoníaco concentrado a 13 cc. de filtrado.

Quanto aos filtros amarelos recorre-se a duas fórmulas, uma com bicromato de potássio e outra contendo sulfone-fenol-ftaleína.

Prepara-se a solução-mãe de bicromato de potássio puro pela dissolução de 10 gr. dêsse sal em água destilada fervida. Leva-se a uma cubeta de 2 milímetros de espessura 8,5 cc. dessa solução-mãe e 11,5 cc. de água destilada fervida.

O filtro preparado com sulfone-fenol-ftaleína é obtido tomando um soluto-mãe de sulfone-fenol-ftaleína, que se obtém dissolvendo a quente 250 miligramas dêsse produto em 100 cc. de água glicerinada a 50% fervida e fenicada a 1%.

Mistura-se êsse soluto-mãe (4,8 cc.) com água destilada glicerinada a 50% e fenicada a 1% (11,5 cc.). A espessura do écran deve ser de 2 milímetros.

### III — TÉCNICA ACONSELHADA POR GASTINEL

- 1.º — O esfregaço fixado pelo calor é corado a frio por um soluto de auramina a 1 por 1000, durante 10 a 15 minutos.
- 2.º — Lavagem nágua corrente (2 a 3 minutos).
- 3.º — Descoloração com um soluto constituído por:  
Álcool a 95º ..... 1000 cc.  
Ácido clorídrico a 24% ..... 4 cc.  
Cloreto de sódio ..... 4 gr.
- 4.º — Lavagem rápida nágua corrente. Secar.

### IV — TÉCNICA DE HAGEMANN

- 1.º — Preparar o esfregaço (vidro UV).
- 2.º — Fixar pelo calor.
- 3.º — Imersão durante 10 minutos na solução:  
Sol. aquosa de auramina 1 : 1000 . 95 cc.  
Ácido fênico líquido (90%) ..... 5 cc.
- 4.º — Lavar em água corrente.
- 5.º — Diferenciação durante 3 minutos no soluto:  
Álcool (70%) ..... 97 cc.  
Ácido clorídrico ..... 3 cc.
- 6.º — Lavar em água corrente.
- 7.º — Secar na temperatura ambiente.

### V — TÉCNICA DE HAITINGER E SCHWERTNER

- 1.º — Preparar o esfregaço (vidro UV).
- 2.º — Fixar pelo calor.
- 3.º — Fluorocromar 30 segundos no soluto aquoso de amarelo de acridina extra 1 : 500 .
- 4.º — Lavar em água corrente.
- 5.º — Imersão durante 15 segundos na mistura:  
Álcool (70%) ..... 97 cc.  
Ácido clorídrico ..... 3 cc.
- 6.º — Lavar em água corrente.
- 7.º — Secar na temperatura ambiente.

## Emprêgo e vantagens

É de real valor o emprêgo da microscopia fluorescente no laboratório de pneumologia, porque não só facilita o trabalho de investigação do germe como, também, em casos vários é possível fornecer à clínica esclarecimentos rápidos e seguros para estabelecer um diagnóstico etiológico. Ressaltam aos olhos de todos os pesquisadores que a microscopia em campo fluorescente permite a observação de um campo maior, o que facilita, sobretudo, o achado do germe. Evita o cansaço oriundo de pesquisas bacterioscópicas demoradas em preparados submetidos ao método de Ziehl Neelsen.

Essa economia de trabalho e tempo deve ser considerada principalmente nos hospitais-sanatórios onde as pesquisas laboratoriais muitas vêzes são feitas em casos iniciais e outras vêzes como verificador seguro, como resultados de tratamentos instituídos ou da cura clínica de doentes. Não se leve, entretanto, a um aprêço demasiado este método a ponto de considerar um germe fluorescente, mesmo com a forma bacilar, como expressão irrefutável da identificação do *Mycobacterium tuberculosis*.

Dizemos germe fluorescente como se diz germe álcool e ácido resistente, como atestados de propriedades valiosas das micobactérias mas nunca equivalentes à verificação da virulência ou ao estudo completo dos cultivos. Entretanto, na prática corrente, fornecer à clínica essa informação de germes fluorescentes já significa muito para se estabelecer um tratamento precoce ou não interromper uma medicação apropriada.

As estatísticas dos laboratórios especializados dão uma percentagem favorável a êsse processo: há nêle uma positividade em média superior a 20% sôbre o método de Ziehl Neelsen.

Cabe-nos citar, entre outros, Weier e Jung (1939) que se apoiaram em resultados de mil casos, Clegg (1946) em 748 casos, Hughes (1943) em 500 casos. Todos comprovam o valor deste método de diagnóstico.



Serve o método de Hagemann para exames de escarros, urina, matérias fecais, conteúdo gástrico, líquido cérebro-espinhal, pus.

Os cortes histológicos, no apreciar de Finke (1940), Schallack (1940), Tanner (1941), Bakker e Vink (1946), também podem ser corados pela auramina e outros fluorocromos.

Os tecidos incluídos em parafina que foram previamente fixados com formol ou cortados no micrótomo de congelação, permitiram a Bakker e Vink, entre outros, revelar: maior segurança, contraste mais evidente, facilidade do encontro dos bacilos e economia de tempo, nessas pesquisas histo-mico-bacterianas.

Os fluorocromos são substâncias incolores ou pouco coradas a luz natural e fluorescentes da luz de Wood em solutoz muito diluídos (1 para 1000 a 1 para 5.000,000).

Podem ser usados nas colorações vitais. São mesmo superiores ao vermelho-neutro.

## CAPÍTULO III

### MEIOS DE CULTURA

Inúmeros são os trabalhos que demonstram os elementos considerados indispensáveis ao melhor desenvolvimento cultural do *Mycobacterium tuberculosis*.

As substâncias básicas devem conter nitrogênio, carbono, oxigênio, hidrogênio, fósforo, potássio e magnésio, que não dispensam, para o desenvolvimento exuberante das culturas, a adição de substâncias outras, em pequena quantidade, tais como, ferro, enxôfre, sódio, citratos e outros sais e ácidos polivalentes.

Considera-se o glicerol como fonte importante para o crescimento do tipo humano pelo fato de originar uma forma de carbono facilmente utilizada pelo germe.

Nas culturas primárias de espécimes bovinos, êste produto exerce ação retardante do desenvolvimento do germe, isso nas mesmas proporções empregadas.

O oxigênio livre é indispensável para o desenvolvimento cultural, que exige ainda temperatura variável de acôrdo com o tipo a isolar: 42° para o bacilo aviário; 40° para o bovino; 37-39° para o tipo humano.

O amoníaco e os aminoácidos são fontes preciosas de nitrogênio.

E' fato ainda perfeitamente verificado que o micobactério da tuberculose suporta variações do pH, mais do que muitas bactérias; tanto é assim, que o metabolismo respiratório não sofre alteração nos limites que vão de pH 1,5 a pH 12; entretanto, o fator principal de um germe patogênico, que é a virulência, sofre alterações profundas pelas mudanças de concentrações iônicas.

Essa atenuação começa nos meios levados a pH 6. O pH mais favorável está compreendido entre 6,8 e 7,2.

A proporção ótima de glicerol vai de 2,7 a 3,2%.

A asparagina ou ácido amino-sucinâmico ( $C_4 H_8 O_3 N_2$ ), assim como o succinato de amônio, são os alimentos azotados que dão os melhores resultados.

Recorde-se, em resumo, que o alimento azotado exigido pelo germe deve ser procurado numa associação de ácidos mono-aminados (glicocola) e de ácidos di-aminados (arginina).

Para os nossos trabalhos experimentais, recorreremos aos meios de Loewenstein, Petragnani, Dubos e Long, que, na atualidade, são os mais preconizados.

## I — MEIO DE PETRAGNANI-SAENZ

1 — Misturamos, em um frasco estéril, contendo 100gr. de pérolas de vidro:

Leite de vaca frêsko .....	250cc.
Fécula de batata .....	16gr.
Asparagina .....	1,50gr.

2 — Fervemos em banho-maria durante uma hora, esperando que a mistura tome consistência de purê. Resfriamos a 56°, adicionando oito ovos inteiros e mais duas gemas.

3 — Homogeneizamos por agitação, passando, logo a seguir, através de um funil contendo gaze estéril.

4 — Adicionamos ao filtrado:

Glicerina estéril .....	24gr.
Sol. aq. verde malaquita 2% .....	15cc.

5 — Repartição em tubos, previamente esterilizados.

6 — Banho de areia a 85-88°, durante 3 dias, meia-hora por dia.

7 — Verificar a esterilidade, deixando os tubos 24-48 horas na estufa, mantendo a temperatura de 37°.

## II — MEIO DE LOEWENSTEIN:

1 — Preparar o seguinte soluto sintético:

Fosfato monopotássico .....	1gr.
Asparagina .....	3gr.
Citrato de sódio .....	1gr.
Sulfato de magnésio .....	1gr.
Glicerina neutra .....	60gr.
Água destilada .....	1 litro.

Para conservar êsse soluto sem alteração, devemos aquecê-lo a 100°, durante duas horas aproximadamente.

2 — Acrescentamos, em um balão estéril, com pérolas de vidro, contendo 300cc do soluto acima mencionado, o glicerinato de amido:

Fécula de batata .....	12gr.
Glicerina neutra .....	24gr.

3 — Agitamos essa mistura pelo espaço de vinte minutos.

4 — Durante 15 minutos aquecêmo-la a 100°, para logo após deixá-la, 45-60 minutos, na temperatura de 56-58°.

5 — Acrescentamos, tendo o cuidado da agitação permanente, logo a seguir:

8 ovos inteiros e mais 2 gemas	
Sol. aq. estéril verde malaquita a 2% ..	10 cc.

6 — Passar através de gaze estéril.

7 — Distribuir o meio em tubos estéreis, contendo cada um 5-6cc.

8 — Tindalizar a 82-87°, em banho de areia, no primeiro dia, durante meia-hora e, no segundo, pelo espaço de duas horas.

9 — Comprovar a esterilidade, deixando os tubos 24-48 horas na estufa, mantendo uma temperatura de 37°.

### III — MEIO DE DUBOS PARA PRODUTOS PATOLÓGICOS:

*Meio de base:*

Fosfato monopotássico ( $K H_2 PO_4$ ).....	1gr.
Fosfato disódico ( $Na_2 PO_4 12 H_2O$ ) .....	6,3gr.
Asparagina .....	1-2gr.

Dissolver essas substâncias a quente em 100cc de água destilada, adicionando a seguir:

Água destilada .....	850cc.
Citrato de ferro amoniacal .....	0,005-0,05gr.
Hidrolizado enzimático de caseína .....	1-2gr.
Sulfato de magnésio ( $Mg SO_4 7 H_2O$ )....	0,01gr.
Cloreto de cálcio ( $Ca Cl_2$ ) .....	0,0005gr.
Sulfato de zinco ( $Zn SO_4$ ) .....	0,0001gr.
Sulfato de cobre ( $Cu SO_4$ ) .....	0,0001gr.
(pH: 6,5 — 6,8)	

Esta é a fórmula do meio chamado *de base*, que se prepara praticamente recorrendo aos seguintes solutos:

Caseína a 5% em sol, aquoso, autoclavado (20-40 cc = 1-2gr.)
Sulfato de magnésio em água destilada a 1% — (1cc = 0,01gr.)
Cloreto de cálcio em água dest. a 0,05% — (1cc = 0,0005gr.)
Sulfato de zinco em água dest. a 0,01% — (1cc = 0,0001gr.)
Sulfato de cobre em água destilada a 0,01% (1cc = 0,0001gr.).

*Meio de Tween para cultura difusa de espécimes já isolados.*

Meio de base ..... 90cc

Tween 80 (1) ..... 0,05gr. (soluto a 10%  
conservado na geleira a menos de um mês: toma-se 0,5cc, que  
contêm 0,05gr. de Tween).

Levar ao autoclave à 120°, durante 15 minutos.

Resfriado êsse meio, adiciona-se, assèpticamente, 0,5gr.  
de albumina fração V (2) (10cc de soluto estéril a 5%).

Esterilizar essa mistura por filtração, em vela de Cham-  
berland L3 (3).

Ajuntar ainda, assèpticamente, 0,5gr. de glicose (1cc. de um  
soluto à 50% em água destilada, filtrado em vela Chamberland  
L3).

Distribuir 5cc dêste meio em tubos com 25mm de diâ-  
metro.

*Meio de albumina para isolamento do "Mycobacterium tu-  
berculosis" a partir dos produtos patológicos.*

E' um meio *utilizado em clínica.*

A asparagina é reduzida a 1 gr, assim como o hidrolizado de  
caseína. De citrato de ferro, utiliza-se somente 0,005gr por li-  
tro. O *Tween* é facultativo. A glicose é suprimida.

O pH é de 6,5.

Obtém-se assim meio líquido, que, semeado com algumas  
gôtas de produtos patológicos, fornece, por vêzes, culturas mui-  
to ricas em germes, até mesmo *em 4 dias.*

*Meio gelosado sólido:*

Solidifica-se êsse meio de Dubos, dissolvendo nêle, a quente,  
gêlose em pó (2%).

Filtrar em papel aquecido, dentro do autoclave aberto.

Aconselha-se adicionar penicilina a êsse meio para diminuir as inquinações secundárias, tendo o cuidado, porém, de substituir o *Tween* pelo complexo *ácido oleico albumina* (4), evitando assim impedimentos das culturas do germe. A dose de penicilina a empregar é de 5000 U I por 100cc de meio.

*Meio de Dubos simplificado:*

Asparagina .....	1,5gr.
Fosfato monopotássico .....	1gr.
Fosfato disódico .....	9,25gr.
Citrato de sódio .....	1,5gr.
Sulfato de magnésio .....	0,6gr.
Tween 80 .....	5cc sol. 10%
Hidrolizado de caseína .....	20cc
Água destilada q. s. p. ....	1000cc
(pH = 7-7,2)	

Após repartir êsse meio em tubos e esterilizá-lo depois no autoclave, ajuntar a fração V de albumina de boi, de forma que sua concentração final seja de 0,1 a 0,3%.

O meio sólido é obtido por ajução de gelose a 1,5%.

IV — MEIO DE LONG: (sintético).

Asparagina .....	}	ãa 5,0
Citrato de amônio .....		
Fosfato ácido de potássio .....	}	ãa 3,0
Carbonato de sódio sêco .....		
Cloreto de sódio .....		2gr.
Sulfato de magnésio .....		1gr.
Citrato de ferro amoniacal .....		0,05gr.
Glicerina .....		50gr.
Água destilada .....		1000cc.

Na prática diária o meio de Loewenstein, adicionado de verde de malaquita ou de vermelho congo, graças à ação bac-

terioestática dêsses corantes sôbre as bactérias gram positivas, as inquinações acidentais são grandemente diminuídas.

Especialistas há, que preferem o meio de Petragani com o verde de malaquita.

Os meios de batata com caldo de ovário peptonado e glicerinado permitem diferenciar o tipo bovino do tipo humano, evitando-se também as contaminações acidentais pelos germes gram positivos, recorrendo-se a adição do verde brilhante. Esta prática utilizamos para auxiliar as classificações dos diversos tipos, comparativamente, com as inoculações em coelhos e cobaias.

*Técnicas de cultura dos escarros e dos produtos orgânicos contendo flora microbiana associada ao "Mycobacterium tuberculosis:"*

Preferimos o método do ácido sulfúrico, de Saenz e Costil:

1 — Verificar a riqueza de germes de infecção secundária em lâminas com esfregaços de escarro, coradas pelo Gram ou simplesmente, pelo azul de metileno fenicado.

2 — Homogeneizar, utilizando um gral estéril, 2cc de escarro, durante 5 minutos, até apresentar aspecto homogêneo: *tempo de homogeneização é fundamental.*

3 — Adicionar 2cc de uma diluição de ácido sulfúrico a 15%, deixando-a agir 30 minutos.

4 — Juntar 2 gts. de soluto aquoso de vermelho neutro a 1% (coloração rósea) e neutralizar gôta a gôta com uma solução de soda a 30%, até a viragem ao amarelo alaranjado persistente (pH de 6,8-7,2).

5 — Semear êsse material em 6 tubos (0,5cc por tubo).

---

(1) Tween é um derivado polloxyallênico do monooleato de sorbite.

(2) Pode-se obter produto eqüivalente à fração V do sôro-albumina de boi, tratando 10cc de sôro de boi por 1,5cc de ácido clorídri-



co, até obter  $\text{pH} = 2$ . Logo a seguir aquecer a mistura a  $90^\circ$ , durante 10 minutos. Separa-se pela filtração ou ainda pelo centrifugador, o precipitado que se forma. Neutraliza-se o líquido com soluto de soda normal.

Esse líquido, centrifugado novamente, apresenta aspecto claro: pode substituir o soluto de albumina fração V, produto comercializado.

(3) Ou esterilizar pelo calor em meio ácido, adicionando 10cc de soluto de albumina a 5%, 1cc de ácido clorídrico normal, submetendo depois a mistura ao aquecimento a  $90^\circ$ , durante 10 minutos. Termina-se pela neutralização com soluto estéril de soda.

(4) Prepara-se o complexo oleico, dissolvendo 0,12cc de ácido oleico (0,1gr) em 10cc de soda N/20, agitando depois com um movimento de rotação num pequeno copo. Acrescentar 5cc desse soluto a 95cc do soluto neutro da fração V de plasma bovino a 5%, em água fisiológica a 8,5gr por litro. Esterilizar por filtração.

## CAPÍTULO IV

### INOCULAÇÕES EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

E' verdade adquirida que a verificação do poder patogênico do germe de Koch é indispensável, não só para diferenciá-los dos álcool e ácido resistentes saprófitos, como, também, para desvendar a natureza etiológica de formas clínicas diversas com escasso número de germes.

E' o que acontece em infiltrados ou em primo-infecções, em formas nodulares ou miliares.

Isso demonstra, evidentemente, o seu valor profilático e também, como teste valioso de cura da tuberculose, sem mais sintomatologia clínico-radiológica.

Recordando-se que um único micobactério virulento basta para infectar o cobaio, demonstra-se a indispensabilidade desta prova experimental para considerar a atividade da tuberculose-doença.

#### I — PRODUTOS A INOCULAR

Líquido céfalo-raquidiano e urinas, convenientemente centrifugados, fornecem sedimento que deve ser diluído em 1 a 2 cc. de água destilada esterilizada.

Uma urina suposta tuberculosa é submetida a prova da densidade e a sua diluição em água destilada deve ser controlada com o areômetro até que a mistura urina e água destilada tenha a densidade de 1001 a 1000, porque a densidade do *Mycobacterium de Koch* varia habitualmente de 1010 a 1080. A centrifugação asséptica deve durar no mínimo 30 minutos.

A mistura de éter e de ligroína, em partes iguais, é preciosa para matar as bactérias de superinfecção, tanto nos derrames

sero-fibrinosos, como nas matérias fecais. O éter mata as bactérias associadas e a camada de legroína sobrenadante, depois da centrifugação, permite verificar a presença do *Mycobacterium tuberculosis* nos esfregaços e fornecer produto para o desenvolvimento cultural. Recolhe-se o líquido pleural em tubos que contêm 2cc. da mistura de éter sulfúrico e legroína, em partes iguais, submetendo-se a mistura durante 2 minutos a agitação, para desfibrinar o derrame.

A técnica de Moreau, para pesquisa dos germes de Koch nas matérias fecais, consiste em tomar 50 grs. desse produto e diluí-las por meio de um soluto de cloreto de sódio a 25% até obter massa semiflúida num gral estéril. Filtrar depois êsse líquido e recolhê-lo em 2 tubos de centrifugação cheios até  $\frac{2}{3}$  de seu volume. Adicionar a cada tubo 2cc. da mistura; centrifugá-la, durante 10 minutos, a 4.000 voltas por minuto. Obtém-se assim um líquido que apresenta 3 camadas:

- 1 — uma pequena camada de éter sobrenadante;
- 2 — uma camada pardacenta, de 1 a 2 mm de espessura;
- 3 — uma camada aquosa contendo no fundo um coágulo.

Os germes específicos devem ser procurados na camada pardacenta, não só para prática dos esfregaços como também para as inoculações experimentais em cobaios.

Escarros, recentemente emitidos, são adicionados de penicilina ou sulfamidas, com o fim de evitar a perda de 5 a 10% dos animais inoculados, por infecções secundárias.

Convém, entretanto, lembrar que a técnica mais sensível consiste em injetar escarro da manhã, sem nenhum tratamento prévio, uma vez que o exame bacterioscópico acuse, simplesmente, germes piogênicos em pequena quantidade.

Se houver, todavia, grande número de bactérias de associação, recorre-se ainda ao tratamento pelo ácido sulfúrico, pela soda ou pela penicilina.

Os animais escolhidos devem pesar na vizinhança de 250 gr., pelo menos, para os cobaios e preás.

Se o produto fôr moderadamente infectado, faz-se inoculação subcutânea, sem nenhum tratamento prévio do material.

Há interêsse prático de injetar, simultâneamente, três cobaios, para obter aumento de resultados positivos.

Afasta-se assim ocorrências desagradáveis produzidas pela morte de cobaios, determinadas por doenças intercorrentes.

Dentro de uma a duas semanas a adenopatia inguinal correspondente à perna inoculada (face interna da coxa), evidencia-se com nitidez. Tratando-se de produto em aparência aséptico e pauci-bacilares, a injeção deve ser na cavidade peritoneal.

## II — PROVAS ALÉRGICAS

Sòmente a intradermo-reação tuberculínica pode nos dar prova etiológica acertada antes da necrópsia do animal.

Para isso, prepara-se uma diluição de tuberculina bruta ao 1/10, em água fisiológica estéril.

Injeta-se 1/10 de cc. dessa diluição ao nível da parede abdominal após depilação e desinfecção local, provocando-se assim uma ligeira pápula. No fim de 48 e 72 horas, faz-se a leitura do resultado dessa reação.

Sòmente terão valor como resultados positivos as presenças de larga zona inflamatória de infiltração, com centro hemorrágico ou necrótico, fàcilmente visíveis nas zonas brancas da pele.

Afirma-se, então, a existência de lesões tuberculosas.

Intradermo-reações negativas são interpretadas como significação de que a alergia não foi ainda instalada ou que o material injetado não continha micobactérios virulentos.

Essa prova praticada depois do 20.<sup>o</sup> dia é segura, sensível e rápida, confirmando então a etiologia do aparecimento nodular no ponto de inoculação ao 10.<sup>o</sup> dia e da adenopatia dura

satélite, no final da segunda semana, antes da morte do animal, que habitualmente ocorre num prazo variável de 50 a 70 dias.

Controlar a temperatura retal do cobaio, que pode subir 0,5 a 1.º, a partir das 48 horas que seguem a execução da prova intradérmica.

Dentro das primeiras 24 horas, nota-se infiltração edematosa, branco-rósea, com 12 a 20 mm. de diâmetro.

A reação atinge o seu máximo em 36 horas, para diminuir em seguida progressivamente.

A temperatura média retal dos cobaios nas experiências de Charles Richet é de 39º, 2, ao passo que nos coelhos é de 39º, 5 e nas galinhas de 42º, 5.

A reação de escolha para os coelhos inoculados com material tuberculoso é a oftalmo-reação com tuberculina bruta levada à pálpebra superior do olho do animal com auxílio de um pincel.

Dentro de 5 a 6 horas, observa-se vermelhidão conjuntival seguida de lacrimejamento e, depois de 24 horas, serosidade turva que se acumula no fundo de saco conjuntival.

Tanto a intradermo-reação no cobaio como a oftalmo-reação no coelho podem ser repetidas, no fim de 7 a 8 dias, praticando-se a primeira, no outro lado do abdômen e a segunda, no outro olho. Esta segunda reação positiva é conhecida como *reativação da prova tuberculínica*.

Nas provas experimentais destinadas a investigar os tipos de micobactério tuberculoso, escolhem-se 3 cobaios, 3 coelhos e 3 galinhas, não esquecendo de pesar êsses animais antes de utilizá-los, assim como de fazer a verificação da temperatura de cada um dêles.

Quanto às vias de inoculação do material infectante, recorre-se à via intravenosa nos coelhos (veia marginal da orelha), à via subcutânea na face interna da coxa nos cobaios e, nas galinhas, à veia marginal axilar ou mais simplesmente nos músculos peitorais. Em todos êsses animais injeta-se 2cc. de uma diluição com 0,01 miligr. de micobactérios.

A evolução clínica da tuberculose nesses animais, produzida pelos diversos tipos micobacterianos, pode ser assim esquematzada:

1 — o tipo aviário mata o coelho em 15 a 20 dias pela produção de uma tuberculose de forma septicêmica (tuberculose do tipo Yersin). A necrópsia permite verificar congestão pulmonar, hipertrofias esplênica e hepática, sem a presença de tubérculos. Os esfregaços dêsses órgãos viscerais são riquíssimos em bacilos álcool e ácido-resistentes.

2 — o tipo bovino mata o coelho entre 30 a 60 dias, revelando a necrópsia numerosas adenopatias superficiais axilares, précurrais, com lesões viscerais difusas mais pronunciadas nos pulmões.

3 — o tipo humano habitualmente não mata os coelhos nos dois primeiros meses. Sacrificado o animal, vêem-se raras lesões regressivas estritamente pulmonares e renais, sem adenopatias macroscópicas.

No cobaio a marcha da doença produzida pelo tipo humano segue uma evolução progressiva que assim pode ser resumida: invasão dos gânglios satélites inguinais, gânglios do lado oposto, baço, fígado, gânglios viscerais e, depois do segundo mês, infecções dos gânglios tráqueo-brônquicos e dos pulmões.

O fígado e o baço, muito hipertrofiados, apresentam tubérculos caseosos e gânglios amarelos mais recentes.

Nos pulmões, nas serosas e nos rins, notam-se finas granações miliares.

Nos gânglios linfáticos, próximos do ponto da inoculação, vê-se produto caseoso.

Em princípio, pode-se dizer que o coelho é mais sensível ao *Mycobacterium* tipo bovino, ao passo que as galinhas são refratárias aos tipos humano e bovino.

Se o material inoculado em animais fôr muito pobre em germes, ou se os animais morrerem prematuramente com lesões mínimas ou não características (hipertrofia leve dos gânglios

lombares, inguinais e do baço), é indispensável reinocular os triturados desses tecidos.

Convém também semeá-los nos meios especiais.

Nunca afirmar todavia a existência da tuberculose sem a evidenciação de germes álcool e ácido-resistentes ou de microrganismos fluorescentes em esfregaços de gânglios ou de órgãos ou ainda pela cultura.

Quando se fizer a inoculação intraperitoneal é indispensável examinar cuidadosamente o mesentério e o grande epíloon.

A desigualdade das respostas dos diferentes cobaios necessita que se compare, em certos casos, séries de animais inoculados, para tirar conclusões irrefutáveis.

Isso com fim especial de eliminar causas de erro no diagnóstico da tuberculose experimental.

Não se esqueça, assim, que há uma *pseudo-tuberculose* do cobaio, revelada por granulações epiplóicas, pelas hipertrofias esplênica e hepática, com nódulos brancos salientes, acompanhados de gânglios mesentéricos supurados e até mesmo de nódulos pulmonares.

Sòmente o exame microscópico permite achado precioso: presença de bacilo imóvel, gram-negativo, de granulação bipolar, de crescimento fácil nos meios usuais, sem atacar, entretanto, a gelatina ordinária.

Pelo método de Ziehl Neelsen verifica-se a ausência dos microrganismos de Koch.

Adenites cervicais supuradas produzidas quer pelos germes piogênicos banais, quer ainda por estreptobacilos anaeróbios, gram negativos, são afastados pelos exames bacterioscópicos da rotina. Lembre-se ainda a *coccidiose* do cobaio acompanhada de nódulos hepáticos.

Nos cobaios novos verificou-se a presença de bacilos ácido-resistentes saprófitos no baço, que não determinam nenhuma lesão aparente nesses animais. São germes muito próximos dos bacilos aviários ou para-tuberculosos.

Quanto à tuberculose espontânea do cobaio, que pode apa-

recer depois de um contato de cêrca de 6 meses com cobaios tuberculosos, não se manifesta por sintomas aparentes mesmo depois de um ano.

A necrópsia revela grandes nódulos pulmonares ou mesmo cavernas, hipertrofia dos gânglios tráqueo-brônquicos e outras adenopatias mais ou menos generalizadas.

A adenopatia regional caseosa e a evidência de bacilos álcool e ácido-resistentes, com propriedades fluorescentes nos esfregaços permite afirmar, com segurança, a tuberculose experimental.

As moléstias espontâneas dos cobaios, provocadas por um pneumococo ou por um paratífico B, são fâcilmente afastadas pelos exames dos esfregaços viscerais.

A inoculação do coelho é sòmente usada em pneumologia, para diferenciação dos tipos humanos e bovino.

De grande valor epidemiológico da tuberculose é a determinação dos dois tipos do *Mycobacterium de Koch* responsáveis pela infecção, o tipo humano e o tipo bovino.

O aspecto morfológico das colônias e a verificação da virulência dos espécimes em coelhos e cobaios permite determinar a classificação segura.

No tipo humano as colônias no meio de Loewenstein são eugônicas e pigmentadas, ao passo que, as do tipo bovino, são disgônicas e não pigmentadas.

Quanto à virulência, a inoculação de 1/100 de miligrama de germe tipo humano não determina tuberculose no coelho pela inoculação intravenosa.

Até a inoculação de 1 miligrama dêsse germe, nas mesmas condições experimentais, produz raros abscessos em regressão nos rins e nos pulmões.

No cobaio, por via parenteral, observa-se a tuberculose generalizada ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  mgr.).

No tipo bovino é habitual a verificação da tuberculose generalizada do coelho com a dose de 1/100 de miligrama, por via intravenosa.



Se a dose fôr aumentada para 1 miligrama, observa-se com segurança a tuberculose aguda generalizada.

No cobaio,  $10^{-6}$  miligráma, por via parenteral, origina também tuberculose generalizada.

Convém, entretanto, lembrar que Schaeffer, demonstrou que o tipo bovino possui antígeno proteínico específico para êste tipo, enquanto que o tipo humano, não contendo nenhum antígeno específico próprio, levou êsse pesquisador a opinar que o tipo humano é talvez uma variante do tipo bovino que perdeu seu antígeno específico.

Descreveu-se também, ultimamente, o tipo murino do micobactério tuberculoso (1937).

Charles Elton, da Universidade de Oxford, estudou o *Mycobacterium tuberculosis var. muris*, nos roedores (*Microtus agrestis*), nas Ilhas Britânicas.

Para o isolamento dêsse germe os meios de cultura não devem conter glicerina.

O meio de Dorset com ôvo é o mais conveniente.

No meio sintético de Dubos a turvação é menos abundante do que as produzidas pelos tipos humano e bovino.

E' patogênico, em pequena dose, para os roedores.

O hamster é sensível a infecção, quer por via subcutânea quer ainda pela absorção por via oral.

Wells (Oxford) pensou utilizar o bacilo tuberculoso tipo murino como agente imunizante nas condições experimentais do B. C. G.

Mencionam-se trabalhos de Griffith, Dahling, Young e Paterson sôbre a vacinação de bovinos com o tipo murino.

Griffith e Dahling, vão mais longe, ao concluir que os resultados obtidos superam aos da calmetização (B. C. G.).

## SEGUNDA PARTE

### CAPÍTULO V

#### CONTRIBUIÇÃO EXPERIMENTAL

Na prática laboratorial realizada no Hospital-Sanatório Belém e no Instituto Pereira Filho, com o fim de precisar diagnósticos ou de comprovar curas de doentes pelos diversos tratamentos médicos ou cirúrgicos, seguimos os principais métodos aconselhados na atualidade.

Boa prática julgamos ser o aquecimento prévio dos escarros submetidos a exame, ao autoclave a 100°, durante 30 minutos, para se conseguir a inocuidade dos escarros e também a sua homogeneização. Esse material assim tratado presta-se unicamente aos exames do primeiro turno laboratorial: bacterioscopia direta, bacterioscopia indireta e exames ao microscópio de fluorescência.

Ao fazermos o exame bacterioscópico, não se esqueceu a necessidade da riqueza considerável de micobactérias necessária para conseguir-se achado positivo. Não havendo mais de 100.000 germes por cm<sup>3</sup>, conforme afirmam Corper e Cohn (1933), são de extrema freqüência os resultados negativos. Donde se pode deduzir que a pesquisa bacterioscópica realizada em muitas lâminas é exaustiva e muitas vezes de resultados discordantes da clínica e é por isso que os pesquisadores americanos insistem sobre a necessidade de indicar o processo empregado quando se conclui pela negatividade micobacteriana dos escarros.

A homogeneização do material a examinar e a concentração dos germes, seja pela centrifugação seja ainda pela flutuação, marca evidentemente sensível progresso sobre os métodos de bacterioscopia direta.

Inúmeros são os processos propostos para facilitar a visibilidade do *Mycobacterium tuberculosis*, sem que se tenha alcançado a perfeição desejada. Ainda mais, nunca se deve esquecer a possível eliminação intermitente desses microrganismos.

Dos vários processos de homogeneização conhecidos, tais como o método de Petroff (antiformina), o de Papacostas e Gaté (água de javel), preferimos nas nossas investigações a técnica simples de Bezançon e Philibert.

Tôdas as vêzes que o exame bacterioscópico positivo concorda com a clínica, essa prova é considerada definitiva.

Havendo, porém, discordância dêsse exame com os sinais clínico-radiológicos, recorre-se as provas culturais e também as inoculações em cobaios.

Nos casos de insuficiência ou ausência de escarro, praticou-se o lavado gástrico, com o auxílio de uma seringa de 100 cc, provida de sonda duodenal tipo Escudero, cujo calibre e orifícios dão passagem fácil às mucosidades.

Com a seringa cuidadosamente esterilizada, injeta-se no estômago sôro fisiológico (100 cc) e aspira-se, a seguir, êsse material a examinar.

O líquido aspirado sofreu sempre agitação durante 15 minutos em frasco estéril com pérolas de vidro.

Centrifugou-se 20 cc dêsse homogeneizado, demoradamente (2.000 voltas por minuto, durante meia-hora).

O sedimento assim obtido submeteu-se, sucessivamente, a bacterioscopia, culturas e inoculações em cobaios, por via subcutânea, na face interna da coxa.

De 1945 a 1950 praticámos, nos doentes do Hospital-Sanatório Belém, 155 exames de lavado gástrico.

Quanto ao emprêgo do lavado gástrico na tisiologia do adulto verificámos não ser tão corrente êsse recurso laboratorial como em tuberculose infantil. É por isso, que na rotina laboratorial do Hospital-Sanatório Belém, com uma população de 520 a 550 doentes, os lavados gástricos foram realizados sòmente

em determinados enfermos, pela dificuldade de seu emprêgo de maneira repetida em outros casos.

A tubagem gástrica em jejum, entretanto, forneceu excelente resultado em alguns doentes, que não eliminavam escarro em quantidade necessária aos diversos exames.

Num total de 42 casos de doentes aparentemente curados no sentido clínico-radiológico, empregou-se a técnica do lavado-brônquico proposta em setembro de 1944, pelos cientistas nacionais, Manuel de Abreu e Fontes Magarão.

Utilizou-se também em diversos casos a técnica seguida no Hospital Pedro de Almeida Magalhães, que realiza a lavagem brônquica pela via infra-cricoidéa.

Foram de observação corrente, reações discretas, tais como, dores torácicas, astenia, cefaléia, coriza e ascensão térmica, lembrando o conjunto, por vêzes, a síndrome gripal, de maior ou menor gravidade.

Os métodos de exame do lavado brônquico foram inteiramente iguais aos indicados para as pesquisas micobacterianas no lavado gástrico.

Técnica aceita facilmente pelo enfermo e de realização simples para o médico, é o esfregaço laringo-faríngeo, realizado com tampões de algodão, usados para o diagnóstico da difteria.

Essa *extensão laringéa*, isto é, a colheita de secreções bronco-pulmonares ao nível do orifício superior da laringe é usada ainda para estudar pacientes considerados abacilíferos por outros processos.

Tenta-se atingir a região da epiglote mais profundamente possível. Imerge-se êsse material, após vários toques faringo-laríngeos em 10 cc de soluto de lexívia de soda a 4% e leva-se a estufa a 37°, durante 24 horas.

Essas secreções laringéas assim obtidas são tratadas a seguir como se aconselhou para os escarros.

Êsse método complementar é realmente precioso pelo fato de poder ser renovado várias vêzes, tanto nas crianças como nos adultos.

Tais exsudatos, laringo-faríngeos, prestam-se particularmente para os exames culturais.

Casos há que se recorreu a broncoscopia para a colheita de secreções que foram tratadas pelos métodos já mencionados.

Em alguns doentes sem lesões radiològicamente perceptíveis põem-se em evidência micobactérios pela cultura: são os tuberculosos inaparentes ou casos de tuberculose oculta, de expectoração bacilífera no denominar de Bezançon, Braun e Meyer.

Na prática da broncoscopia identificam-se formas brônquicas puras de tuberculose, invisíveis pela tele-radiografia, tanto de frente como de perfil.

Casos outros, são revelados sòmente pela planigrafia.

Nas supurações pulmonares é freqüente a presença dos micobactérios de Koch e mais ainda germes de associação.

No sangue das hemoptises verificamos germes de Koch quer pelos processos de bacterioscopia indireta quer ainda pelas inoculações em cobaios.

Ao lado da pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* pela bacterioscopia direta demorada foi sempre útil averiguar a presença possível de fibras elásticas nos 'escarros, indicadoras de processos destrutivos do parênquima ou antes mesênquima pulmonar. Se elas não são patognomônicas pelo fato de comprovar-se em outros processos infecciosos (abcessos, gangrena, entre outros) a sua investigação foi sempre de utilidade incontestante.

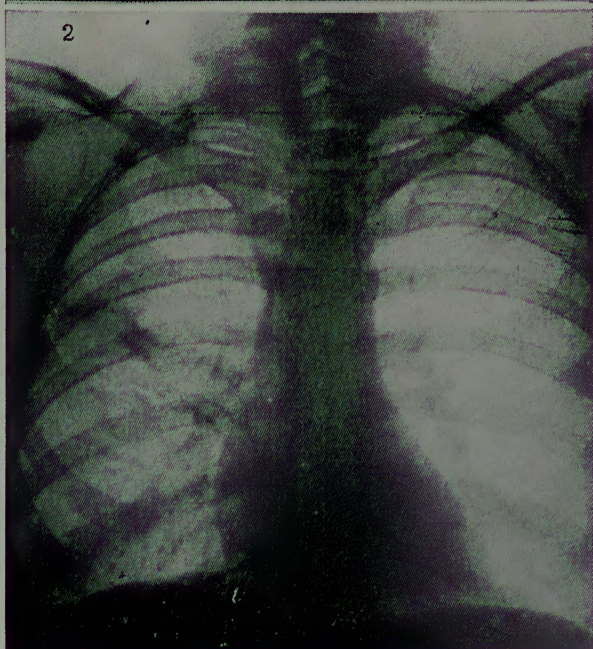
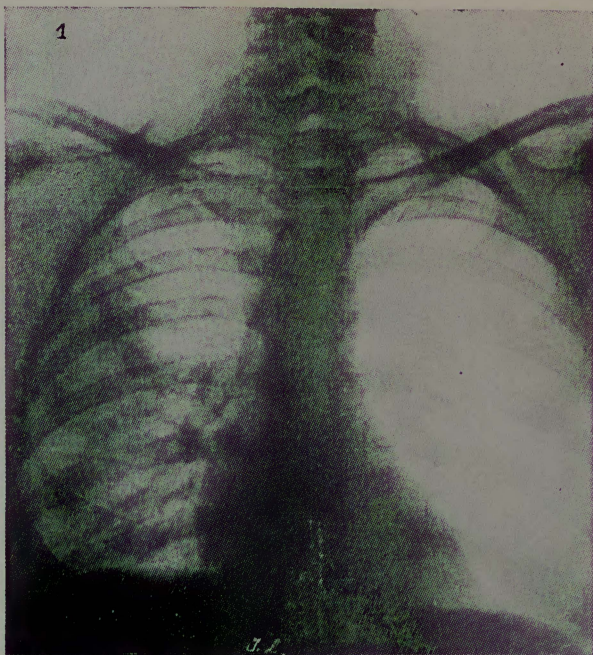
Sòmente o germe é o achado de certeza.

Veja-se êle sôbre a forma homogênea ou sôbre forma granulosa com zonas vermelhas e claras, alternativamente situadas, sem nunca formar cadeias nos esfregaços corados pelo clássico processo de Ziehl Neelsen.

Radiografias duvidosas com imagens anormais por vêzes traduzem lesões de etiologia diversa.

As radiografias da doente I. L., recolhida ao Hospital Sanatório Belém, são bastante elucidativas.

A primeira delas demonstrou a existência de: "sombra de



RADIOGRAFIAS (caso I. L.)

1. — (23.X.1950) — Sombra de aspecto congestivo no t<sup>o</sup>erço m<sup>o</sup>dio e base do pulmão D. Campo pulmonar E com transparência conservada. Hilos ligeiramente aumentados.
2. — (27.X.1950) — Desaparecimento da sombra de aspecto congestivo no campo pulmonar D, restando, no seu t<sup>o</sup>erço m<sup>o</sup>dio, sombra de aspecto pleural, resultante da congestão anteriormente verificada. Campo pulmonar E com o mesmo aspecto da radiografia anterior. Hilos normalizados.

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA





LÚPUS TUBERCULOSO DO NARIZ

Exame cultural positivo em meio de Loewenstein

(MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS)

(Tratamento pela Vitamina D<sub>2</sub> — Método de Charpy)

aspecto congestivo no 1/3 médio e base do pulmão D; campo pulmonar E com transparência conservada; hilos ligeiramente aumentados.”

Submetida a doente ao tratamento pela penicilina, na dose de 400.000 UI, em 24 horas, durante 4 dias, a segunda radiografia, feita após êsse tempo, apresentou modificações notáveis que afastaram por completo a suspeita de um processo pulmonar tuberculoso; isto foi confirmado pelas pesquisas direta e indireta negativas do agente específico.

Esse caso indica que se deve ter prudência nas interpretações radiográficas de infecções agudas febris de localização pulmonar, não acompanhadas de achados do germe de Koch.

Releva ainda salientar outro caso clínico de importância diagnóstica laboratorial: a doente M. E., branca, solteira, 20 anos, de Cachoeira do Sul, recolhida ao Hospital Sanatório Belém (mátricula 3.355 — 1945), apresentava lesão ulcerosa no nariz com bordos salientes e fundo granuloso. A secreção era abundante; adenopatias submaxilares. Pesquisas laboratoriais destinadas a verificar a presença de leishmanias ou de esporótricos de Schenck resultaram negativas, tanto pelos processos diretos como pelas provas culturais.

Também foi negativa a reação de Kahn sensibilizado: apesar disso, instituiu-se medicação bismútica sem nenhum resultado.

Semeado o material retirado da úlcera em meio de Loewenstein observou-se o desenvolvimento de cultura com aspecto típico do *Mycobacterium tuberculosis* — tipo humano no fim de 35 dias.

Aconselhou-se então, de acôrdo com o método de Charpy, o tratamento pela Vitamina D<sub>2</sub> que foi administrada na dose total de 14.400.000 UI até a cicatrização completa da lesão lúpica.

Esta doente apresentava quadro pulmonar bastante grave. Tratava-se de uma lobite esvacada superior E e enfisema da base do mesmo lado, submetida ao tratamento pneumotórax, em regime sanatorial.



Esta observação demonstra, de uma maneira irrefutável, o valor do processo cultural de investigação do *Mycobacterium tuberculosis*, em uma lesão facilmente confundida com a leishmaniose tegumentar, com a sífilis ou com a esporotricose ulcerosas.

Queremos ainda da casuística do Hospital Sanatório Belém retirar a observação n.º 4.000, Assis O. F., de côr mista, com 18 anos de idade, residente no Passo da Mangueira.

Lesões de escrofuloderma assestadas no pescoço e na parede anterior do tórax forneceram material para investigações de fungos e de micobactérias tuberculosas, em especial para a microscopia direta e ainda para as provas culturais em meio de Sabouraud e no cultivo de Loewenstein.

As pesquisas diretas de ácido resistentes do pus de lesões ainda fechadas resultaram inteiramente negativas, assim como as sementeiras dêsse material em meio de Sabouraud.

Quanto a sementeira do material em meio de Loewenstein patenteou-se no fim de 16 dias desenvolvimento cultural em microculturas constituídas por bastonetes curtos, homogêneos e ácido-álcool resistentes.

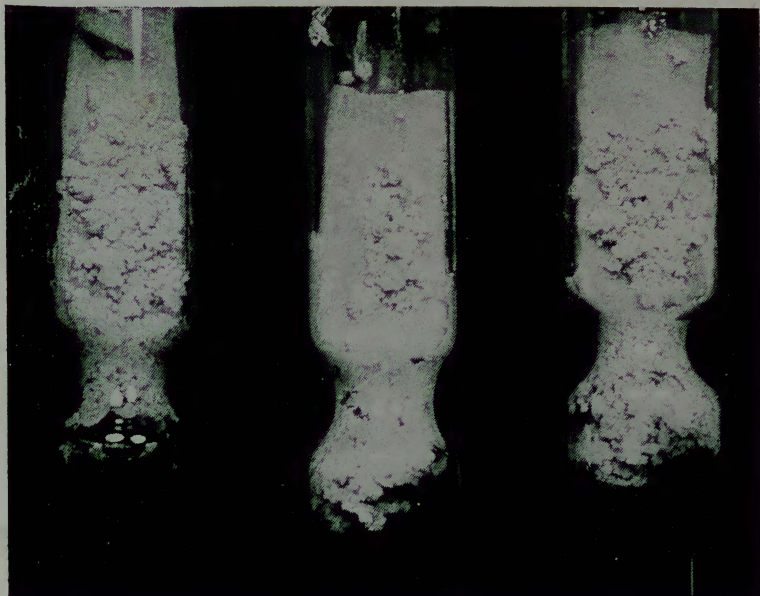
Estudos posteriores dêsse espécime isolado sôbre a batata com caldo de ovário e também sôbre palha impregnada de caldo glicerinado a 4% facilitou a identificação rigorosa do tipo micobacteriano.

Outra pesquisa laboratorial confirmadora das investigações anteriores foi a inoculação em 3 coelhos, por via intravenosa (veia marginal da orelha), 0,20 gr. da cultura em caldo glicosado. Morte dos animais com volumosas adenopatias generalizadas e pesquisa de ácido-álcool resistentes positivos. Êsses animais morreram num período variável de 20 a 35 dias.

## MÉTODOS DE COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS

No preparo dos esfregaços houve a preocupação de fazê-los sempre espessos ou em gôta grossa.

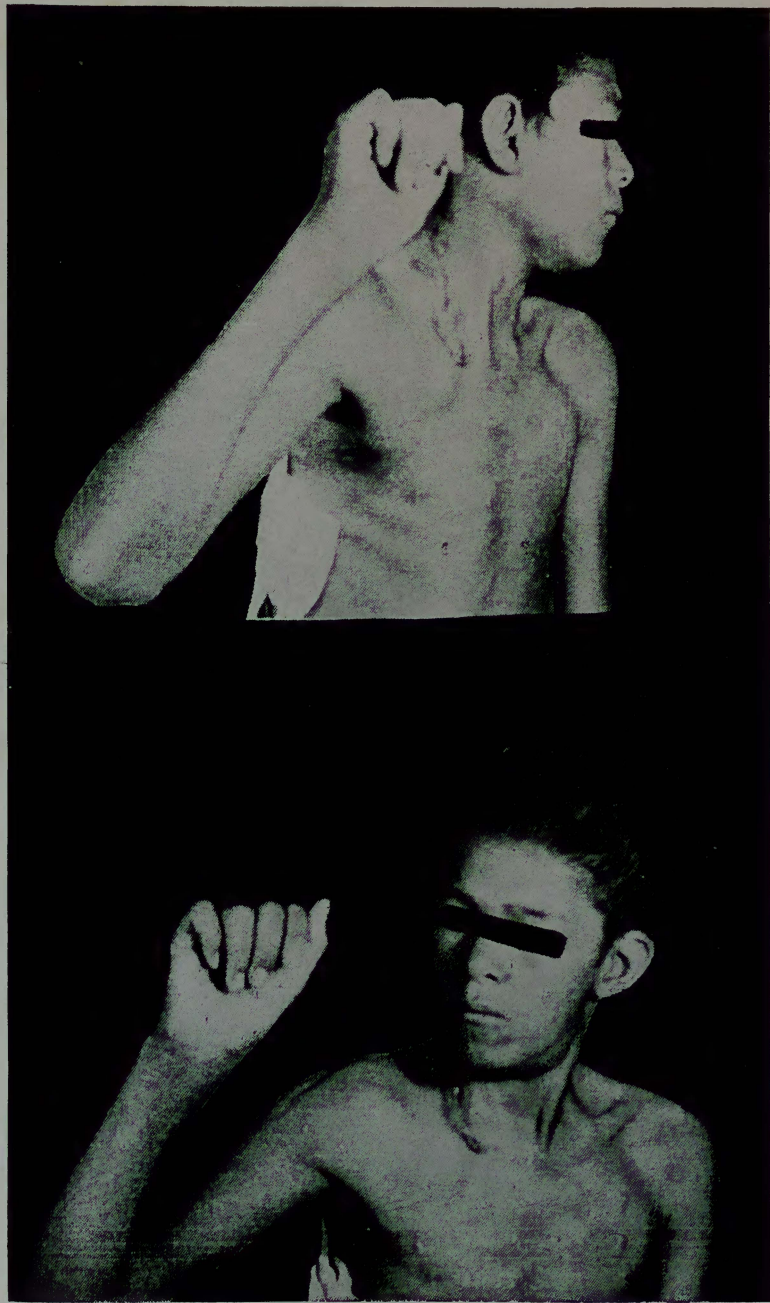
ESTAMPA



BATATA-CALDO GLICERINADO (4%)

Culturas do tipo bovino, isoladas do doente Assis (Hospital  
Sanatório Belém)

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA



Caso de tuberculose ganglionar — Isolamento do tipo bovino  
(Doente Assis, do Hospital-Sanatório Belém)



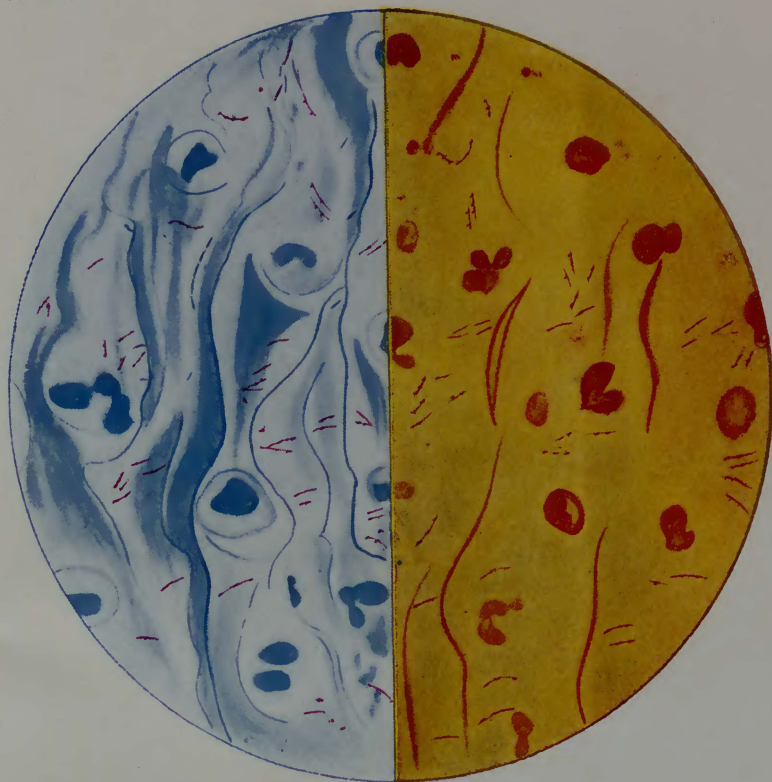
MÉTODOS DE COOPER

1. — *Fucsina fenicada* recente (100 cc.) + cc. de soluto de cloreto de sódio a 10 %.
2. — Aquecer até desprendimento de vapores (4').
3. — Deixar resfriar (precipitação).
4. — Descorar no álcool-ácido (5 % de ácido azótico).
5. — Lavar no álcool a 95° (2').
6. — Lavar nágua corrente.
7. — Corar com sol. aquoso de verde brilhante (0,10 de soda + 1,0 do corante) por %.
8. — Lavar nágua. Secar.

MÉTODOS DE ARENA

1. — Coloração, a quente, com *reativo de Ziehl* e sol. aquoso de cloreto de sódio a 10 % (33 gôtas de Ziehl e 3 ou 4 sol. cloruretado).
2. — Lavar nágua.
3. — Descorar com sol. hidro-alcóolico de cloreto de sódio:
 

Cloreto de sódio.....	4,0
Água desti. ....	100 cc.
Álcool a 95°.....	100 cc.
4. — Lavar nágua.
5. — Coloração de fundo com sol. de amarelo de metila a 1/1000.



MÉTODO DE FONTES

1. — Coroar, a quente, pela *fucsina fenicada de Ziehl* (cêrca de 2').
2. — Lavar nágua.
3. — Corar pelo *crystal-violeta fenicado* ou pelo *violeta de genciana fenicada* (durante 2').
4. — Tratar pelo *Soluto de Lugol*.
5. — Descorar pela mistura de *álcool-acetona*: álcool absoluto duas partes e acetona uma parte.
6. — Lavar.
7. — Corar — azul de metileno a 2% (sol. aquoso).
8. — Lavar e secar.

MÉTODO DE PEREIRA FILHO

1. — Corar, a quente, pela *fucsina fenicada de Ziehl* (cêrca de 10').
2. — Lavar nágua.
3. — Descorar no *ácido azótico ao têrço* (100 cc. de ácido azótico puro + 200 cc. de água destilada) — até conseguir alguns esfregaços com muito leve matiz róseo.
4. — Lavar nágua.
5. — Tratar pelo *soluto alcóólico de uranin* a 2% — 5'.
6. — Lavar nágua.
7. — Secar (papel de filtro e calor).

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA





MÉTODO DE ZIEHL-NEELENSEN

1. — Corar, a quente, pela fucsina fenicada de Ziehl (10').
2. — Lavar nágua.
3. — Descorar com ácido nítrico ao terço — (2') até obter esfregaço com leve matiz róseo.
4. — Lavar nágua.
5. — Descorar com álcool a 90° (5').
6. — Lavar nágua.
7. — Corar o fundo com sol. aquoso de azul de metileno a 2% (2') ou pelo reativo de Löffler.

MÉTODO DE BLANCO

1. — Corar, a quente, pela fucsina fenicada de Ziehl (5').
2. — Descorar pelo álcool clorídrico de Ellbner-Gunther:
 

Ácido clorídrico .....	3 cc.
Álcool abs. ....	97 cc.

 até a côr levemente rósea do esfregaço.
3. — Lavar nágua.
4. — Tratar pelo sol. aquoso de tropeolina 000 n.º 1 a 1%, durante 2' a 5'.
5. — Lavar nágua.
6. — Secar (papel filtro e calor).

Quanto aos métodos de coloração, preferimos os de Ziehl Neelsen, Cooper, Fontes, Pereira Filho e Blanco; por vêzes, empregou-se a técnica de Arena que descora o esfregaço por um soluto hidroalcoólico de cloreto de sódio.

*Granulações* — As granulações de Much (1907), são achadas no pus de abscessos frios, bem como nos nódulos da tuberculose bovina e noutros produtos tuberculosos.

É habitual também a observação de germes sem ou com grânulos negros, coráveis pelo método de Ziehl Neelsen, sem a combinação tintorial de Fontes.

É isso que nos leva a propor nos moldes das classificações de Gaffky e de Pereira Filho, usadas para contagem dos micobactérios, um processo de enumerar a riqueza dos germes tuberculosos em grânulos negros; assim diremos:

Micobactérios sem grânulos negros ..... TIPO I  
Micobactérios com um único grânulo negro ..... TIPO II  
Micobactérios com 2 ou 3 grânulos negros ..... TIPO III  
Micobactérios com grânulos negros em rosário .... TIPO IV  
Grânulos negros isolados ou grânulos negros com  
micobactérios quase desaparecidos ..... TIPO V

Gerhard Domagk, outubro de 1949, estudando a ação do Tbl (4-acetilaminobenzaldeído tiosemicarbazone), sôbre o crescimento do germe da tuberculose, verificou alterações morfológicas dêsse germe, assim como diferenças de tamanhos e desintegração granular, até a estrutura em forma de cocos. Notou, além disso, mudanças nas propriedades tintoriais: perde o micobactério a capacidade de corar-se pelo método de Ziehl Neelsen e também pelo processo de Gram. Sômente a microscopia fluorescente permite desvendar a presença de germes.

Essa documentação tão interessante do famoso descobridor das sulfas, confirma em tôda a plenitude os trabalhos de Oscar Pereira divulgados em conferências na Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre (fevereiro, 1948) e no Quarto Congresso Brasileiro de Tuberculose (Recife, novembro de 1948) com o complexo antagonico de germe isolado da terra: *as mes-*

mas transformações morfológicas, iguais alterações, identidade de desintegração granular e mudanças das dimensões dos germes.

Embora alguns tisiólogos não concordem ainda que as variantes morfológicas do germe, quando estudadas convenientemente, possam fornecer dados interessantes na evolução e prognóstico da tuberculose, Piery julga acertado que as formas homogêneas correspondem às lesões leves, ao passo que elementos largos moniliformes são próprios dos surtos graves.

Também em relação a quantidade de germes por campo microscópico deve-se atribuir limitado valor, mesmo utilizando as classificações de Gaffky ou de Matson.

Limitamo-nos aos qualificativos habituais: numerosíssimos, muitos, regular quantidade, vários, alguns e raros germes por campo microscópico. Evidentemente, se a quantidade de germes não expressa estritamente a atividade e evolução das lesões o mesmo não acontece sob o ponto de vista profilático; o contágio deve ser mais fácil quando o número de germes fôr considerável, respeitadas, todavia, as condições de virulência.

## CULTURAS

Nos processos de cultura há dois pontos essenciais:

1) a libertação prévia dos micróbios associados sem alterar a vitalidade do *Mycobacterium tuberculosis*.

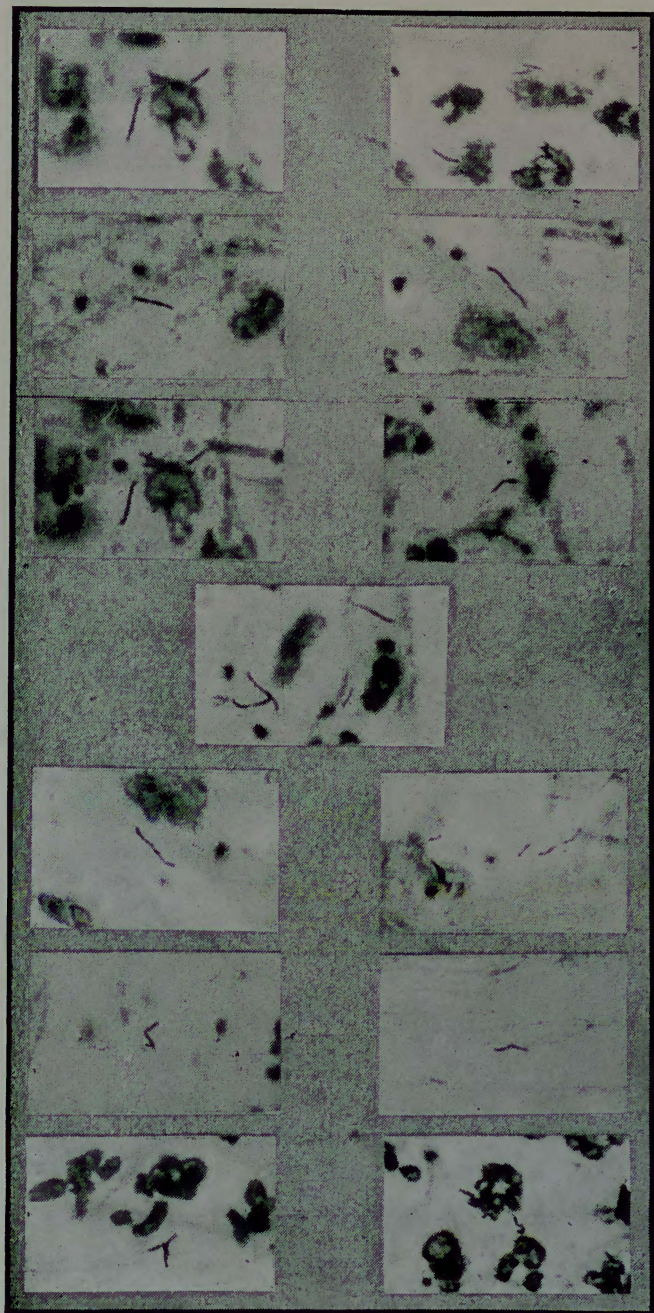
2) dissociar das malhas muco-purulentas do escarro numular o agente da tuberculose.

Além da técnica de Saenz e Costil de uso freqüente nas nossas pesquisas, algumas vêzes recorreremos a técnica de Bezançon, Braun e Meyer, que consiste em tomar 2 cc. da parte mais purulenta do escarro, que se dilui a seguir em 12 - 15 cc. de soluto de lexívia de soda a 4%.

Obtida a homogeneização dêsse produto na estufa a 37°, durante 24 horas, recorre-se a centrifugação durante uma hora, atingindo-se 6.000 voltas por minuto.

O sedimento obtido é adicionado de soluto de ácido clorí-



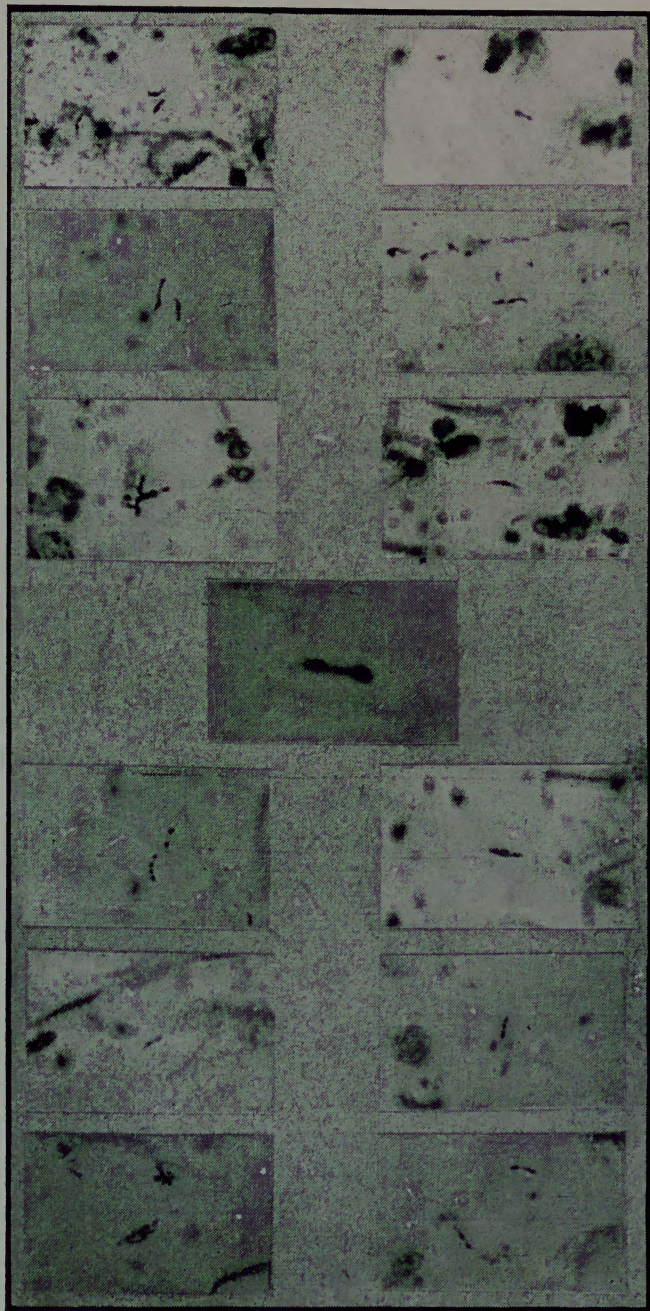


*Escarro.* — Método de Ziehl Neelsen

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

(exemplares sem granulos negros) — (Obj. im. 1/12 —  
Ocular 10 x)

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA



*Escarro.* — Método de Ziehl Neelsen

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

(exemplares com granulos negros) — (Obj. im. 1/12 —  
Ocular 10 x)

Microfotografia central — muito ampliada

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**



drico a 4% até obter pH favorável (neutralidade ao vermelho de fenol).

Semeia-se êsse material assim preparado em 12 tubos de cultura de 15 cc. de comprimento e 15 mm. de diâmetro.

Quando empregámos líquido pleural, líquido peritonal ou líquido céfalo-raquidiano, fez-se primeiro atuar o ácido clorídrico e depois a alcalinização secundária de acôrdo com a variante indicada por Saenz.

O meio de Petragnani, ligeiramente modificado por Bezanson, Braun e Meyer, que contém fécula de batata, peptonas e leite, com pH oscilando entre 6,8 a 7,2 dá resultados bastante apreciáveis.

De acôrdo com Saenz e Costil, visando incurrir o prazo de espera para o desenvolvimento cultural, procurámos microcolônias de germes ácido-resistentes no fim da primeira semana, pela raspagem da cultura, com o fim especial de recolher esfregaços para exame.

Os característicos culturais são muito importantes. De modo geral os germes paratuberculosos são cromogênicos indo do amarelo-laranja ao vermelho-tijolo intenso.

Todavia convém acentuar que há isolamento de germes paratuberculosos apresentando matiz cinzento-amarelado, inteiramente comparável aos que apresentam as culturas dos micobactérios virulentos.

Todos os autores estão de acôrdo em afirmar que nunca isolaram *Mycobacterium tuberculosis* possuindo poder cromogênico.

Semeaduras repetidas, em meios culturais, de amostras virulentas, apresentam certa pigmentação sem, entretanto, atingir a coloração dos paratuberculosos típicos.

Convém salientar ainda que os germes paratuberculosos exigem nutrição escassa para rapidez de seu crescimento.

Culturas com o fim de classificar os dois tipos de *Mycobacterium tuberculosis* mais encontrados nas infecções humanas,

foram feitas sôbre palha de milho, impregnadas com diversos meios culturais glicerinados (5%).

Utilizou-se a mesma técnica empregada para o preparo do caldo simples unicamente substituindo da carne, na mesma proporção pelo fígado, pâncreas, ovário, testículo, coração e hipófise-ovário. O meio de Sabouraud glicosado foi também usado com o mesmo fim.

A placenta humana foi ainda empregada para a obtenção dêsses caldos destinados a impregnar palhas de milho.

Nesse meio as diferenças de crescimento dos três tipos de *Mycobacterium tuberculosis* são notórias. O tipo aviário forma sôbre a palha camada esbranquiçada, úmida, acompanhada da formação de um véu sôbre a superfície líquida. O tipo Ratti origina granulações salientes, sêcas, ao passo que o tipo Vallée apenas cresce sôbre a palha, onde forma pequenas granulações sêcas, de desenvolvimento escasso.

No meio de Sabouraud glicosado a 2%, o tipo aviário desenvolve-se abundantemente em camada úmida. Quanto ao tipo Ratti, o seu crescimento é apenas visível. O tipo Vallée forma granulações sêcas, isoladas sôbre a palha: *crescimento mais abundante do que o tipo Ratti.*

As diferenças entre os tipos aviário e humano já se podem observar nas culturas em palhas impregnadas pelo caldo de carne glicosado a 5%: no tipo aviário a cultura é cremosa e forma véu abundantíssimo na superfície do meio líquido; no tipo humano, a cultura é luxuriante e granulosa, sêca, apresentando aspecto cerebriforme.

### INOCULAÇÕES:

Julgamos sempre acertado afirmar que em nenhum dos casos ainda duvidosos devemos desprezar a inoculação em co-baio que permite demonstrar a virulência do germe e assim sua identificação de maneira completa.

*É, além disso, o processo mais sensível na investigação do agente da tuberculose.*

ESTAMPA



1.

2.

3.

**MEIO DE LOEWENSTEIN**

(Tipo humano)

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**

E S T A M P A



1.

2.

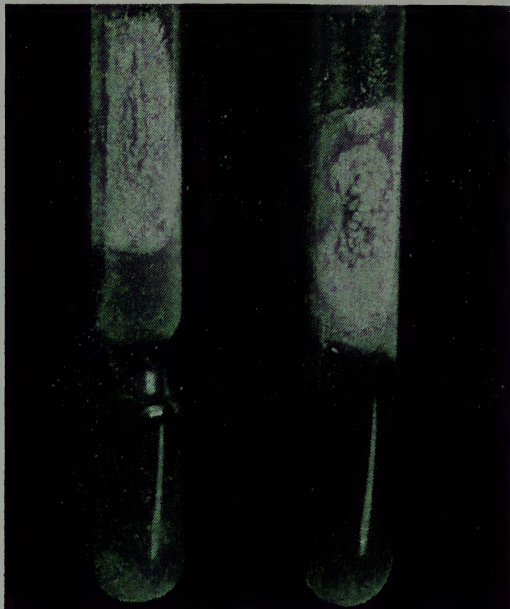
3.

**MEIO DE LOEWENSTEIN**

1. — Tipo aviário
2. — Tipo humano
3. — Tipo bovino

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**

ESTAMPA



1.

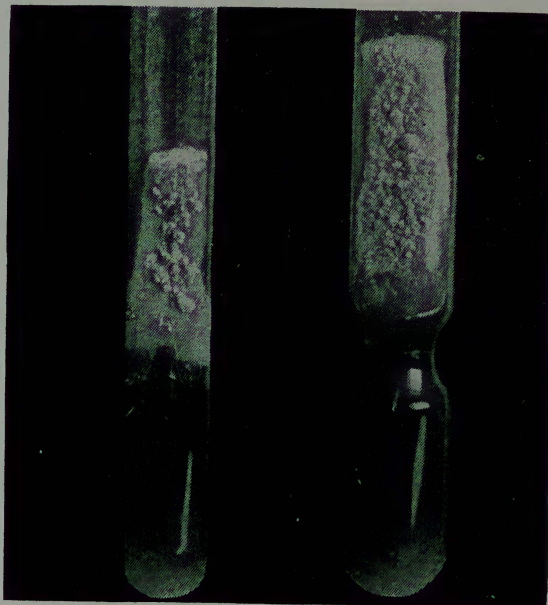
2.

Culturas de 21 dias em:

1. — Batata com caldo de ovário glicerinado (5%) — Tipo aviário
2. — Batata com caldo de ovário glicerinado (5%) — Tipo bovino

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA

E S T A M P A



1.

(17 dias)

2.

(27 dias)

Culturas em batata-caldo-ovário do MYCOBAC-  
TERIUM TUBERCULOSIS — Tipo humano

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA



ESTAMPA



1.

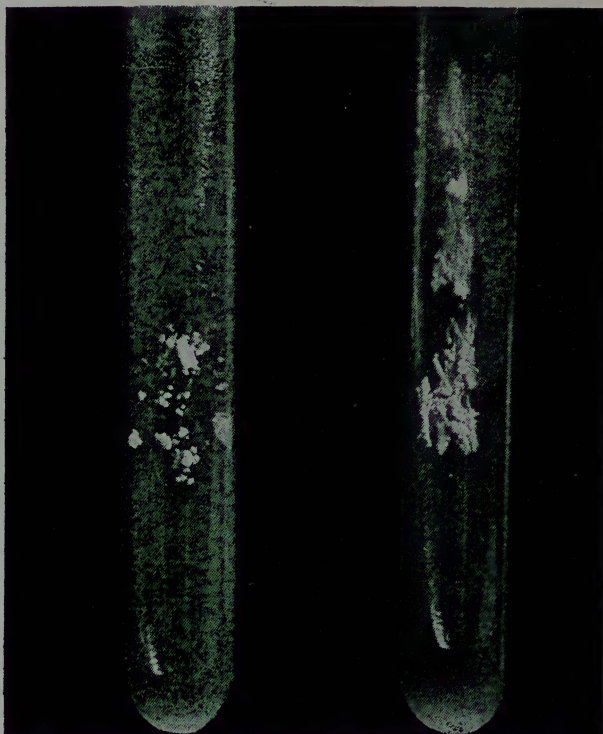
2.

Culturas de 15 dias em:

1. — Caldo de fígado glicerinado (5%) — Tipo humano
2. — Caldo com mocotó glicerinado (5%) — Tipo aviário

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**

ESTAMPA



1.

2.

Culturas de 15 dias

em

gelose-caldo de pâncreas glicerinado (5%)

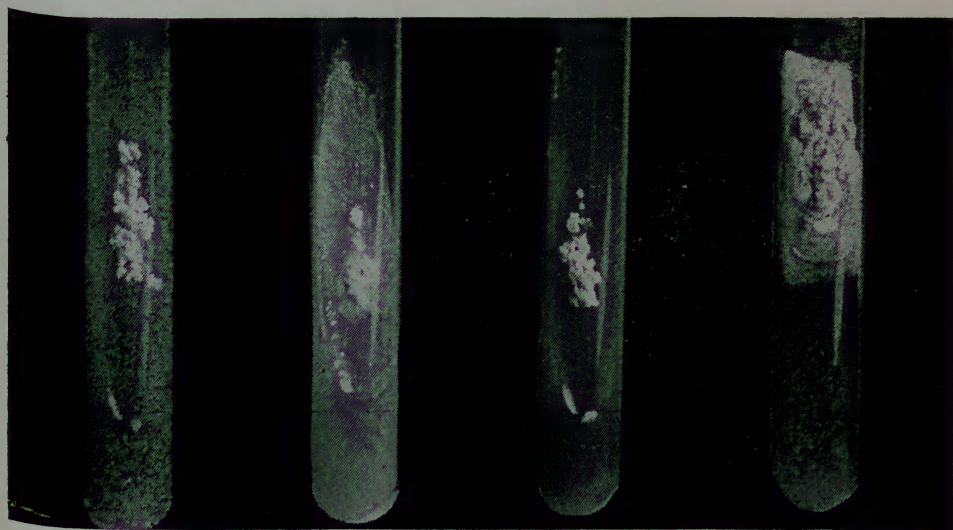
1. — Tipo humano (Ratti)

2. — Tipo aviário

Tese Inaugural

**OSCAR MAY PEREIRA**

ESTAMPA



1.

2.

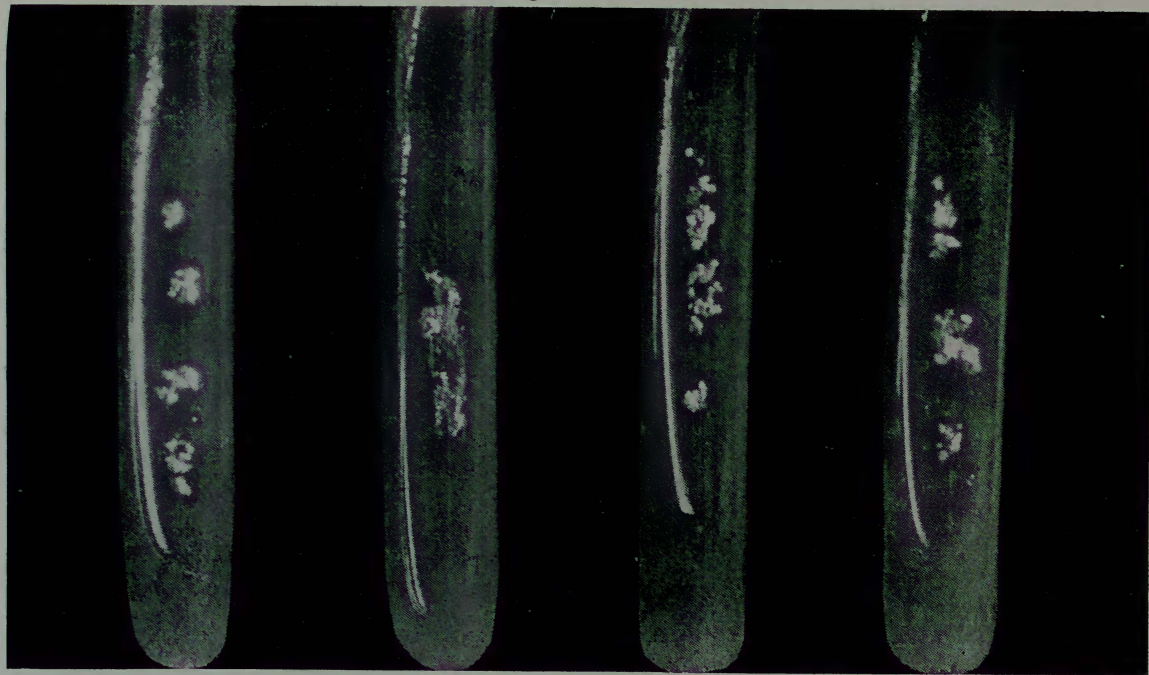
3.

4.

Culturas de 21 dias em:

1. — Gelose-caldo de hipófise — ovário glicerinado (5%) — Tipo humano.
2. — Gelose-mocotó glicerinado (5%) — Tipo humano
3. — Gelose-caldo de pâncreas glicerinado (5%) — Tipo humano
4. — Batata-caldo de coração glicerinado (5%) Tipo humano

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**



1.

2.

3.

4.

1. — Gelose-caldo de fígado glicerinado (5%) — Tipo Vallée
2. — Gelose-caldo de fígado glicerinado (5%) — Tipo aviário
3. — Gelose-caldo de pâncreas (5%) — Tipo Vallée
4. — Gelose-caldo de testículo (5%) — Tipo Vallée

FICHA TÉCNICA

MEIOS DE BASE

Fosfato ácido de potássio.....	1 gr.
Fosfato disódico (12 H <sub>2</sub> O).....	6,25 gr.
Asparagina .....	2 gr.
Citrato de ferro amoniacal.....	0,05 gr.
Sulfato de magnésio .....	0,005 gr.
Água bi-dist. em ap. de vidro.....	1.000 cc.
Twen 80 (sol. 10 %) .....	5 cc.

pH: 6,8

Esterilização

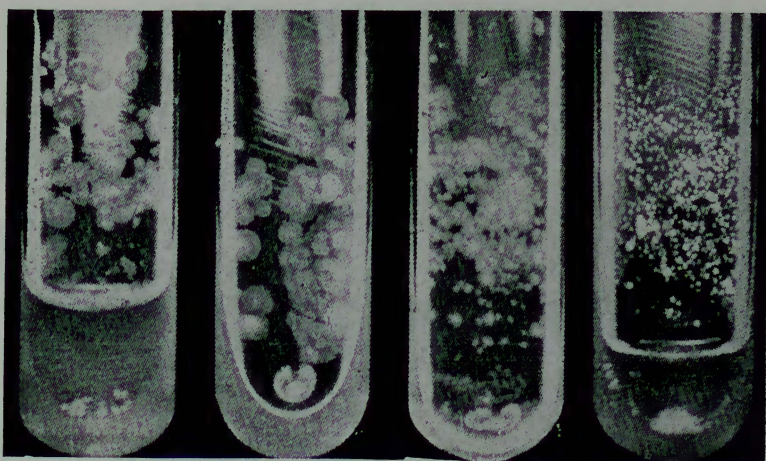
Autoclave a 115°, durante 15'

Adição aseptica da fração V albumina sêca de boi

Soluto da fração V de albumina em água fisiológica 0,85 por %. Esterilização por filtração em vela de Chamberland L<sub>3</sub>.

Verificação da esterilidade do meio

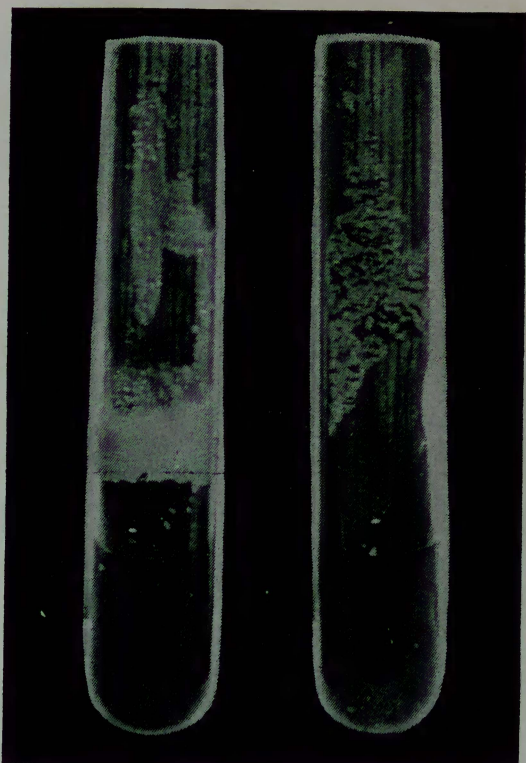
Estufa a 37°, durante 48 horas



CULTURAS EM MEIO DE DUBOS  
(Gernez - Rieux, Sevin e Mlle. Spy)



ESTAMPA



1.

2.

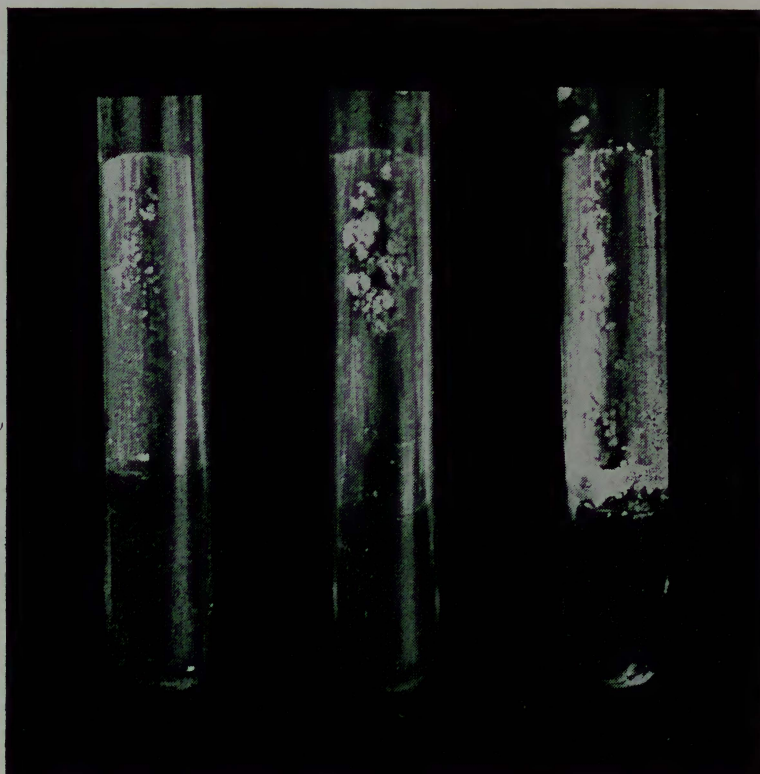
Culturas sôbre palha de milho impregnada  
pelo caldo glicerinado (5%)

1. — Tipo avlário

2. — Tipo humano (Ratti)

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA

E S T A M P A



1.

2.

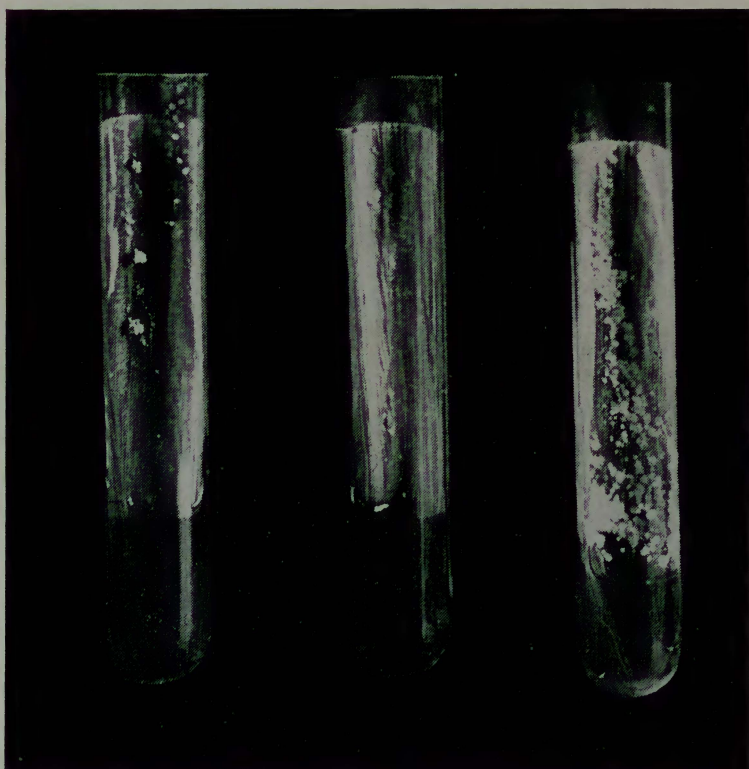
3.

Culturas do MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS em caldo de placenta humana glicerinada (5%) — palha de milho

1. — Tipo Vallée
2. — Tipo Ratti
3. — Tipo aviario

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**

ESTAMPA



1.

2.

3.

Culturas do MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS em meio de Sabouraud glicosado a 2% — palha de milho

1. — Tipo Vallée

2. — Tipo Ratti

3. — Tipo aviario

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA



ESTAMPA

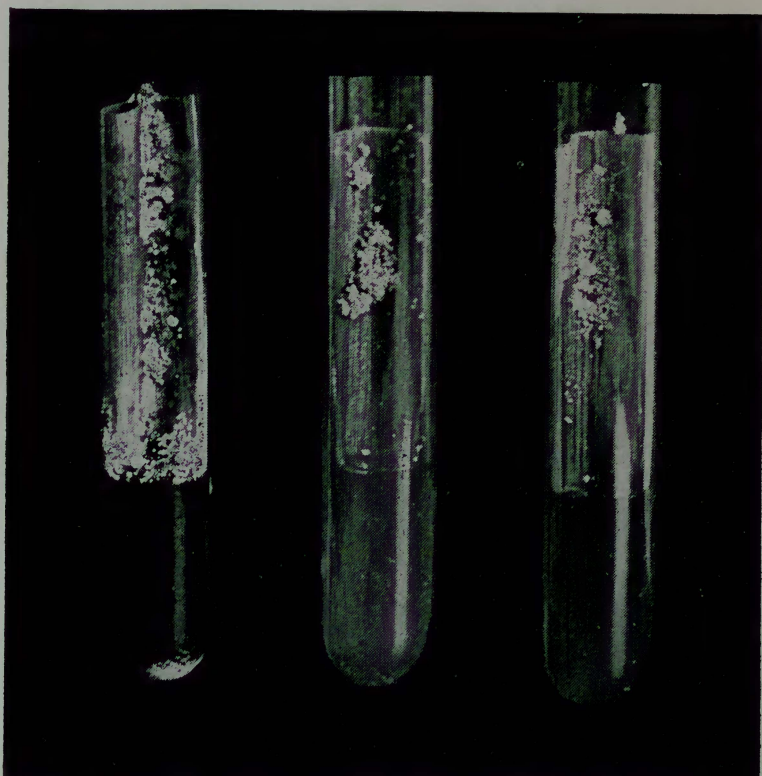


INOCULAÇÃO PERITONEAL EM COBAIO DE PUS  
GANGLIONAR

(Caso do Prof. Guerra Blessmann)

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA

ESTAMPA



1.

2.

3.

CULTURAS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

1. — Tipo aviario em caldo de testículo glicerinado (5%)
2. — Tipo Ratti em caldo de baço glicerinado (5%)
3. — Tipo Vallée em caldo glicosado e glicerinado (5%)

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA

Na escolha da via de inoculação do material infectante, devemos preferir as inoculações na cavidade peritoneal, toda vez que o exame direto revelar ausência de cocos piogênicos.

Observámos séries de animais inoculados com o mesmo material, em aparência asséptica, tanto pela via subcutânea como pelas injeções peritoneais.

Em um caso, da clínica particular do Prof. Guerra Blessmann, de tuberculose ganglionar, as inoculações subcutâneas não infectaram os cobaios, ao passo que os métodos de inoculação peritoneal forneceram indicações valiosas para estabelecer um dignóstico acertado.

Daí concluímos que nesses casos impõe-se a inoculação do material a examinar pela via mais severa de inoculação: a introdução do germe na cavidade peritoneal de um animal hipersensível ao micobactério da tuberculose, como é o cobaio.

Ocorre-nos lembrar, em face dessas demonstrações, fatos ocorridos nas pesquisas dos vírus filtráveis em produtos tuberculosos inoculados em cobaios.

Inúmeros autores não conseguiram infectar cobaios, inoculando filtrados de produtos tuberculosos ou mesmo culturas filtradas de germe virulento, utilizando a via subcutânea.

Tudo isso faz concluir que as pesquisas tão interessantes do ultra-vírus de Fontes, merecem ainda por parte dos pesquisadores investigações repetidas, antes de concluir-se que as pesquisas originais de Fontes foram defeituosas, quanto a técnica empregada e os resultados conclusivos.

Para reproduzirem-se as experiências de Fontes, no nosso entender, é indispensável empregar espécimes muito virulentos, colhidos em isolamento recente.

Boquet e Bretey, em trabalho de 1950, demonstram que espécimes mais ou menos atenuados foram isolados de lesões ósseas, articulares, ganglionares e sobretudo de lúpus.

Obtiveram assim verdadeira gama de virulência em coleções de amostras mais ou menos patogênicas, cujas inoculações em doses judiciosamente escolhidas reproduzem experimental-

mente, em grandes linhas, as múltiplas formas da tuberculose humana: infecções larvadas, simplesmente alergizantes e espontaneamente curáveis e até as formas mais graves, a tísica.

Ao examinarmos os cobaios inoculados não verificámos unicamente a tuberculose clássica experimental tipo Villemin, mas ainda a observação da tuberculose ganglionar unicamente caracterizada por uma hipertrofia manifesta, sem lesões caseosas do sistema ganglionar, tráqueo-brônquico, axilar, submaxilar, lombar, reto-hepático, terminando sempre pela pesquisa cuidadosa de germe ácido-resistente.

Malfatti (1949), em investigações efetuadas no microscópio eletrônico sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, tipo humano, notou que a maioria das granulações se aloja no interior do citoplasma. São capazes, num momento dado, de separar-se do micobactério comportando-se como verdadeiros milimicrosporos: alguns dêles, com um volume suficiente para atravessar facilmente as velas de Chamberland L<sub>3</sub> e L<sub>5</sub>, constituindo então verdadeiras formas filtráveis. O problema fundamental é que êsses grânulos são capazes de se desenvolverem formando novos germes. Patenteia-se assim novamente o discutido e negado vírus filtrável de Fontes.

Ainda repetimos as experiências de Cabasso e Roussel (1942), que preconizam outra via de inoculação no cobaio, de grande valia prática: a inoculação do produto suspeito adicionado de 0,5 cc. de óleo de vaselina no testículo do cobaio.

Da mesma forma utilizámos a adição das sulfamidás, em alguns dos produtos a inocular, visando as associações microbianas, conforme Tison (1947) aconselha em sua publicação nos Anais do Instituto Pasteur.

Como pesquisa orientadora, — sempre útil —, recorremos a intradermo-reação à tuberculina bruta de Bhering. Na estampa anexa, lê-se resultado negativo em cobaio inoculado com sedimento urinário no qual se verificara a presença de bacilos ácidos-resistentes, sem ação patogênica.





PROVA TUBERCULÍNICA

Inoculação intradérmica de 0,10 do soluto de Tuberculina bruta de Bhering -  $\frac{1}{10}$

Resultado: negativo (doente C. M.)

Tese Inaugural  
OSCAR MAY PEREIRA

**E S T A M P A**

**PESQUISAS DO MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS**

realizadas no  
**HOSPITAL-SANATÓRIO BELEM**

(1945 — 1950)

—o—

**E S C A R R O**

Pesquisa direta		Homogeneização		Total		
Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Tot. ger.
2.204	4.774	421	68	2.625	4.842	7.467

**LAVADO GÁSTRICO**

Negativo	Positivo	Total
134	21	155

**LAVADO TRAQUEO-BRÔNQUICO**

Negativo	Positivo	Total
39	3	42

Tese Inaugural  
**OSCAR MAY PEREIRA**

## CONCLUSÕES

### I

Julgamos acertado, ao mencionar-se o número de germes, fazer alusão simultânea aos grânulos negros encontrados nos elementos micobacterianos, e ao grau da ácido-resistência dos germes. Isso de acôrdo com a classificação que propomos:

Micobactérios sem grânulos negros .....	Tipo I
Micobactérios com um grânulo negro .....	Tipo II
Micobactérios com 2 ou 3 grânulos negros .....	Tipo III
Micobactérios com grânulos negros em rosário ....	Tipo IV
Grânulos negros isolados ou grânulos negros com micobactérios quase desaparecidos .....	Tipo V

### II

Nunca se deve afirmar a não existência do denominado ultravírus de Fontes num filtrado de produto tuberculoso unicamente pelas inoculações subcutâneas em cobaios.

Quando se fizer essa verificação, é indispensável que se empregue espécimes hipervirulentos, de isolamento recente.

### III

As inoculações em cobaios por via peritoneal de material aparentemente sem germes, oferecem alto interêsse prático.

### IV

As pesquisas culturais feitas em meio de Loewenstein, Petragnani-Saenz e Dubos simplificado permitem, na prática corrente, a diferenciação fácil do *Mycobacterium tuberculosis* dos bacilos paratuberculosos.

## V

Para maior segurança, nos casos ainda duvidosos, convém recorrer às inoculações peritonias em cobaias ou em preás, e em coelhos quando se visar o tipo bovino, que deve ser inoculado por via intravenosa.

## VI

Nos tratamentos da tuberculose pelos antibióticos ou complexos antagonicos, cremos útil nos processos de bacterioscopia direta e indireta estudar com minúcia:

- 1.º — a propriedade tintorial dos germes;
- 2.º — as suas dimensões apresentadas;
- 3.º — a presença de grânulos negros e também a sua contagem;
- 4.º — a desintegração granular.

## VII

Os meios culturais contendo palhas de milho impregnadas pelos diversos caldos glicerinados (caldo comum, caldo de ovário, caldo de testículo, caldo de fígado, caldo de baço, caldo de pâncreas, caldo de coração, caldo de hipófise-ovário) são valiosos para permitir a diferenciação dos tipos micobacterianos e ainda obter camadas culturais isentas de partículas dos meios solidificados pela gelose.

## VIII

Nas investigações de rotina, a microscopia fluorescente deve figurar ao lado das provas de ácido e álcool-resistência.

## IX

O meio de Dubos simplificado oferece alto interesse clínico-laboratorial pelo encurtamento do prazo de desenvolvimento



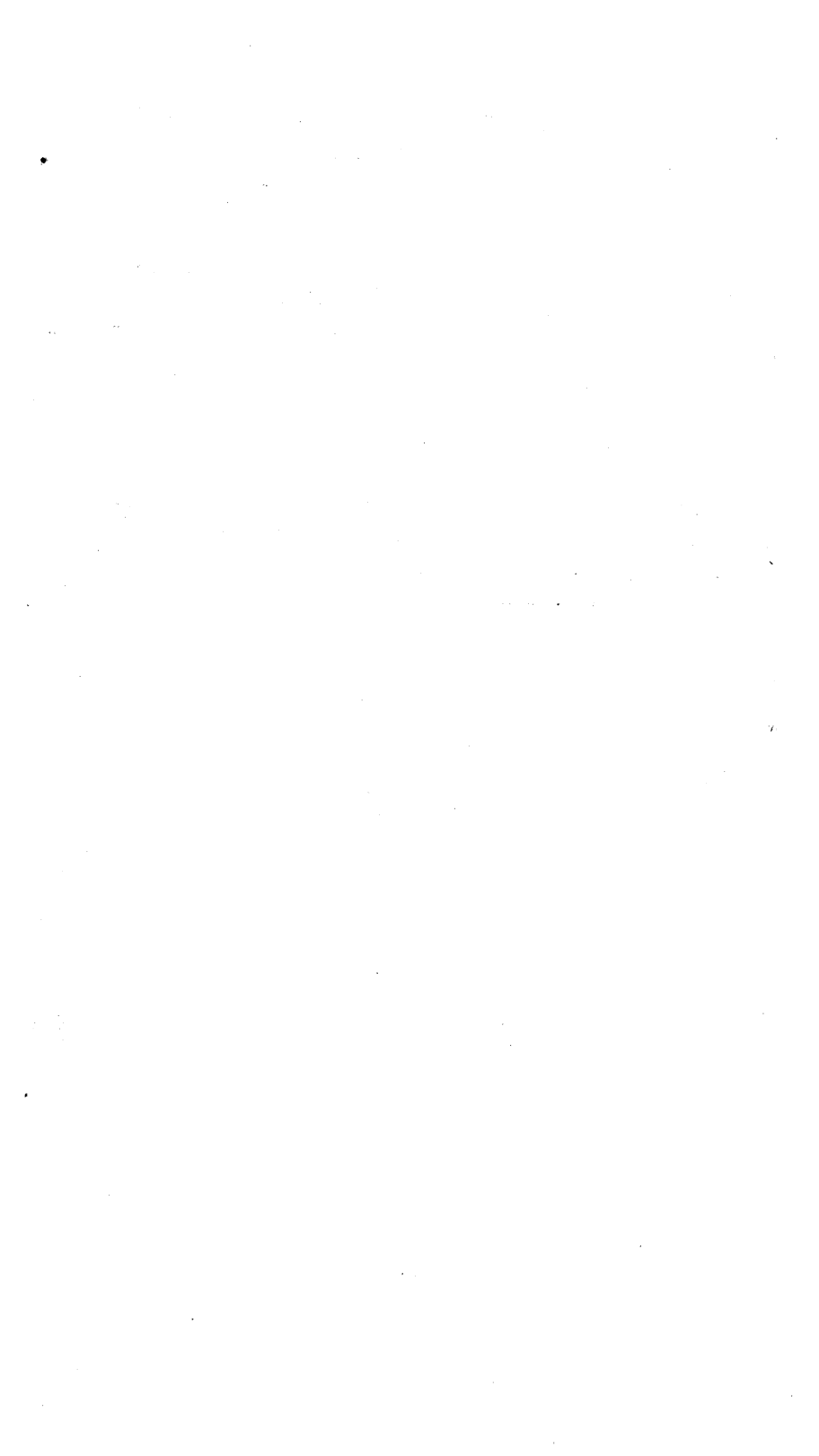
do germe: crescimento muito mais rápido do que nos meios de Loewenstein ou Petragani-Saenz.

## X

Entretanto, a nossa experiência permite concluir que, nas provas culturais, é de toda utilidade semear o material simultaneamente nos 3 meios atualmente mais aconselháveis: Dubos, Loewenstein e Petragani-Saenz.

## XI

No meio de Sabouraud glicosado a 2% com palha de milho as culturas do tipo aviário são luxuriantes, úmidas, ao passo que as do tipo Vallée são secas, pouco desenvolvidas e as do tipo Ratti apenas aparentes.



## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ABREU, M. — 1100 lavados pulmonares no diagnóstico bacteriológico da tuberculose. *Revista Médico-Cirúrgica do Brasil*. Janeiro - abril — 1947 — pág. 59.
- ARENA, A. R. — Valor del método bacterioscópico en el diagnóstico de la tuberculosis — *TISIOLOGIA* — octavo curso de perfeccionamiento sob la dir. G. Sayago.
- ARENS, K. — O diagnóstico do “*Mycobacterium Tuberculosis*” pela fluoromicroscopia. *Rev. Bras. Tub.*, 1949 n.º 124, pág. 393.
- ASSELINÉAU, J. — LEDERER, E. — Isolemente de deux acides mycoliques isomères de “*Mycobacterium Tuberculosis*” var. “*hominis*” *C. R. Acad. Sci*, 1949, t 228 — pág. 1892.
- ASSIS, A. — Germe da Tuberculose — Raças — Toxinas — Ultra virus — *Modernos Estudos Bacteriologicos em Tuberculose Pulmonar* — Clementino Fraga.
- AUGIER et PRUDHOME — Écrans liquides adaptés à la microscopie en fluorescence utilisant l'auramine comme fluorochrome. *Annales de l'Institut. Pasteur* — N.º 3 — Setembro, 1948 — pág. 223.
- AUGIER, J. — Apport de la microscopie en fluorescence dans l'étude et la recherche des bacilles acido-résistants. *Thèse Doct. Méd.* — Paris, 1949.
- BAKKER, J. H., et H. H. VINK — Het fluorescentiemikroskopisch onderzoek op tuberkelbacillen in weefselneden *Tijdskr. Diergeneesk.* 1946, t 71, pág. 20.
- BARSINI, G. — La bacillemia tuberculare ricercata col metodo Petraghani. *Lo sperimentale* — Italia, 1935, t 89, pág. 306.
- BEATTIE, M. — Cultivation of “*Mycobacterium tuberculosis*” *J. Labor. a. clin. Med.*, 1949, t 34, pág. 733.
- BENDA, R. et URQUIA, D. A. — Etudes comparatives des granulogrammes chez des cobayes inoculés avec des bacilles humains, bovins ou aviaires. *Rev. Path. com.*, 1950, t 50, pág. 70.
- BENDA, R. et URQUIA, D. A. — Différenciation des bacilles tuberculeux humains et bovins. *Rev. de la Tuberc.*, 1949, t 13, pág. 949.
- BENEDEN, J. V. — Recherches sur l'infection, l'hypersensibilité et l'immunité, vis-a-vis des formes virulentes ou atténuées du virus tuberculeux. Paris, 1932.

- BERNARD, N. — NEGRE, L. — Albert Calmette — sa vie — son oeuvre scientifique. Paris, 1939.
- BERRY, J. W. et LOWRY, H. — A slide culture method for the early detection and observation of growth of the tubercle bacillus. Amer. Rev. Tuberc., 1949, t 60, pág. 51.
- BEZANÇON, F. et JONG, S. I. — Traité de l'Examen des crachats. Paris, 1912.
- BISSET, K. A. — The cytology and life-history of bacteria. Edinburgh, 1950.
- BIER, O — Bacteriologia e Imunologia. São Paulo, 1945.
- BOY, J. — Applications de la fluoroscopie à la recherche des bacilles de Koch en pratique courante. Ann. Biol. Clin., 1949, an. 7, pág. 109.
- BOQUET, A. — BRETEY, J. — Influence du nombre de bacilles inoculés sur le développement de la tuberculose expérimentale. Revue de la Tuberculose, 1950, t 14, pág. 440.
- BRETEY, J. — ANDREJEW — Respiration des bacilles tuberculeux dans le milieu de Dubos. Tween 80. C. R. Soc. Biol. 1949, t 143, pág. 171.
- BROEK, J. C. H. — GRAAF, W. C. — Sur la forme granulaire du bacille tuberculeux. Comm. à "Koninklyke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam". January, 1931.
- BRUN, J. et VIAILLIER, J. — Isolement direct en milieu de Dubos de souches de "Mycobacterium tuberculosis", à partir de produits pathologiques. C. R. Soc. Biol., 1949, t 143, pág. 263.
- CABASSO, V. et ROUSSEL, H. Emploi de l'huile de parafine pour le diagnostic de la tuberculose sur le cobaye. Arch. Inst. Pasteur Tunis, 1942, t 31, pág. 31.
- CALMETTE, A. — L'infection bacillaire et la Tuberculose. Paris — IV edição, 1936.
- CASTRO, J. R. — Diagnóstico de actividade en la Tuberculosis pulmonar. Barcelona, 1936.
- CHARPY, J. — Le traitement du lupus tuberculeux et de certaines tuberculoses par la vitamina D<sup>2</sup> (Calciferol), résultats et perspectives d'avenir. Anais Fac. Med. P. Alegre — Dez., 1946.
- CHRISTOFFERSON, P. A., H. E OTTONSEN og G. THOMSEN — Undersogelser med saerligt Henblik paa Paavisning af syrefaste Bakterier Maansskr. Oyrlaeger, 1940, t 52, pág. 429.

- CLEGG, JIW., and A. F. FOSTER-CARTER — Detection of tubercle bacilli by fulorescence technique. *Brit. Tuberc. Journ.* 1946, t 40, pág. 90.
- CLIFFORD, R. — *The Sputum*. New York, 1932.
- DABELSTEIN, H. — Das Fluoreszenzmikroskop in der laufenden Tuberkulose-diagnostik. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskrankh. Abt. 1 Orig.* 1938, t 143, pág. 242.
- DAVOLI, R. et ZANELLI, M. — Cultura del "Mycobacterium tuberculosis" in terreno al "Tween 80". *Giorn. Batter. Immunol.* 1948, t 39, pág. 401.
- DARZINS, E. — Cultura Precoce do Bacilo Tuberculoso de Material Contaminado — *Anais do 5.º Cong. Int. Microbiologia — Brasil*, 1950, pág. 61.
- DIDION, H. — Ueber den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbakterien *Klin. Wochenschr.* 1939, t 18, pág. 1315.
- DOMAGK, G. — Investigations on the Antituberculous Activity of the Thiosemicarbazones in vitro aund in vivo. *The Amer. Rev. of Tuberc.* — 1950, vol. 61, pág. 8.
- DUBOS, R. — NOUFFLARD — Millieux semi-synthétiques à l'albumine pour la culture des bacilles tuberculeux. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, t 78, pág. 208.
- DUFOURT, A. — *Traité de Phtisiologie Clinique*. Paris, 1946.
- DUFOURT, A. e FABRE, A. — Procédé pour faciliter le controle des microcultures de bacilles tuberculeux sur milieu de Loewenstein. *Soc. Biol. Lyon*, 1934, in *C. R. Soc. Biol.* t. CXVII.
- DUMAREST, F. — MOLLARD, H. — *Le Tuberculeux Guéri*. Paris, 1941.
- ENCYCLOPÉDIE MÉDICO-CHIRURGICALE — Pulmon, Plèvre et Médiastin — pág. 6.026.
- ESPINDOLA, P. D. — Contribuição ao estudo da infecção experimental tuberculosa nas cávias — Inoculação positiva em Preás (cávia apérea). Tese — F. M. Pôrto Alegre, 1940.
- FINKE, L. — Ueber den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen in Austrichen und Gewebeschnitten. *Arch. Hyg. Bakteriол.* 1940, t 123, pág. 381.
- FONTES, A. — Variabilidade del bacilo de la tuberculosis. *Rev. Hig. y Tuberculosis*, Valência, 1931, pág. 317.
- FONTES, A. — *L'ultravirus tuberculeux*. Paris, 1932.
- FONTES, A. — Formas filtráveis do vírus tuberculoso. *Brasil-Médico*, 1926, n.º 13, pág. 169.

- FONTES, A. — Sôbre a perda da ácido-resistência e a desagregação granular nos bacilos de Koch em culturas antigas. Mem. Instituto Oswaldo Cruz, 1924, n.º 1, pág. 181.
- FONTES, A. — Sôbre a estrutura e o modo de desenvolvimento do bacilo tuberculoso. Brasil-Médico, 1922, n.º 31, pág. 71.
- FONTES, A. — Diagnóstico microscópico diferencial entre os bacilos da tuberculose e os outros ácido-resistentes. Brasil-Médico, 1908, pág. 401.
- FONTES, A. — Propriedade impediante de determinados óleos sôbre as culturas de ácido-resistentes. Separata "Brasil-Médico", 1921.
- FONTES, A. — Acção impediante exercida pelo estanho, em papel, sôbre o desenvolvimento das culturas de tuberculose. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1927 — Tomo 20.
- FONTES, A. — Sôbre o "Cyclo Vital" das bactérias. Contribuição ao estudo da forma granular. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 1925, t 18.
- FONTES, A. — Polymorphismo do bacilo tuberculoso. Separata "Brasil-Médico", 1931.
- FONTES, A. — Novas orientações no estudo da tuberculose. Arquivos de Higiene — Ano III, N.º 2.
- FONTES, A. — Sôbre a estrutura e reprodução das bactérias. Separata "Brasil-Médico", 1925.
- FLEMING, A. — Bacterial Motility and Flagellar Movement. Anais do 5.º Cong. Inst. Microbiologia — Brasil, 1950, pág. 31.
- FRAGA, C. e colaboradores — Tuberculose pulmonar. Rio, 1931.
- FRANÇA, C. et LOUREIRO, J. A. — Effects des injections massives de bacilles tuberculeux vivants dans le péritoine du cobaye. Arch. portug. Sci. biol., 1947, t 9.
- FREIMAN, D. G. et MAX PINNER — Routine examination of acid-fast bacilli. Amer. Rev. Tuberc., 1919, t 59, pág. 449.
- GAERTNER, K. — Ein Beitrag zur Faerbbbarkeit der lebenden und toten Bakterienzelle. Zeitschr. f. Hyg., 1943, pág. 86.
- GASTINEL, P. — Précis de bactériologie Médicale. Paris — Masson, 1949.
- GERNEZ-RIEUZ, C., LEVIN, A. et SPY, C. — Contribution à l'étude de la culture du bacille tuberculeux sur milieu synthétique de Dubos. Ann. Biol. Clin. 1948, ano 6, pág. 463.
- GERNEZ-RIEUZ, C., LEVIN, A. et SPY, C. — Utilisation du milieu de Dubos pour la culture du "Mycobacterium tuberculosis" à partir des produits paucibacillaires. C. R. Soc. Biol. 1948, t 142, pág. 327.

- GIROUX** — Tuberculose expérimentale du hamster doré. Laval méd., n.º 8, 1947, pág. 863.
- GOLDBERG, B. e colaboradores** — Tuberculosis Clínica. Tomo I — Barcelona, 1942.
- GOES, P.** — Coloração das granulações de Much do "Mycobacterium tuberculosis". (Técnica de). Rev. Bras. Tub., 1949, pág. 187.
- GUERNON, A.** — A new medium for the rapid cultivation of tubercle bacilli. Amer. Rev. of Tuberc., 1934. Out.
- HAGEMANN, P. K. H.** — Fluoreszenzfaerbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. Muenchn. Med. Wochenschr. 1938, t 85, pág. 1066.
- HAGEMANN, P. K. H.** — Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Leprabakterien im Nasenschleim und im Blut. Deutsch. med. Wochenschr. 1937, t 63, pág. 514.
- HAITINGER, M.** — Fluoreszenzmikroskopie Ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig, 1938.
- HAUDUROY e colaboradores** — Bacilles tuberculeux et paratuberculeux. Paris — Monographie, 1950.
- HAUDUROY, P. et ROSSET, W.** — Sensibilité comparée du hamster et du cobaye aux bacilles tuberculeux humain et bovin. C. R. Soc. Biol., 1949, t 143, pág. 790.
- HAUDUROY, P. e colaboradores** — Dictionnaire des bactéries pathogènes. Paris, 1937.
- HERMANN, W.** — Der Nachweis der Tuberkelbazillen mit dem Fluoreszenzmikroskop Deutsch. Med. Wochenschr. 1938, t 64, pág. 1354.
- HOUDURY, P. et J. POSTERNAK** — La recherche du bacille tuberculeux et de certain autres microbes par les methodes de microscopie en fluorescence. Praxis (Bern) 30, 91-101, 1941, t 30, pág. 91.
- HOUDURY, P. et J. POSTERNAK** — Recherche des bacilles tuberculeux dans les expectorations par la microscopie en fluorescence. Compt. Rend. Soc. Biol. 1941, t 155, pág. 755.
- HUGHES, G. C.** — Fluorescence microscopy for detection of the tubercle bacillus. Med. Journ. Australia, 1943, t 30, pág. 353.
- IMELIK, S. — BRETEY** — Etude du mode de multiplication du bacille tuberculeux aviaire ("Mycobacterium avium") dans le milieu de culture de Dubos. Ann. Inst. Pasteur, 1949, t 77,
- JENSEN, K. A.** — Humane und bovine Formen der Tuberkelbazillen, Schweiz. Zeitschr. F. Path. u. Bakt., 1949, t 12, pág. 435.

- JOUY, H. — La culture du bacille de Koch sur les Milieux a l'oeuf — Méthode de Loewenstein. Paris, 1934.
- KELLER, Ch. J. — Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen im Fluorescenzlicht. Muenchn. Med. Wochenschr. 1938, t 85, pág. 2024.
- KOCH, R. — The Aetiology of Tuberculosis. New York — March, 1932.
- KRISTOFFERSON, C. E. — Erfahrenheter med fluorescenzmikroskopie Nordisk. Medicin. (Helsinki), 1939, t 3, pág. 2434.
- KROEGER, E. et ROSARIUS, M. — Zur Verwendung von schnellen Zentrifugen in der Methodik des Tuberkelbazillennachweises. Zentralbl. f. Bakt. 1949, t 154, pág. 213.
- KUDELSKI, Ch. — LEROUX, L. e KUDELSKI, Eł. — Expectoration bacillifère, chez un jeune homme, sans lesion pulmonaire clinique et radiologique. Revue de la Tuberculose. Fev., 1934.
- LAGRANGE, E. — Robert Koch — sa vie et son oeuvre. Paris, 1938.
- LANGERON, M. Précis de microscopie. Paris — 7.<sup>a</sup> edição, 1949.
- LAERTE DE ANDRADE — Contribuição ao Estudo das Mico-bactérias. Fluoromicroscopia e Reação Cito-química de Dubos. Anais do 5.<sup>o</sup> Cong. Inst. de Microbiologia Brasil, 1950, pág. 57.
- LEMBKE, A. — Untersuchungen an den Erregern der Tuberkulose. Zentralbl. f. Bakt., I, 1947, pág. 239.
- LEVADITI, C. — VAISMAN, A. — LEVY, P. — Certaines souches de bacilles para-tuberculeux "Paramycobacterium tuberculosis" réputées non virulents le sont-elles réellement? Presse médicale, 1949, n.<sup>o</sup> 61, pág. 852.
- LEVADITI, C. — VAISMAN, A. — LEVY, P. — Virulence du Mycobacterium tuberculosis souche 607. C. R. Acad. Sci., 1949, t 228, pág. 1610.
- LEVADITI, J. C. — PRUDHOMME, R. O. — AUGIER — Comparaison des spectres d'absorption des écrans et d'émission des fluorochromes au cours de la microscopie en fluorescence. Annales de l'Institut Pasteur — N.<sup>o</sup> 3, Setembro, 1948, pág. 217.
- LEVADITI, J. C. et KREIS, B. — Techniques de Laboratoire en Pneumologie. Collection de l'Institut Pasteur. Paris, 1949.
- LOUREIRO, J. A. — Méthode d'homogénéisation pour la recherche des bacilles tuberculeux dans les crachats. Arch. port. Sci. Biol., 1947 - 1948, t 9, pág. 60.



- LOEWENSTEIN — O metodo de hemocultura do virus tuberculoso e seus resultados. *Annales de l'Inst. Pasteur*, Fev., 1933.
- LUZ, K., MENDING, B. — Ueber den fluorescenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen, unter besonderer Beruecksichtigung anderer alkohol-saeure-fester Bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Abt. 1 Orig.* 1940, t 145, pág. 500.
- MAGARÃO, M. F. — LINHARES, H. — Lavado brônquico. *Revista Médico-Cirúrgica do Brasil*. Janeiro-abril, 1947, pág. 71.
- MALFATTS, M. G. R. — Investigaciones efectuadas mediante el microscopio electronico sobre el "Mycobacterium tuberculosis" (Koch) var. hominis. *Rev. Ass. Méd. Argentina*, 1949, t LXIII, n.º 661 - 662, pág. 435.
- MARQUES PEREIRA, F. C. — O parasito da tuberculose. Tese apresentada F. M. Pôrto Alegre, 1929.
- McEWEN, W. W. W. — *Bacteriological technique*, Brooklyn, 1950.
- McNELLY, E. et RIDELL, W. A. — Use of egg embryos in the culture of "Mycobacterium tuberculosis". *Amer. J. Publ. Health*, 1949, t 39, pág. 1463.
- MRCHEVITCH, S. — Sensibilité comparée des milieux de culture et de l'inoculation au cobaye pour le diagnostic du bacille tuberculeux. *Rev. Immunol.*, 1949, t 13, pág. 183.
- NATTAN-LARRIER, L. — *Traité de microbiologie*. Paris — Tomo I, 1931.
- NASCIMENTO E SILVA, e colaboradores — Culturas e inoculações de lavados gástricos e bronquicos no diagnóstico do "Mycobacterium tuberculosis". *Anais do 5.º Cong. Int. Microbiologia — Brasil*, 1950, pág. 56.
- NEDELKOVITCH, J. — Mode de multiplication du bacille de Koch. Morphologie du bacille et de ses colonies, quelques sources d'erreurs. *Annales de l'Institut Pasteur*. Fevereiro, 1950.
- OKADA, Y. — The examination of tubercle bacilli in sputum, II. A concentration method of tubercle bacilli in sputum. *Tohoku, J. exp. Med.*, 1949, t 51, pág. 1.
- PARAF, J. e colaboradores — Relation entre la Virulence des Bacilles Acido-Alcoolico-Résistants et Certaines de leurs Propriétés Physico-Chimiques. *Anais do 5.º Cong. Inst. Microbiologia — Brasil*, 1950, pág. 36.
- PEREIRA, O. B. — A iõnimetria nos meios culturais. Tese apresentada Fac. Med. Pôrto Alegre, 1926.

- PEREIRA, O. B. — Ação lisante de um germe isolado sobre o “*Mycobacterium tuberculosis*”. (Nota prévia). Facul. Med. Pôrto Alegre — Fev., 1918.
- PEREIRA, O. B. — O Complexo antagônico (Fimolisina) na tuberculose pulmonar. 4.º Congr. Nac. Tuberculose — Recife — Novembro, 1948.
- PEREIRA, O. B. — O Complexo antagônico (Fimolisina) na tuberculose pulmonar. Congr. 50.º Faculdade Med. Pôrto Alegre — Março, 1949.
- PEREIRA FILHO, M. J. — Los tipos del “*Mycobacterium tuberculosis* Koch” y su cultivo em patata-caldo de ovário glicero-peptonado. Hoja Tisiológica, 1947 — VII, pág. 15.
- PETRAGNANI, G. — Le sang comme milieu d’enrichissement des *B. K.* Bolletino della Sezione Italiana della Societa Internazionale di Microbiologia. Milano, 1934.
- PETRINI, M. — Sulla diagnosi batteriologica di tubercolosi umana mediante la microscopia a fluorescenza. Fiorn. Batteriol. Immunol., 1946, t 34, pág. 137.
- POT, A. W. — De fluorescentiemicroscopie volgens Keller. Een nieuwe methode tot het opsporen van tuberkelbacillen Geneeskundige Gids (Den Haag), 1939, t 17, pág. 551.
- PRÉVOT, A. R. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Monographie de l’Institut Pasteur, Paris, 1948.
- PIJPER, A. — Bacterial Motility. Anais do 5.º Cong. Int. Microbiologia — Brasil, 1950, pág. 31.
- PLUM, H. — Cultura pura de bacilos tuberculosos na pratica diária de laboratório. Bul. Inst. Pasteur — Jan., 1935.
- REY, A. J., PANGAS, J. C. e MASSÉ, R. J. — Tratado de tisiologia. Buenos Aires, 1947.
- RICH, A. R. — Patogenia de la tuberculosis. Madrid, 1946.
- RICHARDS, O. W. — The staining of acid-fast tubercle bacteria. Science, 1941, t 93, pág. 190.
- RICHARDS, O. W., KLINE, E. K., and LEACH, R. E. — Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. Am. Rev. Tuberc., 1941, t 44, pág. 255.
- RICHARDS, O. W. — Fluorescence microscopy: Demonstration of tubercle bacilli and other acid-fast organisms. Em Glasser, O.: Medical Physics. Chicago, 1944.
- RIHL, H. — Erfahrungen den Tuberkelbazillennachweis mit dem Fluorescenzmikroskop. Wien. Klin. Wochenscr., 1940, t 53, pág. 322.

- RUPP, H. M. A. — Bacillemias tuberculares — Valor do methodo de Loewenstein e de seus similares. Tese F. M. Pôrto Alegre, 16-5-1935.
- SAENZ, et COSTIL — Importance de la microculture pour le diagnostic precoce de la tuberculose pulmonaire, par l'ensemencement de crachats. Presse Medicale — Dez., 1932.
- SAENZ, A. et COSTIL — Sensibilité comparée des milieux de culture et de l'inoculation au cobaye pour l'isolement des bacilles tuberculeux. Academie de Medicine — Março, 1933.
- SAENZ, A. et COSTIL, L. — Diagnostic bactériologique de la tuberculose. Monografias de l'Institut Pasteur, Paris, 1936.
- SANARELLI, G. — ALESSANDRINI, A. — Démonstration in vivo et in vitro des formes filtrantes du virus tuberculeux. C. R. Soc. Biol., 1939, pág. 1241.
- SARTORY, A. — GUERBET, M. — QUEVAUVILLER, A. — RICOU, R. L. — Nouvelle méthode de concentration des bacilles tuberculeux pour leur recherche dans les crachats. Ann. Biol. Clin., 1949, an. 7, pág. 229.
- SARTORY, A., SARTORY, R. et MEYER, J. — Microbiologie pratique. Paris, 1950.
- SATTLER, H. — YOUMANS — The effect of "Tween 80", bovine albumin, glicerol, and glucose on the growth of "Mycobacterium tuberculosis" var. "hominis" (H37Rv). J. Bact., 1948, t 56, pág. 235.
- SCHALLOCK, G. — Vereinfachter Nachweis von Tuberkelbazillen in histologischen Schnitten durch die Fluorescenzmethode nach Hagemann. Muenchn. Med. Wochenschr., 1940, t 87, pág. 102.
- SCHNEIDER, P. P. — Fluorescenzmikroskopie und Tuberkelbazillennachweis im Tuberkolusekrankenhaus. Zeitschr. f. Tuberk., 1940, t 84, pág. 319.
- SMITH, J. W. — HUMISTON, J. — GREGER, W. P. — KIRBY, W. M. — Evaluation of Dubos' medium containing penicillin in the isolation of tubercle bacilli. Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med., 1949, t 70, pág. 589.
- STICKL, O., und GAERTNER, K. — Die Wirkngsweise der Sulfonamide und ihre chemotherapeutische Anwendung bei Ruhr. Zeitschr. f. Hygiene, 1943, t 125, pág. 226.
- STRUGGER, S. — Der gegenwaertige Stand der Forschung auf dem Gebiet der fluorescenzmikroskopischen Untersuchung der Bakterien. Mikroskopie (Wien), 1948, t 3, pág. 23.

- STANGANELLI, P. — Il metodo di Loewenstein per la diagnosi di tubercolosi. *Rinascenza Medica — Out.*, 1933.
- TAPIA, M. — Formas anatomo clínicas, diagnóstico e tratamento da Tuberculose pulmonar. Lisboa, 1946 — Cap. 20 — pág. 481.
- TANNER, F. H. — Fluorescence microscopy for demonstrating *Mycobacterium tuberculosis* in tissues. *Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.*, 1941, t 16, pág. 839.
- TE MUNNIK, G. P. — Het aantoonen van tuberkelbacillen met het fluorescentie microscoop. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 1942, t 69, pág. 323.
- TISON, F. — Perfectionnements aux procédés usuels de culture du bacille de Koch à partir des produits surinfectés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, t 77, pág. 313.
- TISON — Comparaison des méthodes d'inoculation aux cobayes pour la recherche du bacille de Koch dans le crachats (Supériorité de l'inoculation du produit non modifié chez le cobaye traité par les sulfamides). *Ann. Inst. Pasteur*, n.º 2, 1947, pág. 186.
- TOPLEY, W. W. C. — WILSON, G. S. — MILES, A. A. — *Bacteriologia e inmunidad*. Madrid, 1949.
- UNAT ERKAN KADI — Fluoreszenzmikroskopie ve Fluoreszenzisiginda tueberkueloeg basillerinin goesterilmesi. *Istambul Serirriyati*, 1939.
- VALTIS, J. — *Le virus tuberculeux*. Masson — Paris, 1932.
- VIEIRA-FILHO, J. J. — *Antônio Fontes e sua obra*. Rio, 1933.
- WEILER, P. und KUNZ, O. — Ueber eine vereinfachte Apparatur zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen Vergleichsuntersuchungen an 1000 Sputumproben. *Med. Welt*, 1939, t 13, pág. 1009.
- WERNECK HIRSCH, E. — DUQUE, B. — PROTASSIO, T. — Comparação entre o resultado da sementeira e o da inoculação no diagnóstico bacteriológico da tuberculose. Separata do "Jornal dos Clínicos". Novembro, 1944.
- WILLIS, H. S. — *Laboratory Diagnosis and Experimental Methods in Tuberculosis*. Baltimore, 1928.

## ÍNDICE

Considerações gerais .....	7
CAPÍTULO I — Aspecto microscópico do “ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ” .....	11
CAPÍTULO II — Fluoromicroscopia .....	19
CAPÍTULO III — Meios de Cultura .....	27
CAPÍTULO IV — Inoculações em animais de Laboratório ..	35
CAPÍTULO V — Contribuição experimental .....	43
Conclusões .....	55
Bibliografia .....	59