

SÔBRE UM MEIO DE CULTURA PARA O *HAEMOPHILUS DUCREYI*

Alguns dados técnicos referentes ao isolamento dêsse bacilo

LUÍS DE SALLES GOMES (*)

Foi somente após a publicação da memorável "These" com que DUCREY (1889) concorreu à livre docência da "Clínica demo-sifilopática" da Real Universidade de Nápoles que ficou definitivamente estabelecida a etiologia bacilar da ulceração venérea conhecida desde há muito tempo com as denominações de cancro mole, *Ulcus molle*, cancroíde, etc. Pouco lembrada em alguns dos seus detalhes — possivelmente pela raridade bibliográfica do original — merece essa notável monografia científica um especial destaque, sobretudo pela precisão com que, à falta de meios artificiais de cultura eficientes, soube o autor lançar mão de métodos experimentais para comprovar a especificidade bacilar de uma doença venérea contagiosa e de tão alta incidência em todo o mundo.

Com apoio em dados fundamentais estabelecidos por anteriores cientistas (perfeito conhecimento do cancro mole sob o ponto de vista clínico; possibilidade, segundo RICORD (1838), da sua auto-inoculabilidade cutânea; pesquisas bacterioscópicas realizadas nas secreções ulcerosas por MORISON (1883), e, principalmente, por FERRARI (1885) que nelas verificou "a presença constante de bacilos, muito menores que o da tuberculose e o da lepra, só visíveis com forte aumento — Oc. 4, obj. im. 1/12, Zeiss, os quais muito possivelmente deveriam estar relacionados com o processo ecológico"), orientou-se Ducrey no sentido da experimentação, procurando desde logo obter, em série, uma estirpe do bacilo que, passada de braço a braço de voluntários, sob as naturais precauções de assepsia e antissepsia, viria a chegar, pura e em pleno viço, à 15.^a geração.

Da 6.^a passagem em diante, o bacilo já se apresentava nos focos ulcerosos provocados nos braços, em condições de absoluta

(*) Diretor da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz. Recebido para publicação em 12 de dezembro de 1960.

pureza, isto é, livre de bactérias de associação, facultando destarte mais precisas observações sobre a sua morfologia, suas reações corantes, seu comportamento em face dos meios artificiais de cultura da época, e finalmente, sobre a relação de causa e efeito entre bacilo e ulceração.

Muito embora falhassem, nas mãos de Ducrey, os repiques do germe, então puro, sobre 14 diferentes meios artificiais de cultura, nem por isso deixamos de considerar o seu isolamento em condições de absoluta pureza e a sua manutenção em passagens sucessivas no próprio tecido vivo que lhe servia de habitat, como uma primeira e autêntica cultura.

UNNA (1892), examinando ao microscópio cortes de tecido colhido da ulceração venérea, chamou a atenção para a fase em cadeia que o bacilo descrito por Ducrey podia também apresentar, e por isso chamou-o de estreptobacilo do cancro mole.

Alguns anos após essas interessantes pesquisas, começaram a aparecer as primeiras referências a culturas do bacilo de Ducrey em meios sólidos e artificiais de cultura.

Em 1893, PETERSEN referiu ter obtido, de modo inconstante, cultura do bacilo de Ducrey em meio de ágar-sôro. Inoculada no homem, esta cultura produziu uma pequena pústula que, porém, cicatrizou espontaneamente no 5.º dia. Mais tarde, em 1898, ISTOMANOFF & AKSPIANZ, e depois LENGLET (1901), referiram-se à obtenção de culturas do bacilo em meio de ágar-pele humana. Dêses trabalhos, porém, não são conhecidas posteriores confirmações.

Entretanto, com a publicação, em 1901, do interessante e convincente trabalho de BEZANÇON, GRIFFON & LE SOURD, sobre a cultura do bacilo de Ducrey em meio de ágar-sangue de coelho, misturados na proporção de 2 partes de ágar e 1 parte de sangue de coelho, novos e largos campos de pesquisa foram abertos à curiosidade científica.

O trabalho de Bezançon e colaboradores mereceu, desde logo, confirmação de SIMON (1902), de TOMASCZEWSKI (1903), de DAVIS (1903), e, por fim, de inúmeros outros pesquisadores que, a pouco e pouco, foram se interessando pelo isolamento do bacilo e ao mesmo tempo contribuindo para o melhor conhecimento da sua biologia.

É evidente que não cabem nos estreitos limites dêste trabalho as citações bibliográficas das numerosas e interessantes monografias estrangeiras e nacionais até então publicadas, e referentes às

diversas modificações introduzidas na fórmula do meio de cultura fundamental apresentado em 1901 por Bezançon e colaboradores. Essas modificações ou variantes poderiam, de um modo geral, ser assim discriminadas: adição de substâncias de alto teor nutritivo; substituição do sangue integral por sangue desfibrinado de coelho; aproveitamento do sangue humano, de cavalo, de boi ou de carneiro; e, finalmente, utilização dos meios líquidos convenientemente enriquecidos, em proporções variáveis, seja com sôro ou plasma hemoglobinaados, seja com sangue desfibrinado dos supracitados animais. Como se sabe, êstes meios líquidos tiveram grande voga quando da produção industrial da vacina curativa do cancro mole, para uso intravenoso, preconizada, em 1924, por NICOLLE & DURAND.

No interêsse de obter, para nosso próprio uso, um meio de cultura que pudesse oferecer condições nutritivas máximas para o desenvolvimento do *H. ducreyi*, decidimos pela realização, em meio de ágar-nutritivo comum, das indispensáveis investigações preliminares relativas à determinação das percentagens de sangue de coelho e de ágar-ágar, respectivamente, mais indicadas para uma multiplicação satisfatória do germe. A seguir, experimentamos, separadamente, a adição, a essas bases culturais, dos carboidratos seguintes, comumente utilizados para aumentar o teor nutritivo dos meios de cultura em geral: dextrose, lactose, sacarose e amido.

Aliás, NICOLLE (1923) havia já experimentado o amido em meio semi-sólido (gelose mole + traços de sangue desfibrinado de coelho) para a conservação do bacilo; mas não demorou a substituir êste meio por outro melhor, sem o amido. Entre nós, ASSIS (1926), trabalhando com meio líquido, adicionou-lhe a dose de 0,5 a 1,0 por 1.000 de dextrose, com o que verificou que o aspecto da cultura não se alterava, enquanto que a sua vitalidade desaparecia tanto mais rapidamente quanto maior a percentagem do carboidrato, responsabilizando por tal ocorrência o excesso de acidez desenvolvido no meio; e CUNHA (1943), trabalhando com meio sólido, em que o sangue de cavalo entrava na percentagem de 50%, ajuntou-lhe também 1% de dextrose (glicose). Das nossas experiências sôbre a adição de carboidratos à base sólida que viria a receber, por último, o sangue desfibrinado de coelho, verificamos que o amido e a dextrose parecem ter melhor influenciado o desenvolvimento do bacilo que a lactose e a sacarose. Por último, ocorreu-nos também experimentar um alimento natural de notória atividade energética — a batata, usada aliás há muito tempo nos meios destinados a germes de difícil crescimento. A junção, em dose substancial, ao meio de cultura,

de uma infusão de batata glicerolada, adicionada de 2% de glicerol, foi sem dúvida decisiva na escolha definitiva da sua fórmula, visto que, a partir de então, começamos a ter culturas verdadeiramente luxuriantes do *H. ducreyi*.

FÓRMULA E PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

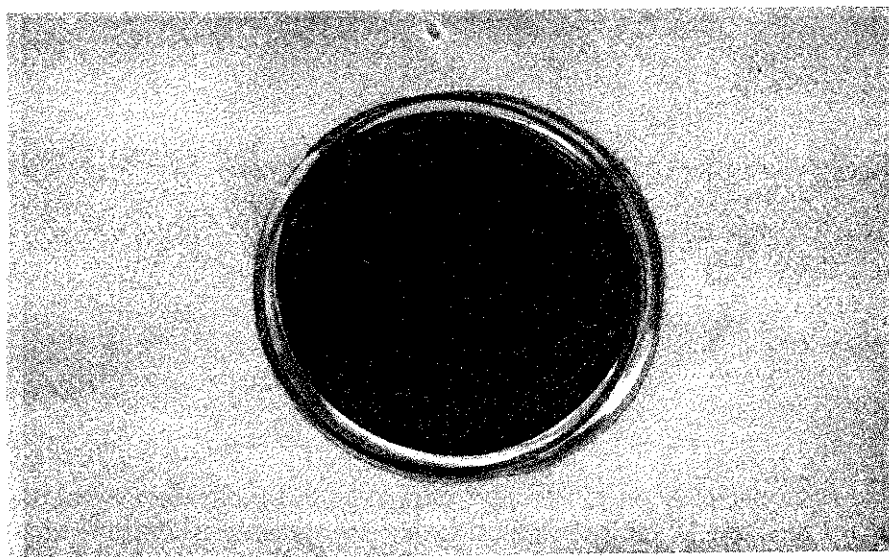
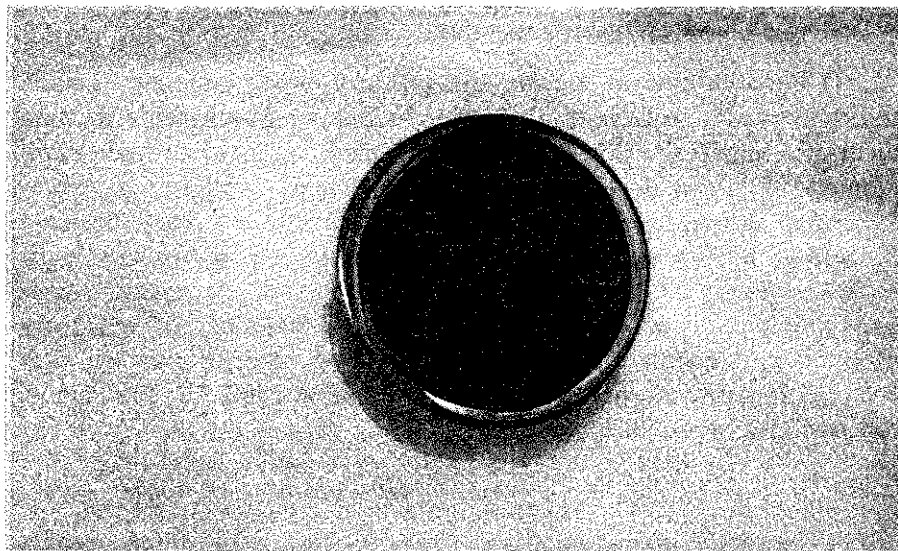
Infusão de batata glicerolada	600,0 ml
Água destilada	400,0 ml
Peptona	10,0 gr
Cloreto de sódio	5,0 gr
Extrato de carne	1,0 gr
Ágar (tipo japonês)	32,0 gr

Prepare a infusão de batata fervendo 1.000 gr de batatas descascadas e cortadas em fatias, em 2.000 ml de água destilada adicionada de 40 ml de glicerol neutro. Após cozedura, mexer e passar o todo em gase. Complete o volume primitivo com água destilada. A 600 ml dêste extrato de batata (os restantes 1.400 ml serão autoclavados e guardados para uso oportuno), adicione 400 ml de água destilada e os demais ingredientes constantes da fórmula acima. Autoclave 20 minutos a 121° para dissolução. Complete o volume com água destilada e ajuste ao pH 7,6. Filtre em algodão. Distribua 7 ml em tubos 18 x 180 mm ou 140 ml em balões de 200 ml. Autoclave 20 minutos a 120° C. Conserve êste ágar básico em geladeira até ser usado.

A fim de completar a preparação do meio, ponha o ágar básico (tubos ou balões) em banho fervente até completa fusão, deixando-o a seguir à temperatura de 48-50° C. Se estiver trabalhando com os tubos, ajunte, a cada um, 3 ml de sangue desfibrinado de coelho, e, após leves movimentos para mistura do meio, incline-os ou, se necessário, utilize-os para preparação de placas. Se, porém, estiver trabalhando com o balão, ajunte-lhe 60 ml do sangue, agite-o para mistura do meio e, por meio de pipetas, distribua-o em tubos ou placas. Após contrôle de esterilidade durante 24-48 horas em estufa a 37° C, o meio poderá ser usado.

CONSERVAÇÃO. UTILIZAÇÃO DO MEIO PARA TRANSPLANTE E ISOLAMENTO DO GERME

O meio de cultura contido em tubos mantém-se em boas condições para transplantes ou repiques durante cêrca de 30 dias.



Figs. 1 e 2 — Aspectos do crescimento do *H. ducreyi* em placas contendo o meio de cultura descrito, após 72 hs de incubação.

bastando para isso que seja conservado à temperatura de 3° a 5° C, e que se lhe refaça, com solução salina, a quantidade de água de condensação eventualmente perdida.

O meio de cultura contido em placas é, habitualmente, o mais indicado para o isolamento do bacilo de Ducrey diretamente de uma ulceração venérea. Como, porém, êste meio se ressentir mais rapidamente da falta de umidade do que os meios contidos em tubos, é preciso usá-lo logo depois da sua preparação, e indiretamente hidratá-lo, após a sementeira, por meio de algumas gotas de solução salina esparsas na superfície interior da tampa da placa. Após esta precaução, a placa, com a tampa voltada para baixo, será posta numa estufa regulada a 32-34° C, em cujo interior, um ou dois recipientes contendo permanentemente água, garantirão, finalmente, um perfeito grau de umidade ambiente.

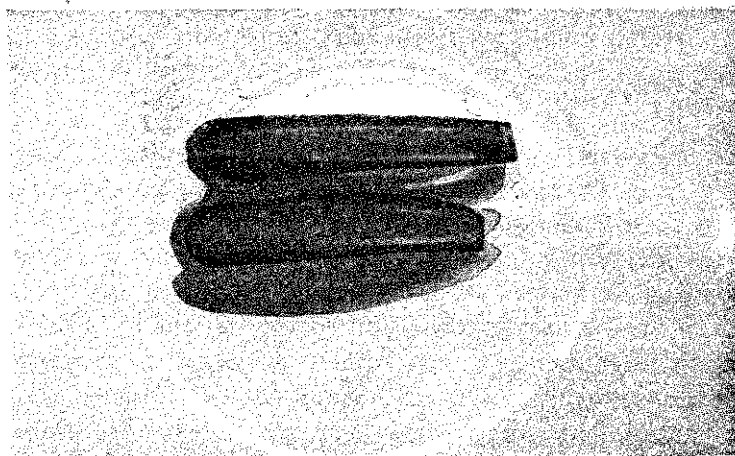
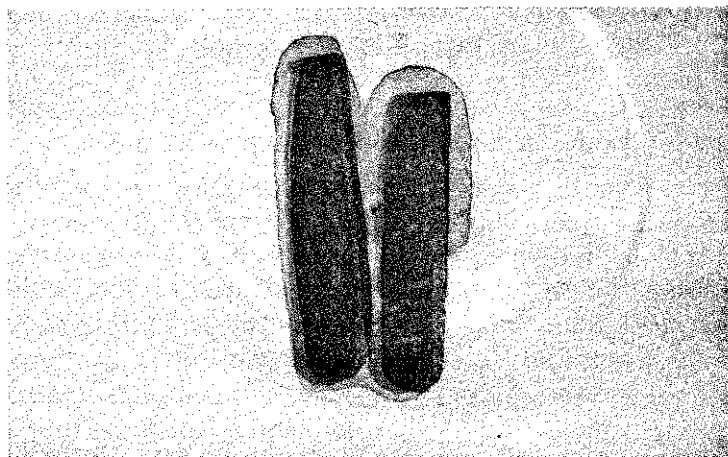


Fig. 3 — Outro aspecto da mesma cultura.

O transplante do *H. ducreyi* para êste meio, obedecidos os detalhes técnicos já indicados, resulta em crescimento realmente exuberante do germe. As fotos coloridas que ilustram êste trabalho darão, por certo, melhor que quaisquer palavras, uma idéia mais justa e expressiva sôbre o assunto. Elas representam transplantes do bacilo, tanto em tubos como em placas, depois de 48 horas de

permanência em estufa regulada a 32-34° C, sob as condições de umidade anteriormente descritas. Para melhor apreciação do desenvolvimento do germe em superfície inclinada, tratamos primeiramente de retirar, cuidadosamente e por inteiro, o meio de cultura contido no tubo, para em seguida fotografá-lo.

No que se refere à vitalidade do bacilo de Ducrey nos tubos contendo êste meio de cultura e mantidos em estufa, podemos escl-



Figs. 4-5 — Aspectos do crescimento do *H. ducreyi* em tubos.

recer que ela é perfeitamente viável durante cêrca de 12 dias, uma vez que, cada dois ou três dias, seja a superfície do meio convenientemente molhada pela água de condensação própria ou adicional.

Atualmente, porém, com o advento dos modernos métodos de liofilização, o velho problema da conservação das amostras bacterianas nos próprios meios de cultura já está completamente superado. Nossas amostras de *H. ducreyi*, liofilizadas, estão sujeitas apenas a um transplante anual, que jamais falhou, e poderão ser manipuladas durante vários anos, sem que venham a perder suas características iniciais.

ALGUNS DADOS TÉCNICOS REFERENTES AO ISOLAMENTO DO BACILO

Resta-nos, agora, examinar o procedimento a ser seguido para se obter o isolamento do bacilo dos focos de infecção.

Tratando-se de colheita de secreção de um cancro mole secundário, provocado pela auto-inoculação de material oriundo de um cancro mole primitivo genital, o problema do isolamento do germe não oferece maiores dificuldades, pois, com alguns cuidados de assepsia observados na técnica da auto-inoculação, completados por uma colheita precoce de material da lesão inicial, já teremos garantido, via de regra, para as sementeiras, um inóculo apresentando grau relativamente baixo de contaminação secundária. Esta foi, aliás, a técnica para o isolamento do germe preconizada por REENSTIERNA (1923) e, em seguida, adotada integralmente por NICOLLE (1924). Este último autor, tratando do assunto, refere que, entre inúmeras tentativas frustradas, conseguiu, por acaso, apenas uma vez, o isolamento do estreptobacilo de Ducrey diretamente das ulcerações genitais.

Na hipótese, porém, de defrontarmos com uma complicação linfática da ulceração venérea (bubão inguinal, bubônulo do corpo peniano), o isolamento do germe em cultura pura poderá ser tentado pela sementeira do pus obtido por simples punção dessas lesões supuradas e fechadas. É sem dúvida curioso o fato, por vészes observado, de o material purulento colhido de complicação linfática do cancro mole, nem sempre revelar a presença do germe, seja em exames culturais nos meios adequados, seja mesmo em simples exames diretos nas preparações coradas. A propósito desse assunto, não será demais lembrar aqui alguns dentre os investigadores que dêle se preocuparam. RICORD (1838), baseando-se em centenas de auto-inoculações, positivas e negativas, de materiais oriundos de adenites supuradas conseqüentes a lesões venéreas ulcerosas, chegou à conclusão de que devia haver dois tipos diversos de bubões:

um, simples, de natureza apenas inflamatória ou simpática, e outro, originário do cancro mole ou sintomático, contendo um pus sempre inoculável, tal como se fôra o da própria lesão venérea. Entretanto DUCREY (1889), ao aplicar o mesmo método experimental em 60 pacientes, portadores também de adenites supuradas, não logrou nenhum sucesso. BENZANÇON e colaboradores (1901), já então apoiados em seu meio de cultura, obtiveram de pus de bubão inguinal de 2 doentes, 2 culturas positivas, muito embora não tivessem encontrado nenhum bacilo nos esfregaços de pus de um dos doentes. SIMON (1902) relatou também 2 culturas positivas de 2 casos examinados, e DAVIS (1903) 2 culturas positivas de 6 casos.

Das nossas observações sôbre cancro moie, constam 12 casos de bubão supurado e íntegro. O pus de cada um, obtido por punção, foi examinado do ponto de vista cultural, no nosso meio de cultivo, e também do ponto de vista bacterioscópico, em lâminas coradas pelo Gram. Cinco das nossas sementeiras resultaram positivas para o *H. ducreyi* (41,6%), e 7 foram negativas.

Com relação aos exames bacterioscópicos a que foram submetidos os esfregaços de pus, após coloração pelo Gram, devemos salientar que, dos 5 casos com cultura positiva, apenas 1 permitiu o achado relativamente fácil de alguns bacilos esparsos e com os caracteres morfológicos do *H. ducreyi*. Nos 4 esfregaços restantes, entretanto, os bacilos, além de muito raros, apresentavam também uma estranha morfologia, com seus corpos cêrca de 3 a 4 vêzes mais longos e mais largos que as formas habitualmente encontradas nas ulcerações ou nas culturas. Como elemento característico do bacilo, essas formas involutivas revelavam, tão sòmente, uma discreta hipercoloração nas suas extremidades. Por outro lado, os exames bacterioscópicos do pus dos 7 casos, que, em cultura, nada haviam revelado, foram igualmente negativos.

O estágio de evolução (inicial ou final) dos bubões inguinais, na totalidade dos casos, jamais se mostrou relacionado com a positividade ou negatividade do germe no pus. É pois de se supor que, tanto a presença de bacilos vivos nos bubões, por vêzes raros e sob formas involutivas, como a sua ausência, por possível lise, devam estar relacionadas com a maior ou menor capacidade orgânica do paciente na produção de anticorpos.

Cabe-nos, finalmente, referir algo daquilo que durante muitos anos fomos observando e aos poucos modificando, sôbre o procedi-

mento técnico a se adotar sempre que se tenha em vista o isolamento do bacilo, partindo-se de inóculo originário de um cancro mole primário.

Os pesquisadores que se têm dedicado ao isolamento de *H. ducreyi* dessa fonte original, certamente não desconhecem as inúmeras dificuldades e frustrações a que ficam expostos para a consecução desse desiderato. Uma das principais causas dessas dificuldades, independe completamente da nossa vontade, e vem a ser o fato de o doente apresentar-se sempre tardiamente para as primeiras provas laboratoriais, do que naturalmente resulta a proliferação de uma ilimitada flora bacteriana secundária, em pleno foco ulceroso. Ao lado dessa causa, outras ainda poderão ser mencionadas, como a difícil manutenção, por 24 ou 48 horas, de pensos assépticos protetores, em lesões localizadas na maior parte das vezes nas mucosas, e também a excessiva sensibilidade da região onde, habitualmente, se assesta o processo infeccioso.

Os numerosos doentes portadores de cancro mole que, outrora, eram encaminhados ao Laboratório Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, para confirmação diagnóstica pelo exame bacterioscópico do pus ou pela reação intradérmica de Ito, despertaram, naturalmente, nosso interesse no tocante ao isolamento do germe, diretamente do foco ulceroso venéreo.

Valendo-nos, por um lado, do meio sólido de cultura então indicado por vários pesquisadores (ágar nutritivo a 3% adicionado de 30% de sangue desfibrinado de coelho) e, por outro lado, de materiais colhidos de lesões ulcerosas que, 48 horas antes, a fim de prevenir contaminações secundárias, haviam sido convenientemente limpas e desinfetadas com álcool iodado, e a seguir impermeabilizadas com colódio, e recobertas com esparadrapo, pudemos então obter duas primeiras amostras de bacilo de Ducrey, isoladas diretamente de cancros moles genitais. Devemos esclarecer, neste passo, que LIPINSKI (1925), sem que o soubéssemos, havia, vários anos antes, publicado um excelente trabalho em que mencionou o uso do colódio como um recurso adjuvante na técnica de isolamento do germe.

As duas amostras isoladas vieram juntar-se outras, inclusive algumas originárias de pus de adenite inguinal. Dentre as que contavam menor número de passagens, duas foram utilizadas como indicadoras de crescimento do germe no decurso das provas que, a

pouco e pouco, fomos realizando até chegar à fórmula do meio de cultura apresentada no início dêste trabalho.

A acentuada queda verificada no número de casos de cancro mole no decorrer dêste último decênio, queda essa verificada pelo uso terapêutico intensivo das sulfonamidas e dos antibióticos, veio, evidentemente, refletir-se, mais acentuadamente, sôbre as dificuldades antes já existentes em obter-se culturas novas, recém-isoladas, do *H. ducreyi*, que são de tanto interêsse para o perfeito conhecimento de alguns aspectos ainda pouco esclarecidos da biologia do germe, como por exemplo, os relacionados com as suas atividades bioquímicas.

Não foi outra a razão de, retornando ao assunto de isolamento do germe da lesão venérea, aproveitarmos os raros doentes de agora, para algumas experiências com uma substância capaz de agir eficazmente sôbre os germes habituais de contaminações que constituem, como se sabe, um sério entrave ao isolamento do bacilo de Ducrey, de um cancro mole primário. Essa substância vem a ser o ácido rosólico, conhecido corante e indicador cuja ação inibidora (bacteriostática) sôbre as bactérias Gram-positivas, tanto em meios líquidos como em sólidos, isentos de componentes de sangue foi já referida em publicações feitas respectivamente por BRONFENBRENNER e col. (1920) e por CALAZANS & PESTANA (1932), quando do estudo sôbre meios seletivos para o isolamento de enterobacteriáceas patogênicas.

Prepara-se a solução do corante inibidor, dissolvendo-se 1 g de ácido rosólico (Merck) em 50 ml de álcool absoluto, completando-se o volume de 100 ml com água destilada. Desta solução mãe retira-se 0,1 ml que será diluído em 9,9 ml de solução salina estéril, obtendo-se assim uma solução cuja concentração em ácido rosólico corresponde a 0,01 g %. Se a solução fôr ácida (côr amarela) ajunta-se-lhe carbonato de sódio diluído a 1%, gôta a gôta, até que eia se torne levemente alcalina (côr levemente rósea). Em cêrca de 1 ml desta solução, depositam-se então 3 ou 4 alças do material (livre de sangue) colhido daquela mesma lesão ulcerosa que, 48 horas antes, havia já sido convenientemente isolada pelo colódio. A suspensão de pus é agitada e posta em estufa a 32-34° C, retirando-se-lhe, 4, 8 e 24 horas depois, parcelas do seu sedimento para semeadura, em placas que, por sua vez, serão incubadas de acôrdo com as especificações já referidas.

É claro que o tratamento prévio do inóculo não poderá impedir totalmente o aparecimento, nas placas, de algumas colônias de

contaminação; porém estas, por serem raras e esparsas, não comprometerão o crescimento posterior das colônias características do *H. ducreyi*.

A frequência do cancro mole, como já referimos, caiu, ultimamente, para índices extremamente baixos, sendo difícil o encontro de casos até mesmo nos ambulatórios hospitalares. Isso não impediu, entretanto, que dos poucos casos à nossa disposição pudéssemos isolar algumas novas amostras do bacilo, utilizando-nos do meio de cultura e da técnica de colheita preconizados neste trabalho.

É óbvio que o meio de cultura de que tratamos revelou-se igualmente eficiente para a proliferação de outras espécies filiadas ao gênero *Haemophilus*, e também para *Bordetella pertussis*, que pôde, inclusive, ser facilmente isolada pela exposição das placas ao alcance das partículas mucosas expelidas pelo doente no momento da tosse.

Deixamos aqui consignado nosso cordial agradecimento a D. Filomena B. M. Jordão e a D. Maria Nydia de Castro, pelo auxílio técnico e bibliográfico que, respectivamente, prestaram no decurso deste trabalho.

RESUMO

São recordados, inicialmente, os métodos experimentais de auto e hetero-inoculações humanas através das quais pôde Ducrey cultivar, no próprio foco ulceroso, da 6.^a à 15.^a geração, e em condições de absoluta pureza, o bacilo que êle julgava ser o único germe responsável pelo cancro mole, e ao qual ficou seu nome definitivamente ligado. Ê ressaltada, depois, a importância do aparecimento do meio sólido fundamental proposto por Benzangon e colaboradores para a cultura do bacilo (ágar-sangue de coelho), e também mencionadas, de passagem, as principais modificações nêle introduzidas por alguns pesquisadores, visando a torná-lo mais favorável ao desenvolvimento do germe.

Nesse mesmo sentido resolveu o A. experimentar, também, uma série de alimentos de alto teor nutritivo, optando, afinal, por uma fórmula de meio de cultura em cuja composição figurasse, de modo substancial, uma infusão de batata adicionada de 2% de glicerol. Essa fórmula, detalhadamente descrita no texto, deu-lhe culturas realmente luxuriantes do *H. ducreyi* (transplantes em placas e tubos), como se pode observar nas fotos que ilustram o trabalho. Depois de fazer referências sobre o modo de utilização e

de conservação do meio, o *A.* passa finalmente à questão do isolamento do bacilo dos focos de infecção, que expõe da maneira como a seguir vai sintetizado:

Se a secreção purulenta destinada à obtenção do bacilo provier de um cancro mole secundário provocado por auto-inoculação, o isolamento do germe não oferecerá maiores dificuldades, contanto que o material seja colhido precocemente da lesão e semeado em placas sob boas condições de umidade. A umidade das placas será facilmente obtida pela deposição, na superfície interna das respectivas tampas, de algumas gotas esparsas de solução salina. As placas serão colocadas, invertidas, em estufa regulada a 32° - 34° C cuja umidade ambiente será mantida por 2 recipientes contendo água. Exame das placas 48 a 72 h depois.

Por outro lado, tratando-se de pus originário de complicação linfática (bubão inguinal), a semeadura dêsse material diretamente em tubos, poderá ou não, dar desenvolvimento ao bacilo. A êsse propósito, refere o *A.* a semeadura de pus de 12 bubões fechados, conseqüentes a cancro mole, obtendo 5 culturas positivas para o *H. ducreyi* (41,6%) contra 7 negativas. Examinando, porém, os esfregaços de pus dos 5 casos positivos nas culturas, só dificilmente encontrou bacilos, os quais, além de muito raros, apresentavam uma morfologia involutiva (comprimento e largura 3 a 4 vezes maiores que o normal), mantendo, porém, como única característica, uma discreta hipercoloração das extremidades.

A última hipótese a ser considerada — sem dúvida a mais complexa, pela concorrência dos germes de contaminação secundária — é o isolamento do bacilo do próprio foco ulceroso primário. Frente a essa oportunidade, o *A.* aconselha o uso da seguinte técnica que lhe tem facilitado a obtenção de algumas amostras do germe: o cancro mole deverá sofrer uma limpeza e desinfecção prévias com álcool iodado, seguidas de impermeabilização com colódio e esparadrapo; após 48 horas, 3 a 4 alças do pus (livre de sangue) da lesão, serão agitadas em tubo contendo 1 ml de uma solução de ácido rosólico com concentração igual a 0,01 g %. (Ácido rosólico Merck 1 g, álcool absoluto 50 ml, água destilada até completar 100 ml. Diluir 0,1 ml desta solução em 9,9 ml de solução salina e usá-la para o fim indicado.) A suspensão do pus na solução rosólica é agitada e posta na estufa a 32-34° C, retirando-se 4, 8 e 24 horas depois, parcelas do seu sedimento para semeaduras em placas que, por sua vez, serão incubadas, de acôrdo com as especificações atrás mencionadas.

Com a técnica descrita, o A. procurou adaptar a já conhecida ação inibidora (bacteriostática) do corante e indicador — ácido rosólico — para bactérias Gram-positivas em geral, quando em meios de cultura isentos de componentes do sangue, ao isolamento do *H. ducreyi* presente em secreções sempre contaminadas por diversos tipos daquelas bactérias.

É óbvio, finalmente, que o meio de cultura que o A. acaba de apresentar, revelou-se igualmente eficiente para outras espécies do gênero *Haemophilus*, sendo que *Bordetella pertussis* pôde ser também facilmente isolada pela exposição das placas ao alcance das partículas mucosas expelidas no momento da tosse.

SUMMARY

The author examines the technique used by Ducrey in obtaining pure cultures of *Haemophilus ducreyi* by the inoculation of infectious material in humans, and notes that the culture could be maintained pure from six to fifteen passages. He emphasizes the use of blood agar as proposed by Benzangon and associates, and describes some of the most important modification of this medium.

The author then presents a new medium for the isolation of *H. ducreyi*, essentially a 2% glicerol in potato infusion, arrived at after considerable testing of a variety of substances. He gives detailed instructions for the preparation, use, and storage of the new medium.

For the collection of clinical material, subsequent incubation, and isolation, he presents the following technique:

After thoroughly cleaning the lesion, disinfection is achieved by iodine diluted in alcohol. The lesion is then covered with a film of collodion or tape for 48 hours, after which, 3 to 4 loopfuls of pus (free of blood) are taken from the lesion and inoculated into tubes containing 1 ml. of a solution of 0.01 % rosolic acid. (Rosolic acid Merck 1 gm.; alcohol 50 ml.; distilled water to make 100 ml.; 0.1 ml. is diluted in 9.9 ml. of saline.) In this preliminary processing the rosolic acid acts bacteriostatically on Gram-positive bacteria.

After shaking, the tubes are incubated at 32° - 34° C, and at intervals of 4 - 8 and 24 hours, portions of the settled sediment are seeded in the new medium, the plates of which are kept humid

by the use of a few drops of saline on the inside cover of the Petri dish. The plates are then inverted and incubated for 48 - 72 hours at 32 - 34° C.

The author obtained a 41.6 % recovery of *H. ducreyi* on a series of 12 closed infected lymph-nodes. In all cases, he noted that on microscopic examination, the bacilli showed a distinct morphology, their size being three to four times larger and broader than the normal bacilli and that they characteristically stained heavier at their ends.

The new medium described provides a very luxuriant growth of *H. ducreyi*, as seen in figures 4 and 5 and has proven an excellent medium for other species of the genus *Haemophilus* even *Bordetella pertussis* was easily isolated in the medium by the cough plate method.

BIBLIOGRAFIA

ASSIS, A. — Sur la biologie du bacille de Ducrey. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 95: 1003-1009, 1926.

BENZANCON, F., V. GRIFFON & L. LE SOURD — Recherches sur la culture du bacille de Ducrey. *Ann. Derm Syph.*, 2: 1-20, 1901.

BRONFENBRENNER, J., M. J. SCHLESINGER & D. SOLETZKY — On methods of isolation and identification of the members of the colon-typhoid group of bacteria. *J. Bacteriology*, 5: 79-87, 1920.

CALAZANS, S. C. & B. R. PESTANA — Emprêgo do ácido rosólico no isolamento e identificação dos bacilos do grupo coli-tífico-disentérico em meios sólidos. *Mem. Inst. Butantan*, 7: 285-302, 1932.

CUNHA, R. — Estudos sobre o *Hemophilus Ducreyi*. *Bol. Inst. Vital Brasil*, 25: 13-28, 1943; *O Hospital*, Rio de Janeiro, 23: 393-407, 1943.

DAVIS, L. — Observations on the distribution and culture of the chancroid bacillus. *J. Med. Research*, 9: 401-415, 1903.

DUCREY, A. — Recherche sperimentali sulla natura intima del contagio dell'ulcera venerea e sulla patogenesi del bubbone venereo. *Giorn. ital. Malat. Ven.*, 24: 377-425, 1889.

FERRARI, P. — Apud A. Ducrey, Op. cit. — Il Bacillo dell'ulcera molle. Comunicazione all'Accademia Gioenia, 26 luglio 1885.

ISTOMANOFF, S. S. & G. AKSPIANZ — Apud L. Davis, Op. cit. — Zur Bakteriologie des weichen Schankers. *Jahresb. Path-Mikro-org.*, 14, 1898.

LENGLET, M. — Note sur le bacille de Ducrey et sur les milieux "humanisés". *Ann. Derm. Syph.*, 2: 209-230, 1901.

LIPINSKI, W. — Recherches biologiques et expérimentales sur le Streptobacille de Ducrey. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 93: 657-661, 1925.

MORISON — Apud A. Ducrey, Op. cit. — Ueber das Vorkommen von Bakterien bei Syphilis. *Wiener med. Wochenschrift*, n. 3, 1883; referirt. i.d. *Vierteljahresschrift f. Dermat. und. S.*, 1883, p. 402.

NICOLLE, C. — Isolement, culture et conservation dans les laboratoires du Streptobacille du chancre mou. *Comp. rend. Soc. Biol.*, 88: 871-873, 1923.

NICOLLE C. & P. DURAND — Nouvelles recherches sur le chancre mou. Son traitement par les inoculations intraveineuses du vaccin antistreptobacillaire. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 13: 243-272, 1924.

PETERSEN, W. — Ueber Bacillen befunde beim Ulcus molles. *Zentralb. Bakter.*, 13: 743-748, 1893.

REENSTIERNA, J. — Recherches sur le bacille de Ducrey. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 12: 273-312, 1923.

RICORD, Ph. — Traité pratique des maladies vénériennes ou recherches critiques et expérimentales sur l'inoculation appliquée à l'étude de ces maladies. Librairie des Sciences Médicales, Paris, 1838.

SIMON, M. L. G. — Présence du bacille de Ducrey dans le pus de bubons chancrelleux. *Compt. rend. Soc. Biol.*, 54: 547-548, 1902

TOMASCZEWSKI, E. — Bakteriologische Untersuchungen über den Erreger des Ulcus molle. *Zeitschr. Hyg.*, 42: 327-340, 1903.

UNNA, P. G. — Der Streptobacillus des weichen Schankers. *Monatsh. prakt. Derm.*, 14: 485-490, 1892.

UNNA, P. G. — Die verschiedenen Phasen des Streptobacillus ulceris mollis. *Monat. prakt. Derm.*, 21: 61-81, 1895.