

O grupo *pullorum-gallinarum* em provas bacteriológicas comparativas *

por

Genesio Pacheco
do Instituto Oswaldo Cruz

e

Celso Rodrigues
do Instituto Biológico de São Paulo

(Com 6 estampas e 2 graphicos)

O agente etiologico do typho aviario foi descripto por Klein em 1889 sob o nome *Bacterium gallinarum*, numa descripção incompleta de que resultou ser o germen redescrito em 1895 por Moore, sob o nome de *Bacterium sanguinarum*, e por Pfeiler em 1917, como *Bacterium typhi gallinarum alcalifaciens*. Reverificações posteriores demonstraram que estas tres denominações se referiam á mesma bacteria.

Em relação á diarrhéa branca, a attenção dos pesquisadores foi attrahida para ella em fins do seculo passado, porque affectou seriamente as criações industriaes de aves, incipientes nos Estados Unidos naquella epocha. Em consequencia dos trabalhos dos pesquisadores americanos, com especialidade Rettger e colaboradores, foi determinado como agente causador da doença, o *Bacterium pullorum*, descripto por Rettger & Harvey. Este germen e a infecção causada por elle, foram objecto de minuciosos estudos, realisados principalmente na Estação Experimental de Storrs, U. S. A., entre 1900 e 1914. Graças a trabalhos continuados puderam ser resolvidas questões essenciaes da pathogenia da diarrhéa branca: a capacidade infectante do germen tambem para a ave adulta, o papel desta como reservatorio do virus, em consequencia de infecção chronica do ovario, levando a contaminação do conteúdo do ovo antes de sua postura e nascimento do pinto já contaminado e, finalmente, a existencia de dois typos culturalmente differentes de *pullorum*, um gazogeno e outro não gazogeno. Com o progresso dos conhecimentos bacteriologicos sobre este germen, assim como sobre o do typho aviario, a identidade antigenica de ambos, e a semelhança bacteriologica entre o typo não gazogeno do *pullorum* e o *gallinarum*, levaram numerosos investigadores a admittir serem todos elles typos differentes de uma mesma especie. Apoiavam-se, para isto, em verificações sobre a possibilidade de se transformar um typo *pullorum* gazogeno em outro não gazogeno,

Recebido para publicação a 7 de Abril de 1936 e dado a publicidade em Setembro de 1936.

e vice-versa, em irregularidades na fermentação da maltose, utilizada para diferenciação dos dois germens *pullorum* e *gallinarum*, e na possibilidade de se infectarem com o *pullorum* galinhas e pintos. Esta tendencia assumiu caracter definitivo quando, na Reunião do Congresso Internacional de Veterinaria de Londres, em 1930, as opiniões foram favoráveis á reunião dos typos descriptos como causa da diarrhéa dos pintos e do typho aviario em uma especie unica.

Tendo isolado em 1930, de pinto Leghorn de uma Granja de São Paulo, Brasil, uma amostra do typo *pullorum* não gazogeno, occorreu-nos estudal-a durante um periodo largo de tempo, afim de surprehender quaesquer modificações nas suas propriedades, conjunctamente a numerosas amostras dos typos *pullorum* e *gallinarum*, gazogenas e não gazogenas, obtidas de varios pesquisadores europeus e americanos. Consistiram essencialmente nossos estudos em examinar periodicamente, durante tres annos, os caracteres culturaes de cada amostra.

Dois pontos principaes prendiam nossa attenção desde o inicio: a possibilidade de transformação do typo gazogeno do *pullorum* em outro não gazogeno, ou vice-versa, e a possibilidade de uma acção irregular sobre a maltose. Ora, sendo estes dois elementos essenciaes na caracterização dos tres differentes typos até então reconhecidos, seria em torno de sua fixidez ou variabilidade, pelo menos do ponto de vista bacteriologico, que se poderia acreditar ou não na individualidade das especies ou typos do grupo *pullorum-gallinarum*.

MATERIAL DE ESTUDO

Reunimos 37 amostras, das quaes 3 foram isoladas no Brasil, e as restantes nos Estados Unidos ou na Europa. Eis sua relação, acompanhadas da sua proveniencia e precedidas da denominação que lhes demos:

a) Recebida do Prof. de Blicck do « Institut voor parasitaireen Infektiezieite da Ryku Universiteit », de Utreck, recebida em Março de 1930, rotulada:

G 36 — *Bacterium gallinarum* Klein, original;

b) Recebidas do Prof. Miessner, de Hannover, em Abril de 1930, rotuladas:

P 28 — Stamm H 1.009 (gaz +)

G 28 — Stamm 485 (gaz —).

P 26 — Stamm G 124 (gaz —)

P 29 — Stamm Kuecken 493 (gaz —);

c) Recebidas do Reichsgesundheitsamt de Berlim, em Março de 1930, rotuladas:

P 24 — Stamm Ovar IV, de Beller,

P 25 — Stamm Kuecken IV, de Beller

P 27 — Stamm Ovar Ausgang, de Beller;

d) Recebidas do Prof. Reese, do Rijksseruminrichting de Rotterdam, no segundo semestre de 1930 e rotuladas:

P 21 — *Pullorum* Flessmann

P 14 — *Pullorum* Adelshof

P 10 — *Pullorum* Schiedam

P 16 — *Pullorum* Voorst

P 7 — *Pullorum* Broos

P 20 — *Pullorum* Thyn

P 13 — *Pullorum* Keyser

e) Recebidas do Prof. Goodner, do Agricultural Experiment Station de Rhode Island State College, U. S. A., cujas indicações são extrahidas, a conselho seu, do Journal of Bact., v. 13, p. 130 e rotuladas:

P 4 — *Pullorum* 12, enviada por Gage do Mass. Agric. College, de gemma residual de pinto, recebida por elle em 1915

P 5 — *Pullorum* 124, enviada por Rettger, da Yale Univ., sob o nome B' — 15, recebida por elle em 1916

P 8 — *Pullorum* 125, idem, sob o nome R' — 15, recebida em 1916

P 19 — *Pullorum* 123, idem, sob o nome Cosgr., recebida em 1916

P 9 — *Pullorum* 129, enviada por Gage do Mass. Agric. Coll., sob o nome W 1, recebida em 1916

P 11 — *Pullorum* 118, enviada por Hadley, R. I., sob o nome « galinha adulta, New York », recebida em 1915

P 1 — *Pullorum* 122, enviada por Rettger da Yale Univ., sob o nome A' — 16, recebida em 1916

- P 12* — *Pullorum* 128, enviada por Gage sob o nome T—1, recebida em 1916
- G 27* — *Gallinarum* 115, enviada por Th. Smith, da Harvard Univ., sob o nome *Bacterium sanguinarum* original, de Moore, recebida em 1915
- G 31* — *Gallinarum* 163, enviada por C. B. Bull do « Rockefeller Institut », sob o nome *B. avisepticus*, recebida em 1917
- G 29* — *Gallinarum* 207, enviada pelo Institute Pasteur de Paris, sob o nome Aube, recebida em 1920
- G 32* — *Gallinarum* 116, enviada por Th. Smith, sob o nome F—T II, recebida em 1915
- G 30* — *Gallinarum* 206, enviada pelo Institute Pasteur de Paris, sob o nome Seine et Meuse, recebida em 1920;
- f) Adquiridas da American Type Culture Collection:
- P 2* — *Pullorum* 812, enviada por Buckley, isolada de ovario de galinha, amostra Allen
- P 15* — *Pullorum* 813, enviada por Buckley, isolada de ovario de galinha, amostra Roman
- P 3* — *Pullorum* 814, enviada por Buckley, isolada de sangue de pinto, amostra Covent
- P 22* — *Pullorum* 815, enviada por Buckley, isolada de sangue de pinto, amostra Hatch
- P 18* — *Pullorum* 819, enviada por Rettger, sob o nome W'—17.
- P 6* — *Pullorum* 820, enviada por Rettger, sob o nome Ov.—B—26, isolada de ovario de galinha.
- P 17* — *Pullorum* 814, enviada por Buckley, isolada de sangue de pinto, amostra Covent (P 3)
- G 37* — *Gallinarum* 811, de Buckley;
- g) Isoladas no Brasil:
- G 33* — Isolada de galinha pelo Dr. Calazans em 1927, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul
- G 34* — Idem

G 39 — *Pullorum* não gazogeno, isolado de galinha pelos autores, em São Paulo, em 1930.

Aproveitamos a oportunidade para agradecer aos Professores acima referidos a gentileza da remessa das culturas enviadas por solicitação nossa.

*
* *
*

De accordo com as informações originaes distribuir-se-iam as culturas acima enumeradas nos seguintes tyops:

- 1) *Pullorum* — P 24, P 25, P 27, P 21, P 14, P 10, P 16, P 7, P 20, P 13, P 4, P 5, P 8, P 19, P 9, P 11, P 1, P 12, P 2, P 15, P 3, P 18, P 6, P 17.
- 2) *Gallinarum* — G 36, G 27, G 31, G 29, G 32, G 30, G 37, G 33, G 34.
- 3) *Pullorum* «sensu lato» (Miessner)¹ — P 26, P 28, P 29, G 28.

No correr das investigações, entretanto, foi possível fazer com ellas novo agrupamento, que aqui antecipamos, para maior clareza na exposição:

- 1) *pullorum* não gazogeno — P 1, G 39.
- 2) *pullorum* gazogeno — P 2 a P 6, P 8 a P 13, P 15 a P 19, P. 22.
- 3) denominado por nós *intermedius* — P 7, P 14, P 20, P 21, P 24 a P 27.
- 4) *gallinarum* — P 29, G 27 a G 34, G 36, G 37.
- 5) *gallinarum* gazogeno? — P 28.

¹ Em carta que nos enviou, acompanhando as amostras acima referidas, o Prof. Miessner assignala a impossibilidade de separar *pullorum* de *gallinarum*, a vista das variações de suas propriedades bioquímicas, opinando, por isso, pela impossibilidade de ser mantida a denominação *Bacterium paradysenteriae* que anteriormente propuzera como meio de evitar o conflicto entre os nomes dados por Klein, Moore e Pfeiler. Prefere manter o nome específico *B. pullorum*, discordando do nome *B. gallinarum* para os germens desse grupo.

METHODOS DE TECHNICA

Sujeitamos essas amostras a um estudo bacteriologico completo, afim de servir de base a comparações futuras. Empregando technicas « standard », repetimos periodicamente, durante 3 annos, numa analyse das amostras estudadas tão detalhada como possivel, afim de surprehender qualquer modificação sobrevinda no decorrer desse tempo nas suas propriedades.

MORPHOLOGIA

No grupo em questão bem pouco importantes são os caracteres de fórma, que nada differem de outros generos bacterianos. Além do mais, mostraram-se elles uniformes: pequenos bastonetes, arredondados nas extremidades, não fixando o Gram, dispondo-se mais vezes isolados, uma vez por outra formando cadeias de poucos elementos. Em culturas liquidas são vistos pequenos filamentos, formados em tempo relativamente curto. Quanto ao tamanho os bastonetes eram de regra muito curtos, coccobacillares, ás vezes corados mais intensamente nas extremidades que na parte central, resultando a apparencia de um vacuolo arredondado no meio do corpo. Nas formas mais longas as extremidades eram menos arredondadas e a zona descorada central não era vista.

MOBILIDADE

Usamos em sua pesquisa o methodo classico da visão directa do deslocamento bacteriano em gotta pendente, utilizando culturas recentes em caldo peptonado, ou o methodo indirecto proposto por Hitchens. Consiste este na sementeira por picada central num agar semi-solido a 0.1 %. Si a bacteria é movel, ella invade em curto espaço de tempo todo o meio, turvando-o de maneira uniforme; cresce sômente numa linha de vegetação, si não é dotada de mobilidade. O methodo foi adoptado por Klimmer & Haupt para o exame da mobilidade em amostras de *pullorum* e *gallinarum*, com resultados concordantes com o exame classico da gotta pendente. Em nossas verificações augmentamos para 0.3 % o teor de agar do meio, para uma verificação mais nitida, eliminando tambem as possibilidades de erro por agitação accidentaes. Observações feitas com este meio concordam com os resultados de Klimmer & Haupt e se applicam perfeitamente ao exame da mobilidade nesse grupo. De vantajoso apresenta o methodo evitar interpretações pessoas, numa prova importante para o estudo desse genero bacteriano. Qualquer das duas technicas utilizadas permittiu catalogar todas as amostras

como imóveis, isto é, não se deslocando no campo microscópico, permanecendo em torno de limitado espaço, em movimentos molleculares oscilatorios, e crescendo em estrias, sem turvar o agar semi-solido de Hitchens. Controlamos a eficiencia das provas neste meio, com amostras de outras *Salmonellas*, e com representantes do genero *Proteus*.

MORPHOLOGIA DAS COLONIAS

Em meios solidos, devido á exuberancia mais pronunciada do *gallinarum*, suas colonias são de ordinario maiores que as de *pullorum*. Taylor em 1916 descreve as colonias de *gallinarum*, redondas, lisas, pouco elevadas, grandes, de textura finamente granulosa e de consistencia um tanto pegajosa, e as de *pullorum*, menores e mais elevadas. Suas verificações são confirmadas por Goldberg em 1917. Posteriormente, em 1927, occupam-se do assumpto Beck & Eber, em mais demorada analyse. Elles encontram no *gallinarum* colonias medindo 1 mm. de diametro, após um dia de incubação a 37°, apresentando coloração branco-cinza no meio de Drigalski; vistas á luz transmittida são transparentes; o *pullorum* cresce em colonias mais pequenas, medindo 1/2 mm., com um dia de incubação a 37°, attingindo a 1 e 1 1/2 mm. no segundo ou terceiro dias de crescimento em estufa a 37°.

Pela sua descripção, a morphologia das colonias de *pullorum* seria analoga a dos bacillos dysentericos, enquanto as de *gallinarum* se approximariam mais das salmonellas.

Tambem Lerche em 1929 descreve com minucias o aspecto das colonias em agar. Encontramos mais uma vez assinalado, entre suas referencias, serem as colonias de *pullorum* muito tenues neste meio, não obstante, com excepções; o centro em roseta, tambem foi por nós observado. Interessante, igualmente, é a verificação de Lerche, do apparecimento de pequenas colonias sobre o inducto crescido no agar semeado em estria, lembrando contaminação. Elle viu que o crescimento no agar é mais vigoroso com o *gallinarum* que com o *pullorum*. Esta observação foi recentemente confirmada por Edwards (1932), que observou ainda o apparecimento de colonias secundarias em 100 % de suas amostras, passíveis de serem seleccionadas, dando uma linhagem pura e que, entretanto, a não ser no modo de crescimento no agar, em nada mais se differenciam das culturas originaes.

Outra particularidade relevante na morphologia das colonias é a

produção do anel mucoso, encontrado no *gallinarum* por Gressel em 1927 e não visto no *pullorum* por Miessner & Berge, em 1928, propriedade considerada desvaliosa por Lerche, pois encontrou-a apenas em 13 de 67 amostras estudadas por elle e nem em todas nitidamente; dellas 6 eram gazogenas (*pullorum*) e 7 não gosavam desta propriedade.

Nada ha na litteratura além da referencia de Lerche e de Edwards, vista acima, quanto á produção de colonias filhas pelos dois germens, *pullorum* e *gallinarum*.

Quanto ao aspecto das colonias nos meios especiaes de isolamento das Eberthellas e Salmonellas, além do que foi dito acima em relação ás observações de Beck & Eber, encontram Konno, em 1929 e Pfeiler & Standfuss em 1919, o *gallinarum* produzindo colonias de tonalidade azul no meio de Drigalski e colonias incolores no meio de Endo. Lerche observa que o *pullorum* produz no Drigalski colonias muito delicadas, invisiveis a olho nu nas primeiras 24 horas de cultura, mas encontrou amostras desta bacteria crescendo exuberantes nesse meio. Houve algumas que attingiram até 3 e 4 mm. de diametro, conservando a tonalidade azul ou envermelhecendo levemente na parte central. Klimmer & Haupt em 1927-29 utilizam o meio de Gassner no estudo das colonias e encontram no *gallinarum* amostras com a fórma das bacterias do genero *Escherichia (coli)* nesse meio, isto é, colonias grandes, ao lado de outras pequenas, apresentando o aspecto de colonia de *Eberthella typhi (Salmonella typhosa)*.

Pfeiler & Standfuss verificam ainda que o *pullorum* vegeta mal no meio de Gassner. Beck & Eber concluem ser o meio de Gassner improprio á vegetação do *pullorum*, mal vegetando nelle; tal não succede com o *gallinarum*, que ahi cresce em colonias grandes, de tonalidade francamente amarella; o typo « proximo » do *gallinarum*, não fermentador da maltose, por elles descripto, produz colonias de tonalidade amarella pouco intensa. Klimmer & Haupt chegam a resultados analogos quanto á morphologia de colonias no meio de Gassner. Seu typo II de *pullorum*, que é igual ao que descreve Rettger, dá no meio de Gassner colonias pequenas, incolores; o typo I, que pode ser approximado do typo « intermediario » de Beck & Eber, dá nesse meio colonias amarellas e grandes. Recentemente Guenther, 1933, verifica tambem fraco desenvolvimento do *pullorum* no meio de Gassner, onde suas colonias são tenues e não excedem de 1 mm. de diametro, após muitos dias de incubação, deixando o meio inalterado. O *gallinarum* cresce ahi em colonias maiores, de côr amarello-esverdeado. Algumas amostras deram nesse meio colonias grandes e colonias pequenas, cujos caracteres biochimicos não as collocavam em typos differentes.

Ensaia Malmann o seu meio com essas duas salmonellas sem nada assignalar quanto á morphologia de colonias.

Nossas verificações de crescimento em agar simples confirmam inteiramente as dos outros investigadores em relação ao *pullorum* não gazogeno, constante productor nelle de colonias muito tenues e de lento crescimento. As amostras de *pullorum* gazogeno por nós acompanhadas quasi se não diferenciavam dos typos *intermedius* e *gallinarum* quanto ao aspecto da colonia e á exuberancia do crescimento. Entre elles é muito commum o centro apiculado, de tonalidade amarella, ou deprimido, pregueado e sem coloração. Estes aspectos do centro das colonias são bem visiveis no 3.º ou 4.º dia de crescimento a 37º. Nos typos *intermedius* e *gallinarum* não differem as colonias das colonias das *Salmonella paratyphi* (*B. paratyphosus* A), permanecendo com o centro sempre transparente. Impossivel tambem nos foi qualquer differenciação no induto em agar, a não ser com as amostras de *pullorum* não gazogeno, cujo crescimento foi constantemente delicado e finamente granuloso, crescendo os demais exuberantes, em induto liso.

Em relação aos meios selectivos, dirigimos nossa attenção inicialmente para a morphologia no de Holt-Harris & Teague, não empregado ainda no estudo da morphologia de colonias desses germens.

Neste meio nenhuma differença foi encontrada de particular na morphologia das colonias, mas serviu para estudo minucioso de seu aspecto. Tanto *pullorum* quanto *gallinarum* geraram nelle colonias de tamanhos variando entre 1,5 a 3,5 mm., em 72 horas; após 24 horas as colonias eram lisas, regularmente arredondadas, convexas, incolores, transparentes ou ligeiramente opacas, com centro negro ou arroxeadado, e bordos regulares. Havia ligeiras divergencias de uma amostra para outra, taes como aspecto levemente granuloso, bordos franjados. Taes divergencias foram tambem vistas em colonias da mesma amostra, na mesma placa de meio. Tambem appareciam variações de tamanho na mesma placa com a mesma amostra, dependendo de sua agglomeração. Os *pullorum* não gazogenos não foram estudados nesse meio.

Não referiram-se Malmann, Thorp & Sammes á morphologia de colonias no seu meio, proposto de 1928 especialmente para isolamento do *pullorum*; o meio contem verde brilhante na proporção de 1/200.000, como substancia impediante á flora de contaminação. Observamos nesse meio, após 24 horas de crescimento, a existencia de caracteres differenciaes entre as colonias de *pullorum* e *gallinarum*, ligando-se ao ultimo o typo « intermediario » descripto por Beck & Eber, Klimmer & Haupt.

Pode-se encontrar no quadro abaixo o resumo desses caracteres:

Quadro 1

Caracteres das colonias em meio de Malmann, após 24 horas de incubação a 37°.

Aspectos das colonias	<i>Pullorum</i> gazogeno, 15 amostras	<i>Pullorum</i> não gazogeno, 2 amostras	<i>Intermedius</i> 6 amostras	<i>Gallinarum</i> 9 amostras
Minusculas 1,5 mm.	7	1	0	0
Pequenas 1 - 1,5 mm.	2	1	0	0
Medias 1,5 - 3 mm.	4	0	1	3
Grandes 3 - 4 mm.	2	0	4	6
Incolores	15	1	5	9
Hyalinas	7	0	0	0
Opalescentes	5	1	3	2
Centro opaco	3	0	2	7
Superfície lisa	13	1	4	9
Superfície rugosa	2	0	1	0
Bordos regulares	12	1	4	7
Bordos ondulados	0	0	0	1
Bordos franjados	2	0	0	2
Conteúdo homogêneo	7	0	0	0
Conteúdo granuloso	8	1	5	9
Superfície brilhante	15	1	5	9
Foscas	0	0	0	0
Rasas	0	0	0	0
Pouco elevadas, convexas	3	0	4	7
Globosas	11	1	1	2
Apiculadas no centro	2	0	0	0

Percebe-se uma tendência á diferenciação dos typos nesse meio, si bem que houvesse casos de diferenciação duvidosa.

O *pullorum* produz no meio de Malmann colonias pequenas ou mesmo minusculas, incolores, hyalinas ou opalescentes, globosas, de superfície lisa, brilhante, com bordos regulares e conteúdo homogêneo ou levemente granuloso. Diverso é o aspecto do *gallinarum*, cujas colonias são de tamanho médio ou grande, convexas, incolores ou opalescentes, particularmente na parte central da colonia, de superfície lisa ou levemente rugosa, brilhantes, bordos regulares.

Foi encontrada em uma amostra de *pullorum* (P 11), o aspecto descrito por Kraus em 1919 para o *gallinarum*, isto é, formação de aneis excentricos, dando a impressão de concha. Parece-nos, no entanto,

ser esta apparencia da colonia devida exclusivamente á difficuldade de sua expansão regular, quando situada muito proxima de outras. Algumas vezes encontramos um botão central elevado, ou superfície montanhosa, nos *gallinarum* e no typo *intermedius*.

Outro meio utilizado para estudo das colonias foi o agar-ovo, supposto por nós apropriado ao desenvolvimento dessas bacterias, dada a preferencia do *pullorum* para fixar-se no ovario e no ovo. Entra em sua composição agar, caldo de carne commum, fundido e resfriado a 42º, addicionado de 10 % de gemma d'ovo, colhida asepticamente e não aquecida. Depois de bem misturada comprova-se a esterilidade durante 1 a 2 dias de estufa. A este meio foi ajuntado verde brilhante na proporção de 1 para 200.000.

Não nos permittimos opinar sobre seu valor como meio de isolamento porque não repetimos tentativas neste sentido em numero de vezes bastantes, mas resultados interessantes foram dados pelo aspecto das colonias.

Quadro 2

Caracteres das colonias crescidas no agar-ovo, observadas após 3 dias a 37º.

Aspectos das colonias	<i>Pullorum</i> gazogeno, 17 amostras	<i>Pullorum</i> não gazogeno, 1 amostra	<i>Intermedius</i> 7 amostras	<i>Gallinarum</i> 12 amostras
Grandes — mais de 3 mm.	4	0	0	8
Medias — 1,5 a 3 mm.	2	1	5	4
Pequenas — menos de 1,5 mm.	11	0	2	0
Não alteram o meio	11	1	1	6
Enverdecem o meio	5	0	6	6
Superfície lisa	7	0	1	5
Superfície rugosa	10	1	7	10
Esparramadas	1	0	3	3
Pouco elevas, chatas	7	1	6	8
Globosas	6	0	0	1
Apiculadas	5	0	0	4
Bordos regulares	6	0	2	1
Bordos ondulados	5	0	3	3
Bordos denteados	6	1	4	8
Brilhantes	13	0	3	4
Foscas	4	1	5	8

Mais frequentes foram o aspecto rugoso e secco e a tendencia ao esparramamento das colonias, parecendo ser o meio favoravel á formação deste typo de colonias. O *pullorum* aqui, mais que no meio precedente, fornece colonias pequenas, brilhantes e salientes, em predominancia

sobre o *gallinarum*, que as apresenta mais vezes maiores, mais esparradas, rugosas e sem brilho.

É de notar também que menos influem os *pullorum* sobre a tonalidade amarela do meio. A cor verde é provavelmente devida á acção da bacteria sobre o pH do meio, e como consequencia, sobre o verde-brilhante.

Examinamos as colonias crescidas em agar litmado preparado do seguinte modo: Agar caldo de carne a 2 % (ph 7,4), 100 cc.; Maltose purissima Merck, 1 gr.; Azolitmina Merck, em sol. a 1 %, 5 cc. Este meio, calcado no Drigalski, tinha por transparencia coloração azulada, levemente violacea.

Quadro 3

Aspectos das colonias em meio litmado, após 5 dias² a 37°.

Aspectos das colonias	<i>Pullorum</i> gazogeno, 6 amostras	<i>Pullorum</i> não gazogeno, 2 amostras	<i>Intermedius</i> 7 amostras	<i>Gallinarum</i> 7 amostras
Azulece o meio	2	2	3	0
Indifferente	4	0	0	0
Envermelhece o meio	0	0	6	7
Grandes colonias	2	2	3	6
Colonias medias	0	0	6	0
Colonias pequenas	4	0	1	11
Centro azul	4	2	3	0
Centro vermelho	0	0	4	7
Centro incolor	2	0	3	0
Hyalinas	4	0	0	0
Opalescentes	2	2	7	1
Opacas	0	0	7	6
Lisas	5	2	7	6
Rugosas	1	0	3	1
Globosas	1	0	0	4
Convexas	5	2	6	3
Rasas	0	0	1	0
Centro continuo	4	2	6	7
Centro elevado	3	0	0	0
Centro em cratera	0	0	1	0
Bordos regulares	4	1	6	1
Bordos franjados	3	1	0	6

² - Leitura tardia porque o meio era um tanto impediante ao crescimento.

Nota: - Outros caracteres foram menos importantes porque eram communs e constantes em todos os typos. Assim a superficie, humida e brilhante, a forma tendente a circular.

Infere-se do quadro ter o *pullorum* menor influencia sobre o meio que o *gallinarum*. As colonias *pullorum* são ahi em geral pequenas, redondas, convexas, hyalinas, lisas, humidas, brilhantes. Ha excepções, observadas com a mesma amostra, encontrando-se colonias que se approximam do *gallinarum*. O typo de crescimento mais simples é o observado com a amostra P 3, por exemplo, cujas colonias são pequenas, redondas, globosas, lisas, homogeneas, opalescentes ou levemente granuladas no centro; alcalinizam o meio. Variação foi encontrada com P 10, que apresenta evidente precipitado granuloso no centro da colonia, rodeado de um anel saliente, apparentando umbellicamento do centro da colonia. Não alcalinisa o meio. P 12 e P 13 acarretam precipitação central mais accentuada ainda. Todos elles (P 3, P 10, P 12 e P 13), crescem em colonias pequenas. G 39, *pullorum* não gazogeno, comporta-se de outro modo. Dá colonias grandes e razas, si bem que homogeneas, com pequena precipitação central, lisas, opalescentes. As colonias de sua companheira, não gazogena, P 1, differem della sómente por apresentarem bordos elevados, terminando bruscamente. Vimos typos *pullorum*, P 18 e P 22, gazogenos, produzirem colonias grandes, granulosas, razas, encaixilhadas por bordos elevados, ligeiramente crenelados e terminando bruscamente. Todas as colonias de *gallinarum* acidificam o meio, como era de esperar, graças á sua acção fermentativa sobre a maltose. Ellas se filiam no meio litmado a um padrão quasi uniforme. São grandes, incolores, com precipitado granuloso central, opacificando-se mais com o envelhecimento. São mais globosas que convexas, redondas, lisas ou ligeiramente rugosas, brilhantes e apresentam bordos franjados ou denteados, terminados em rapido declive. As variações deste typo « standard » dizem respeito aos bordos, denteados mais profundamente, como na G 34; nas amostras G 27, G 32 e P 28, o aspecto dos bordos era identico ao de algumas amostras *pullorum*, isto é, finamente crenelados. Duas vezes appareceram colonias mucosas, vistas em G 30 e G 36. P 29, outra amostra *gallinarum*, deu colonias pequenas, redondas, de bordos quasi lisos, inteiramente hyalinas, identicas as do typo *pullorum*.

O typo *intermedius* comportou-se como o *gallinarum*. Observamos nelle entretanto, grandes variações no tamanho das colonias na mesma placa, o que levou-nos a isolar e estudar inumeras dellas a ver se correspondiam a differenças culturaes, sem conseguir encontral-as. Suas colonias eram inicialmente lisas, convexas, quasi globosas, de tamanho médio e regulares nas dimensões. Agiam sobre o meio acidificando-o, com

regressão posterior, ou não actuavam sobre elle. Entre os 3.^o e 5.^o dias attingem o maximo de crescimento e iniciam expansões irregulares, azuladas, partidas debaixo dos bordos, alterando profundamente o aspecto regular da colonia. O centro da colonia, homogeneo no inicio da vegetação, dá, com o tempo, um precipitado escuro, cada vez mais intenso, propagando-se a toda colonia, opacificando-a. Depois do 5.^o dia processa-se uma transformação mucosa da colonia que a torna leitosa, aspecto que pode ser apreciado nas photographias 1 a 5, feitas com P 25, nas quaes se podem ver varias phases dessas transformações. Esse aspecto mucoso foi encontrado no *gallinarum* por Pfeiler & Hoepke, cujas amostras tendiam á confluencia. Entretanto, é opinião de Gressel, como tambem de Lerche, 1929, que só em placas de Gassner se observam colonias mucosas.

Usamos tambem o meio de Gassner, ultimamente preferido para a diferenciação do *pullorum* e *gallinarum*; é elle composto de agar lactosado e dois corantes associados, o wasserblau e o metachromgelb, indicadores de pH, acima e abaixo de 7,0.

Nossas observações combinam, em parte, com as dos pesquisadores referidos no inicio deste capitulo. Resulta da nossa experiencia que as colonias de *pullorum* vegetam bem nesse meio; os gozogenos produzem colonias de coloração fracamente amarella; os não gazogenos dão colonias incolores, ou mesmo levemente azuladas; o typo *intermedius* exhibiu-se como o *gallinarum*, que o amarellou francamente.

Neste capitulo podemos referir o que nos foi dado observar com um meio de agar chumbo, apropriado á verificação da producção de gaz sulphydrico. Nesse meio, 3 de 5 amostras *gallinarum* produziram, dentro de 20 dias, numerosas e exuberantes colonias-filhas, exactamente identicas ás observadas por Edwards (1932); este phenomeno foi observado apenas com uma amostra de *pullorum* e com uma de *intermedius*, dentre 12 desses dois typos examinados naquelle meio. O aspecto tambem foi citado por Lerche para o crescimento em induto no agar simples.

Um meio que se nos mostrou particularmente favorvel á producção de colonias filhas é o agar litmado sorbita, em placas. Essas formações ahi apparecem no 5.^o dia de cultura, quasi constantes nos *pullorum* gazogenos, *intermedius* e *gallinarum* (V. photographia 5).

EM RESUMO

Não é possivel extrahir, da analyse morphologica das colonias nos meios culturaes acima enumerados, elementos bastantes á distincção typica dessas bacterias. Fornece essa analyse, quando muito, dados auxi-

liares á diferenciação. Vimos tantas excepções e tão frequentes anomalias, no reduzido numero de amostras estudadas, que torna extremamente precaria qualquer diferenciação baseada nos caracteres de colonias.

Querendo levar em conta esses elementos para auxiliar a caracterização, parece-nos vantajoso não esquecer a menor tendencia do *pullorum* não gazogeno á producção de colonias filhas no meio de agar chumbo e na sorbita; este caracter tem importancia, já se vê, em estudo de grupos de amostras, pouco valendo numa amostra estudada isoladamente.

Seja dito, de passagem, que tivemos em mãos, recebidos do Prof. Miessner, uma amostra (P 28) pertencente ao grupo recentemente assignalado por Beck & Eber (1929) e confirmado por Günther, 1933, classificado por estes como um typo *gallinarum* gazogeno. Pelos caracteres até aqui descriptos, esta amostra não pode ser diferenciada do typo *gallinarum* não gazogeno.

PROVAS BIOLOGICAS

I — *Em meios de cultura*

Acção sobre caldo de carne peptonado. — Quasi todos estão de accôrdo em que essas bacterias dão ao caldo turvação uniforme. As discordancias começam em relação á producção de pellicula, collar e deposito. Truche refere a formação de collar em amostras de *gallinarum* por elle estudadas em 1923. O mesmo assignala Konno em 1929, nos seus typos A e B, correspondentes ambos ao *pullorum*; além do mais produzem pellicula. Silenciam quanto á producção de collar e pellicula Kaupp & Dearstyne em 1925, enquanto Kraus, em 1919, Beaudette, Buschnell & Payne em 1923, referem a producção de deposito tardio, depois da turvação do meio.

Todas as amostras por nós estudadas deram no caldo turvação homogenea em 24-48 horas e do 5.º dia em deante, iniciava-se a formação de deposito pulverulento, com aparente mas não completo clareamento do meio. Essa acção não é exclusiva do caldo de carne peptonado, tendo sido observada tambem no caldo pancreatico. Pareceu-nos frequente a producção de collar, mas foi inconstante na sua formação com a mesma amostra e na mesma partida de caldo, em sementeiras repetidas. Apenas uma vez vimos se produzir pellicula com uma amostra, formação impossivel de se reproduzir nas sementeiras seguintes. É possivel que sejam necessarias especiaes condições physicas para sua formação, tal qual succede com bacterias de outros generos, porque a cul-

tura onde a vimos produzir-se estava seguramente pura. O crescimento como deposito granular no caldo, assinalado por Mathews em 1926, numa amostra de *gallinarum*, e tambem por Konno, no seu typo A de *pullorum*, pode ser attribuida á presença de variantes rugosas, como foi referido por St. John Brooks & Rhodes, em relação á *Shigella jeffersoni*, considerada por elles como uma variante rugosa de *gallinarum*. As amostras P 1 (*pullorum* não gazogeno), P 3 (*pullorum* gazogeno) e G 30 (*gallinarum*), derivaram linhagens que cresceram no caldo com esta apparencia.

Produção de indol. — Existe completo accôrdo entre os pesquisadores na incapacidade indologena dessas bacterias. Valendo-nos do methodo de Ehrlich, cultivando as amostras em agua peptonada a 3 %, e realisando a prova no 8.º dia de cultura a 37º, não observamos a existencia deste corpo nas culturas de todas as amostras estudadas por nós.

Propriedades fermentativas. — Foram investigadas:

1) Sobre leite e sôro de leite tornasolados. — Ninguem observou ainda coagulação do leite, mas a sua acidificação passageira foi referida com o *gallinarum* por Pfeiler & Standfuss em 1919, Pfeiler & Hoepke em 1917, e com o *pullorum* por Beaudette, Buschnell & Payne em 1923, e por Spray & Doyle em 1921. Segundo estes autores á acidificação segue-se quasi sempre alcalinisação do meio, e Mulsow acha ser o *gallinarum* alcalinizador mais rapido que o *pullorum*.

Manninger, em 1928, refere que Hadley encontrou amostras de *pullorum* capazes de exercer sobre o leite acidificação permanente, e que Pfeiler assignala a existencia de amostras de *gallinarum* capazes de alcalinizar lentamente o leite. Manninger acredita ser instavel esta propriedade; em 1921 suas amostras acidificavam o leite e em 1927 provocavam viragem a alcali, lentamente. As amostras de *gallinarum* isoladas em 1926 davam dupla viragem, excepto uma, e assim tambem se comportavam amostras recebidas naquella occasião de outros laboratorios. De seu estudo neste particular conclue que a alcalescencia depende da energia vegetativa porque todas as amostras alcaligenas vegetavam melhor nos meios de cultura.

Em relação ao sôro de leite dizem Pfeiler & Standfuss ser acidificado permanentemente pelo *pullorum*, com uma excepção; o *gallinarum* daria dupla viragem, o que lhe valeu a denominação de *B. typhi gallinarum alcalifaciens*, dada por Pfeiler. Beck & Eber (1927 e 1929), e Guenther (1933), observam tambem a acidificação permanente desse meio com o *pullorum* e sua viragem pelo *gallinarum*. Miessner & Berge em

1928 observam acidificação inicial do meio, seguida de alcalinização dentro de 3-4 dias, ou um pouco mais tarde.

O leite e o soro de leite com que trabalhamos, foram ajuntados de azolitmina Merck. Houve constante e permanente acidificação destes meios pelas amostras observadas, exceptuando-se P 7, alcalinizadora desde inicio. Notamos pouca frequencia de dupla viragem; essa alteração procedia-se ás vezes muito de vagar, sendo apreciavel depois de 30 ou 40 dias de cultura a 27°. A dupla viragem no soro de leite nem sempre se acompanhava do mesmo phenomeno no leite tornasolado; podia existir neste e não ser vista no soro de leite, e vice-versa. *Pullorum* e *gallinarum* comportam-se de modo analogo nesses meios.

Cotejando as summulas de variação provocadas no leite e no soro de leite tornasolados, durante 3 annos em que foram as nossas amostras acompanhadas, verificamos numerosas discordancias nos resultados, facto que se pode explicar pela inconstancia da composição do meio; estas discordancias já foram apontadas por Manninger, que achou suas amostras, fermentadoras permanentes em 1921, darem dupla viragem em 1928, dentro de 2-7 semanas, com excepção de uma.

Dispensamo-nos, por isso, de reproduzir os quadros daquellas modificações. Não podemos endossar os resultados dos trabalhos recentes de Guenther e de Beck e Eber, que attribuem a este meio grande valor diagnostico para os typos ora estudados.

2) *Sobre o vermelho neutro.* — Embora a alteração desse indicador não seja derivada de uma acção fermentativa directa, incluimos aqui o seu estudo. Usamos o meio inicial de Rothberger e diversas modificações. Takaianagi, em 1926, e Cilli em 1932, investigaram a modificação do vermelho neutro na caracterisação do *gallinarum*, não tendo observado alteração dessa substancia corante. Observações com vermelho neutro fazem Pfeiler & Standfuss, Kraus, e Beck & Eber. Estes ultimos notam que sómente o *pullorum* gazogeno, produz no meio de Rothberger fluorescencia, caracter aproveitavel na differenciação dos dois germens, *pullorum* e *gallinarum*. Recentemente Beck & Eber descrevem tambem um typo *gallinarum*, «gazogeno», que se comporta em relação ao vermelho neutro como o *pullorum* gazogeno.

Inicialmente preparamos o meio de Rothberger com a modificação de Schaeffler, isto é, addicionando ao caldo glycosado a 1 %, solução saturada de vermelho neutro, até obter uma tonalidade vermelho cardeal (mais ou menos 1/4.000), e mais agar 1 %.

Numa primeira passagem nesse meio ficaram nossas amostras divididas em dois grupos, relacionados estreitamente com a capacidade gazogena, como se vê no quadro 4.

Quadro 4

Acção sobre o meio com vermelho neutro de Rothberger-Schaeffler.

Grupo de germens	Nome da amostra	1 dia	5 dias	10 dias
<i>Pullorum</i> não gazogeno	P 1 e G 39.	0	0	0
<i>Pullorum</i> gazogeno	P 2, P 4, P 5, P 6, P 8, P 9, P 10, P 11, P 12, P 13, P 15, P 16, P 18, P 19, P 22.	0	FG	FG
	P 3 e P 17.	0	0	0
<i>Intermedius</i>	P 7, P 14, P 20, P 21, P 24. P 25, P 26, P 27.	0	0	0
<i>Gallinarum</i>	P 29, G 27, G 28, G 33, G 30, G 31, G 32, G 34, G 36, G 37.	0	0	0
<i>Gallinarum</i> gazogeno ?	P 28.	0	0	FG

Notações : F, fluorescencia ; G, gaz ; 0, inalterado.

A não ser P 3 e P 17, todas as demais subordinaram a capacidade de fluorescencia, sem excepção, á sua capacidade gazogena nos meios de cultura, como vimos acima com Beck & Eber. Imaginamos, por isso, estar o phenomeno adstricto á fermentação da glycose, até gaz. Substituimol-a pela maltose, na mesma proporção.

Eis os resultados comparados dos dois meios, com glycose e com maltose no quadro 5.

Seria desconcertante o resultado, a vista da concordancia obtida com os dois assucares, em comparação, si não viesse elle demonstrar ser a alteração do corante independente da fermentação do assucar, uma vez que a maltose, nas condições da experiencia, não é alterada pelo *pullorum*. Convem assignalar que as discrepancias observadas nas primeiras provas com P 3, P 17 e G 29, não se confirmaram. Ficou assim provada desnecessaria a fermentação dos assucares até gaz, ou mesmo um incompleto desdobramento do assucar, para a producção da fluorescencia com o vermelho neutro; demais, isto se poderia suppor logo da primeira experiencia, pois o *gallinarum*, embora desdobre a glycose, não allera o vermelho neutro.

Procuramos penetrar um pouco mais na essencia do phenomeno da alteração bacteriana do vermelho neutro. A fluorescencia é primeiro vista nas partes inferiores das culturas em camada alta. Cumpria veri-

Quadro 5
 Acção sobre o vermelho neutro em meio glycosado e maltosado (1930).

T y p o	Nome de amostras	G l y c o s e					M a l t o s e				
		1 d.	2 ds.	3 ds.	5 ds.	10 ds.	1 d.	2 ds.	3 ds.	5 ds.	10 ds.
<i>Pullorum</i> não gasogeno	P 1, G 39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Pullorum</i> gazogeno	P 2, P 15	0	0	fg	fg	fg	0	0	fg	fg	
	P 3	0	0	0	fg	fg	fg	fg	fg	fg	
	P 4	0	fg	fg	fg	fg	0	0	fg	fg	
	P 5, P 19	0	0	fg	fg	fg	0	0	fg	fg	
	P 6, P 10, P 11, P 12	0	0	fg	fg	fg	0	0	fg	fg	
	P 8, P 16	0	0	fg	fg	fg	0	0	fg	fg	
	P 9, P 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	P 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Intermedius</i>	P 7, P 14, P 20, P 21, P 24, P 25, P 26, P 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Gallinarum</i>	P 29, G 27, G 28, G 29, G 30, G 31, G 32, G 33, G 34, G 36, G 37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Gallinarum</i> gazogeno ?	P 28	0	fg	fg	fg	fg	0	fg	fg	fg	

Notações : f, fluorescência; g, gaz; 0, inalterado.

ficar agora o apparecimento desse phenomeno em meios altamente reductores, ou em anaerobiose.

Para medir a acção da anaerobiose sobre a alteração do vermelho neutro usamos o meio sem glycose, ou enriquecido com este assucar, em proporções variaveis. Cobrimos com vaselina solida os tubos destinados á anaerobiose, manobra que garante sufficiente impermeabilidade, conforme demonstrou-o Thompson, em 1920. Semeamos os tubos com bacterias bem conhecidas na sua acção sobre o vermelho neutro.

Vê-se, pelo quadro 6, que a glycose, segundo o grau de concentração, pode não facilitar ou mesmo impedir o apparecimento da fluorescencia. A anaerobiose, pelo contrario, favorece nitidamente o seu apparecimento.

Quem primeiro propoz o vermelho neutro na differenciação bacteriana foi Rothberger. Seu meio era preparado ajuntando esse corante ao caldo de carne, que sempre contem glycose, em quantidade variavel com a qualidade da carne. Schaeffler addicionou-lhe a glycose em natureza, vimos acima, porque viu apressar-se com sua presença a alteração do meio, que hoje se sabe ser devido á acção reductora deste assucar sobre o oxygenio do meio.

Ao lado da fluorescencia soffre o vermelho neutro uma alteração para amarello, ligada á mudança do pH do meio, quando nelle vegetam certas bacterias. Varia o *spectrum* do vermelho neutro desde o vermelho purpura, quasi violeta, até o amarello canario, quando passa da esphera acida para a alcalina. É esta a modificação de coloração mais facilmente observada, e ella é vista ao lado da fluorescencia sob a acção de certas bacterias. Foi Rochaix quem chamou a attenção para a complexidade do phenomeno, demonstrando que as causas da fluorescencia e do amarellecimento eram diversas. Sómente as bacterias provocadoras de fermentação ammoniacal acarretam amarellecimento do vermelho neutro. Juntamente com Dufourt, encontrou Rochaix bacterias, como o *Bacillus subtilis*, a *Pseudomonas aeruginosa* (*B. pyocyano*) e salmonellas, que estavam no meio com vermelho neutro fluorescencia sem amarellecimento, porque não eram ammoniogenicas. Germens como a *Escherichia coli*, capazes de transformar a uréa em carbonato de ammonia, segundo as verificações de Hallé & Dissart, dão amarellecimento, além da fluorescencia. Guerbert analisa chimicamente o phenomeno e vê que a fluorescencia resulta da presença de hydrogenio em estado nascente, tratando-se, portanto, de um phenomeno de redução. A asserção não quer dizer que qualquer reductor seja capaz de provocar fluorescencia no vermelho neutro. Empregamos numerosas substancias com esta capacidade, e mesmo os mais energicos reductores, como os sulfitos e hydrosulfitos,

Quadro 6

Alterações do vermelho neutro em aerobiose e anaerobiose, comparativamente

Meio de cultura	Sem vaselina						Com vaselina					
	0 o/o		1 o/o		5 o/o		0 o/o		1 o/o		5 o/o	
	1 d.	2 ds.	1 d.	2 ds.	1 d.	2 ds.	1 d.	2 ds.	1 d.	2 ds.	1 d.	2 ds.
Porcentagem de glicose												
Tempo de incubação												
<i>Salmonella schottmülleri</i> (B. paratyphosus B)	0	0	G	FG	G	FG	F	FG	G	FFG	G	GG
<i>Aerobacter aerogenes</i> (B. aerogenes)	0	0	0	0	0	0	F	0	G	FG	G	G
<i>Proteus specimen</i>	F	F	FG	FG	G	FPG	FF	FF	FF	FFG	G	FG
<i>Escherichia coli</i> (B. coli)	0	0	G	G	G	G	FF	G	G	FG	G	G
<i>Salmonella specimen</i>	0	0	G	FG	0	0	F	0	G	FG	G	G
CONTRAPROVAS												
<i>Shigella dysenteriae</i> (B. dysenteriae Shiga)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella paradysenteriae</i> (B. dysenteriae, Flexner)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhosa</i> (B. typhosus)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

não acarretam o apparecimento da fluorescencia. O proprio hydrogenio, si não brota de uma reacção chimica no momento, é incapaz de produzir fluorescencia. Juntando-se um alcali, o corante amarellece e apresenta então a concomitancia dos dois phenomenos. Pode-se concluir, desse geito, haver ao mesmo tempo redução e alcalinisação do corante. É provavel ser devida ao poder reductor da glycose a sua acção favorecedora á produção da fluorescencia assignalada por Schaeffler, porque no seu desdobramento pela bacteria pode gerar-se e se gera hydrogenio em estado nascente.

A exigencia de forte potencial reductor para o apparecimento do phenomeno esclarece a vantagem das condições de anaerobiose para acceleral-o, e explica porque nas experiencias do quadro 5, a glycose sobrepoujou a maltose na produção da fluorescencia, que acompanhou a formação de gazes, incluindo hydrogenio, no meio com aquelle assucar. Somma-se ainda a esta particularidade, a conhecida acção reductora da glycose, razão pela qual este assucar favorece mais a produção da fluorescencia que a maltose, menos energica neste particular. As bacterias do genero *Proteus*, que parecem oppor-se a esta hypothese, porque apesar de pouco gazogenas são fortes fluorescedoras do vermelho neutro, agem, provavelmente, como germens altamente reductores, provocando por si mesmos um estado favoravel do meio de cultura.

Dos ensaios levados a effeito para conhecer a natureza da fluorescencia chegamos ao arranjo de um meio no qual ella se produz mais rapida e nitida que no meio de Rothberger e suas modificações, desde que se tenha em vista a produção da fluorescencia em particular. Prepara-se o meio do seguinte modo:

Peptona	30 grs.
Agua	1.000 c. c.
NaCl	5 grs.

Dissolver a quente, acertar o pH a 7,4. Ajuntar a solução aquosa de vermelho neutro Gruebler a 1 %, 20 cc. Distribuir em tubos de ensaio de vidro neutro. Cobrir com vaselina solida neutra e esterilisar a 110°, durante meia hora.

Este meio permittiu uma differenciação muito rapida e nitida como se poderá vêr examinando o quadro 7.

Quadro 7

Acção sobre vermelho neutro em anaerobiose, sob camada de vaselina.

Typo	Germens	1 d.	2 ds.	3 ds.	4 ds.	10 ds.
<i>Pullorum</i> , não gazogeno	P 1	0	0	0	0	0
	G 39	0	0	0	0	0
<i>Pullorum</i> , gazogeno	P 3	0	F 1	F 2	F 4	F 4
	P 5	0	F 3	F 3	F 4	F 4
	P 10	0	F 1	F 2	F 3	F 3
	P 12	0	F 2	F 3	F 3	F 3
	P 18	0	F 1	F 2	F 3	F 3
	P 22	0	F 1	F 2	F 4	F 4
<i>Intermedius</i>	P 7	0	0	0	0	0
	P 14	0	0	0	0	0
	P 21	0	0	0	0	0
	P 24	0	0	0	0	0
	P 27	0	0	0	0	0
<i>Gallinarum</i>	G 27	0	0	0	0	0
	G 30	0	0	0	0	0
	G 32	0	0	0	0	0
	G 34	0	0	0	0	0
	G 36	0	0	0	0	0
<i>Gallinarum</i> gazogeno ?	P 28	0	F	F	F	F

Notações — F, fluorescencia; os numeros indicam intensidade de reacção.

Apresentaram fluorescencia mais ou menos rapida todas as amostras *pullorum* gazogenas e mais a amostra P 28. Da banda não fluorescente ficaram as amostras de *pullorum* não gazogeno, P 1 e G 39, americana e brasileira, as amostras recebidas como *gallinarum*, e as amostras recebidas da Europa como *pullorum*, por nós incluídas no typo a que denominamos *intermedius*.

Estes resultados foram absolutamente constantes durante todo o tempo em que foram as amostras acompanhadas.

3) *Produção do gaz sulphydrico*.—Essa propriedade tem sido quasi sempre encontrada positiva pelos pesquisadores. É uma das mais estudadas nesses germens, como se vê compulsando os trabalhos de Truche 1923, Plasaj 1930, Pfeiler & Standfuss 1919, Pfeiler & Hoepke 1917, Mulsow 1919, Kaup & Dearstyne, 1925, Hadley 1919, Donatien, 1924, Beck & Eber 1927 e 1929, Klimmer & Haupt 1927, Spray & Doyle 1921, Konno 1929, Cilli 1932, Guenther 1933, trabalhando com *S. gallinarum* sómente, ou tambem com *pullorum*. Não ha duvidas em serem todas sulfurigenas, variando apenas a intensidade de producção.

Truche achou maior quantidade de H^2S na *S. gallinarum*; Klimmer & Haupt conferem predominancia na produccão aos *pullorum*. Em 7 amostras de seu typo I, por elles achado com propriedades intermediarias entre *pullorum* e *gallinarum*, 4 eram sulfurigenas. Este achado está de accôrdo com o typo intermediario descripto por Beck & Eber, amostras Kü IV e Ovar IV de Beller, que se mostraram sulferigenas em suas mãos e não sulfurigenas nas de Beller.

Truche (1929), não conseguiu demonstrar a presença de H^2S nas culturas de *pullorum*. Tambem Rochaix & Couture encontram fraca ou nulla produccão com amostras classificadas como *pullorum*, confirmando assim as verificações de Vaccaro. Tittsler (1931) procura explicar alguns resultados discordantes como os de Malmann (1925), pela influencia da temperatura das experiencias. Verifica elle que temperaturas acima de 34° são impedientes á produccão de H^2S , attingindo este effeito o maximo em 44° . Aconselha para a prova, temperaturas entre 30° C. á 34 C. e verifica, desta maneira, uma estreita correlação entre a produccão de H^2S e a de outros gazes.

Na pesquisa desse corpo usamos inicialmente a gelatina e o meio de Bailey-Lacy. Este encontra-se detalhadamente descripto no trabalho de Klimmer & Haupt. Eis os resultados nos quadros 8 e 9.

Quadro 8

Formação de gaz sulphydrico em gelatina.

Amostras	Meio de cultura	
	escurecido	inalterado
<i>Pullorum</i> não gazogeno	2	0
<i>Pullorum</i> gazogeno	17	0
<i>Intermedius</i>	2	6
<i>Gallinarum</i>	10	1
<i>Gallinarum</i> gazogeno ?	1	0

NOTA — Os numeros indicam numero de amostras utilizadas na prova.

Neste meio (Bailey-Lacy) revelaram as amostras *gallinarum* leve poder sulfurigeno; *pullorum*, gazogeno e não gazogeno mostraram-se fortes productores de H^2S ; o *intermedius* não produziu este gaz no meio e no tempo referidos.

Quadro 9

Produção de H²S no meio de Baley-Lacy

A m o s t r a s	1 d.	2 ds.	3 ds.	5 ds.
<i>Pullorum</i> não gazogeno				
P 1	0	0	n	n
G 39	0	0	0	n
<i>Pullorum</i> gazogeno				
P 3, P 11	0	0	n	n
P 5, P 10, P 2, P 22	0	n	n	n
P 18	0	0	0	n
<i>Intermedius</i>				
P 7, P 14, P 24, P 27, P 20	0	0	0	0
<i>Gallinarum</i>				
G 30, G 31, G 32	0	0	0	± n
G 33	0	0	0	n
CONTRAPROVAS				
Meio não semeado	0	0	0	0
<i>Salmonella schottmülleri</i> (<i>B. paratif.</i> B)				
No. 690	0	n	n	n
<i>Salmonella</i> (<i>Eberthella</i>) <i>typhosa</i>				
No. 895	0	0	0	0

Notações — n, ennegrecimento; 0, inalterado.

Parecendo ser util esta propriedade na differenciação, procuramos estudal-a mais detelhadamente.

Na pesquisa do H²S usamos o meio proposto por Pacheco & Mello, inicialmente pela simples junção do bismutho ao agar commum, sendo os resultados vistos no Graphico 1. Posteriormente seguimos exactamente na technica da preparação as indicações aconselhados por aquelles autores, isto é, agar semisolido tendo carbonato de bismutho como indicador. Experimentamo-lo tal qual ou ajudando-lhe cystina, como fonte de enxofre de clivagem facil, util segundo verificações de Tilley.

Compõe-se o meio de Pacheco & Mello:

Agua distillada, 100 cc.; Peptona Witte, 3 grs.; Agar-agar, 0,5 grs.; NaCl, 0,5 grs.; Carbonato de bismutho (Riedel), 0.5 grs.

Deve-se agitar o meio antes da solidificação, depois de autoclavado, para distribuição uniforme do indicador. Para cystinar o meio adicionava-se-lhe 0,01 % de cystina.

Pesquizamos ainda o H²S em agar commum, com acetato de chumbo a 0,5 %; em papa de cerebro em anaerobiose; e na « Bactopeptone iron agar » da Difco Laboratories de Detroit, U. S. A.

No graphico 1 comparam-se o bismutho e o chumbo como indicadores da propriedade sulfurigena das amostras experimentadas.

Exhibimos, no graphico 2, a leitura no meio de Pacheco & Mello, com e sem cystina.

O agar peptona-ferro, « Bactopeptone iron agar » da Difco Laboratories, é preparado do seguinte modo, segundo aconselha Dunham:

Agua destillada a 100°	1.000 cc.
« Iron peptone »	36 grs.

Esterilisar a 15 libras durante 15 minutos. pH final mais ou menos 6,7.

Inadvertidamente juntamos a essa formula 1 % de agar, mas não acreditamos que tivesse maior influencia sobre a sensibilidade do meio.

Os resultados obtidos concordam com os conseguidos no agar chumbo, differindo apenas nas amostras de *intermedius*, que não produziram aqui quantidade apreciavel de H²S, em observação prolongada por 30 dias.

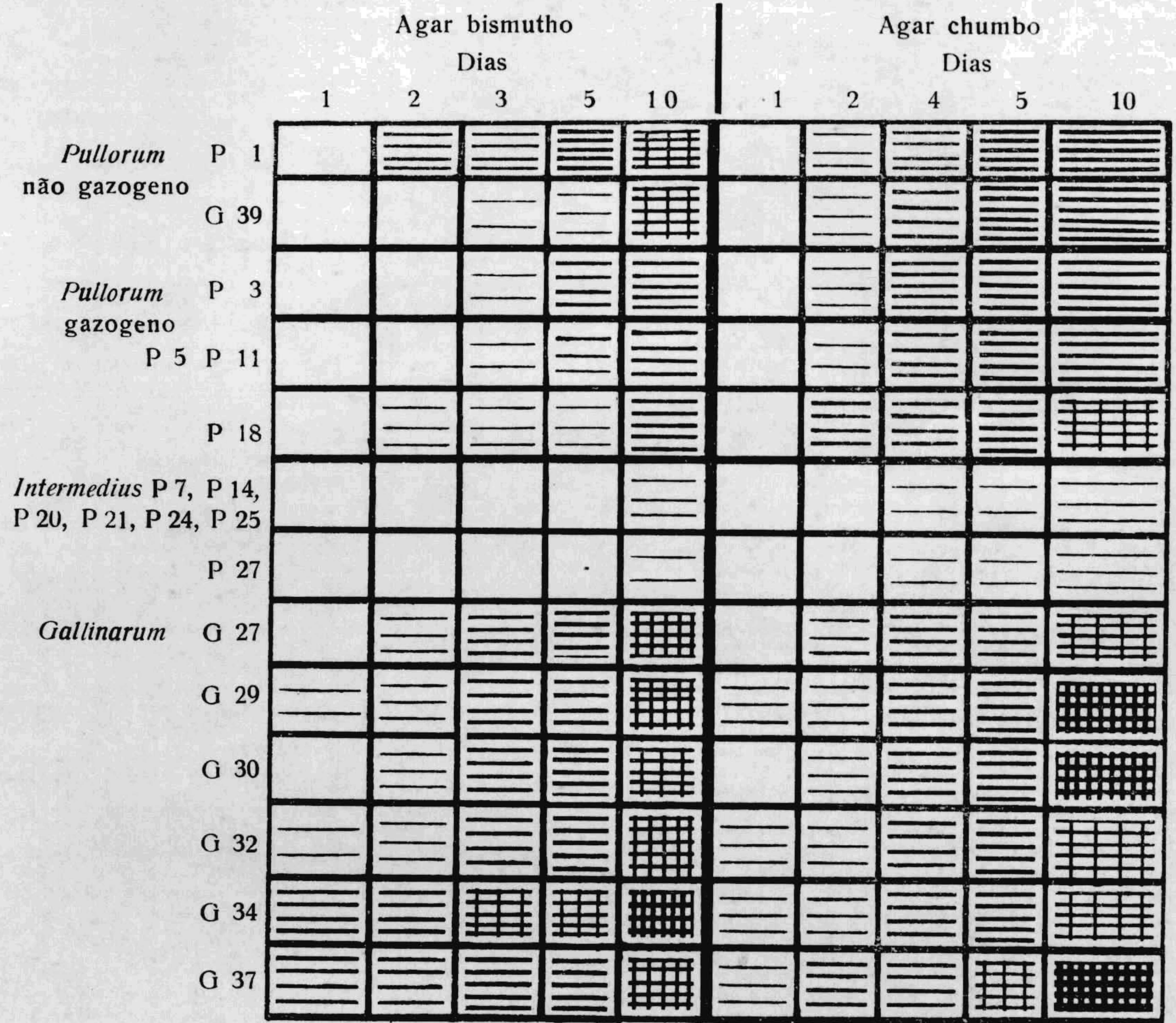
Em conjuncto, a pesquisa do hydrogenio sulfurado forneceu elementos para se concluir:

1) *pullorum*, gazogeno ou não gazogeno, produzem em curto tempo H²S no agar chumbo, no meio de Bailey-Lacy, na gelatina e na « Bactopeptone iron agar » da Difco Laboratories. No meio de Pacheco & Mello, mesmo mediante junção de cystina, a quantidade de H²S produzida é quasi sempre imperceptivel. Raramente gera pequenas quantidades e nestes raros casos elle é lentamente produzido.

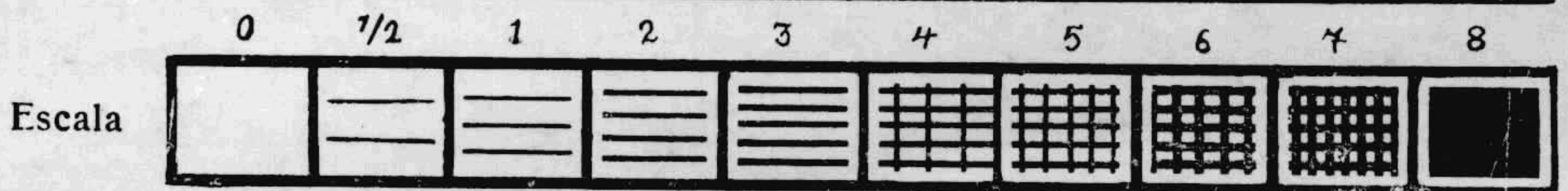
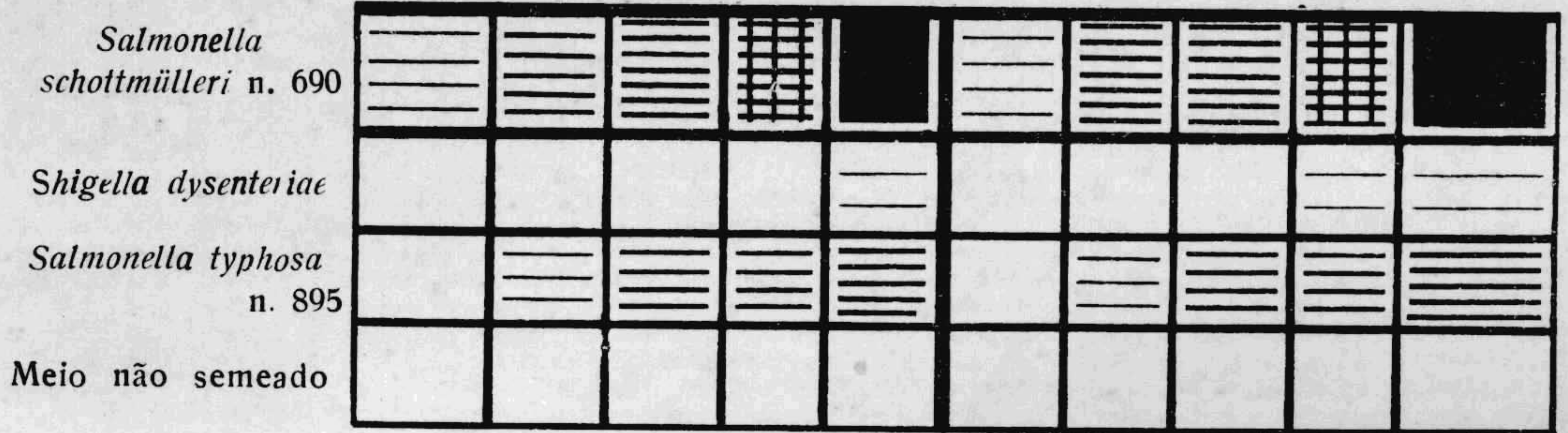
2) *gallinarum* produz abundante H²S em meio de Pacheco & Mello, mais rapida no cystinado; a sua capacidade sulfurigena é tambem presente no agar chumbo e na « Bacto peptone iron agar ». Produccão lenta na gelatina e no meio de Bailey-Lacy.

3) o typo *intermedius* produz pouco H²S, esboçando apenas um escurecimento, lentamente apparecido no agar chumbo e não alterando o meio de Bailey-Lacy, o meio de Pacheco & Mello, cystinado ou não, a « Bacto peptone iron agar », e a gelatina.

Graphico 1



Contraprovas



Notações — 1/2 = traços, 1-8 graus de escurecimento do meio.

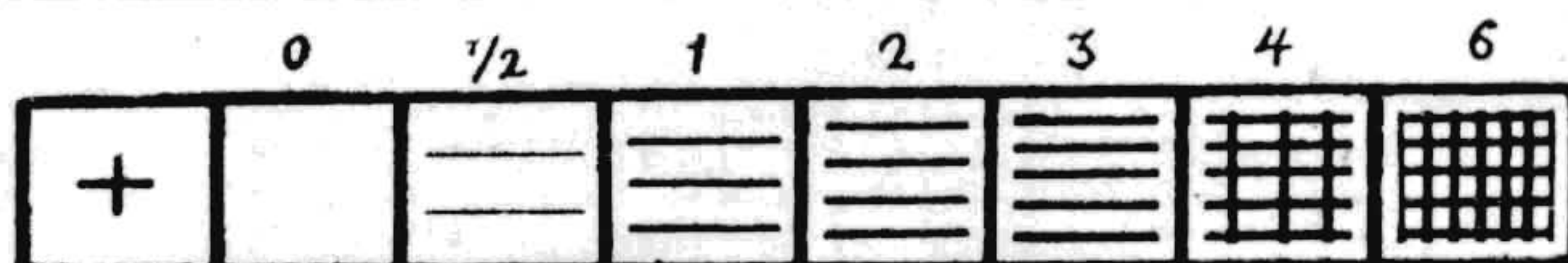
Graphico 2

		Sem cystina						Com cystina					
		Dias						Dias					
		1	2	4	5	7	10	1	2	4	5	7	10
<i>Pullorum</i>	P 1												
não gazogeno	G 39											==	==
<i>Pullorum</i>	P 3,												
gazogeno	P 11, P 18												
	P 5					==	==						
<i>Intermedius</i>	P 27,												==
	P 27, P 24												==
	P 14, P 20												
	P 21, P 25											==	==
<i>Gallinarum</i>	G 27					+	+		==	==	==	+	+
	G 29		==	==	==	+	+	==	==	==	==	==	==
	G 30			==	==	==	==	==	==	==	==	==	==
	G 32		==	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==
	G 37			==	==	==	==	==	==	==	==	==	==

Contraprovas

<i>Salmonella schottmülleri</i> n. 690	==	==	==	==	+	+	==	==	==	+	+	+
<i>Salmonella typhosa</i> n. 895						==					==	==
<i>Shigella dysenteriae</i>									==	==	==	==
Meio não semeado												

Escala



Notações - 1/2 = traços, 1-8 graus de escurecimento do meio, + resultado não anotado.

O quadro 10 resume esses resultados. A amostra P 28, *gallinarum* gazogeno, foi omittida nestas provas.

Quadro 10

Produção de H²S nos diferentes meios utilizados para a prova.

Meios de cultura	Pullorum		Intermedius	Gallinarum
	gazogeno	não gazogeno		
Agar chumbo	+ rapido	+ rapido	+ lento	+ rapido
Pacheco & Mello com cystina	—	—	+ lento	+ muito rapido
Pacheco & Mello sem cystina	—	—	—	+ rapido
Bayley - Lacy	+ rapido	+ rapido	—	+ lento
Gelatina	+ rapido	+ rapido	+ lento?	+ lento
Polpa de cerebro	—	—	—	—
"Iron peptone" agar	+ rapido	+ rapido	—	+ rapido

Na papa de cerebro, coberta de vaselina, não observamos escurecimento por nenhuma das amostras estudadas.

Uma particularidade deve ser ressaltada a respeito da propriedade sulfurigena nestes germens. É a sua dependencia do meio de prova utilizado, segundo o qual podem-se chegar a inverter os resultados. Excluido o meio bismuthado, que só ultimamente foi utilizado, houve nos outros meios constantemente o mesmo modo de actuarem. A par dessa fixidez de actividade, elles revelaram no ensaio da propriedade sulfurigena elementos significativos para sua differenciação. É possivel que tambem a temperatura tenha influencia no escurecimento; todas as nossas provas foram feitas a 37°. Não podemos, entretanto, acceitar a opinião de Tittsler sobre correlação entre a produção de outros gazes e a de H²S.

4) *Reducção dos nitratos a nitritos.*— Só uma vez tentamos essa prova. Levamol-a a effeito no inicio do nosso estudo, em meio agua de peptona nitrada e fazendo a prova indicadora da transformação a custa da naphtilamina e mais acido sulfanilico. Das trinta e oito amostras, mais de 50 % tranformaram nitratos em nitritos. As amostras reductoras dos nitratos distribuiram-se nos diferentes grupos que vimos estudando, tornando a prova inapta a uma applicação na fixação dos caracteres bacterianos. Tittsler, em 1930, não poude tambem distinguir

com ella *pullorum* de *gallinarum*, pois varias amostras de uns e de outros transformavam os nitratos e outras eram inactivas sobre elles. Kaupp & Dearstyne dão *gallinarum* como reductor, enquanto Rettger diz que o *pullorum* não gosa desta propriedade.

5) *Accção proteolitica*. — Constantes se revelaram as amostras dos differentes typos na sua accção sobre a gelatina, na qual vegetam bem sem provocar fusão. Essa verificação, aliás, não discorda do consenso geral das pesquisadores que se teem occupado do assumpto, todos accordes em dar o meio inalterado por essas bacterias.

6) *Fermentação dos assucares*. — Apezar de certo exagero na avaliação das provas fermentativas sobre assucares como elementos na systematica bacteriana, é incontestavel seu valor na caracterisação de muitas especies, não raro até, as mais valiosas de todas. Em certos generos bacterianos, onde a capacidade antigenica e outras propriedades são incapazes de precisar differenciação, a fermentação de assucares é a base da systematica, a prova que decide.

Foi o que se deu até certa época tambem com os germens desse grupo. Á custa della estabeleceu Moore, pela primeira vez em 1895, a distincção entre *gallinarum* e o agente da cholera aviaria.

Além da fermentação, a presença de gaz assumiu importancia na systematica do grupo *pullorum-gallinarum*. Rettger descreve inicialmente o *pullorum* como gazogeno. Mais tarde, com Kirpatrick & Jones (1913), verifica a existencia de amostras não gazogenas em presença de qualquer assucar. São essas, na litteratura a nosso alcance as mais antigas referencias de *pullorum* não gazogeno.

Os primeiros a apontar a fermentação da maltose para separar *pullorum* de *gallinarum* foram Smith & Ten Broeck, em 1915. Assentam elles, nesse trabalho, que *gallinarum* (*sanguinarum*), fermenta rapidamente a maltose, ao passo que *pullorum* o faz tambem, mas com muito vagar; ao mesmo tempo fazem referencias á labilidade da producção de gaz de *pullorum*, da qual encontraram amostras, a principio gazogenas, tornadas não gazogenas expontaneamente, quando revistas mais tarde.

Em 1917 Rettger & Koser procuram analysar em minucias a differenciação entre *pullorum* e *gallinarum* na sua accção fermentativa sobre varios assucares; estudam a maltose, dulcita e dextrina, todos atacados pelas amostras *gallinarum* e não alterados por amostras *pullorum*. Permittiu-lhes esta constancia da propriedade fermentativa da maltose

o emprego da prova do vermelho de methyla, proposta por Clark & Lubs para diferenciação de bacterias dos generos *Escherichia (coli)* e *aerobacter (aerogenes)*. Nitida differença apresentam as amostras *pullorum*, alcalinizantes desse meio, tornando-o amarello, ao passo que as *gallinarum* francamente o acidificam, envermelhecendo-o. Dados importantes addusem ainda Rettger & Koser neste trabalho para differenciar *gallinarum* do *pullorum*, na questão do gaz. Estudam amostras *pullorum* recentemente isoladas, ao lado de outras cultivadas até 12 annos em laboratorio, em provas de fermentação em tubos Durham; todas ellas são francamente gazogenas. Exceptuou-se uma amostra, de recente isolamento, não gazogena, mas em tudo mais identica ás suas companheiras *pullorum*. Não obstante acham ser o caracter gazogenico elemento de primeira ordem na diferenciação do grupo *pullorum-gallinarum*, inherente aos *pullorum*, em geral, e unicamente a elles. Goldberg confirma, nesse mesmo anno, os dados de Rettger quanto á gazogenia e sua constancia no tempo, e só depara com uma amostra *pullorum* não gazogena, amostra esta um tanto irregular nas suas propriedades. Ainda nesse mesmo anno dois trabalhos apparecem, contando provas de fermentação. O de Pfeiler, que accrescenta aos assucres atacados pelo *gallinarum*, já conhecidos, a xylose e a rhamnose, e não atacados, a sorbita; e o de Krumwiede & Cohn que estabelecem a fermentação fracamente positiva da xylose pelo grupo *pullorum-gallinarum*, sendo a rhamnose atacada com mais energia pelos *pullorum*.

Foram Hadley, Elkins & Caldwell quem, em 1918, distinguiram com segurança dois typos *pullorum* já entrevistos por outros pesquisadores: A, gazogeno, dotado de acção pathogenica só para pintos e B, não gazogeno, capaz de infectar pintos e gallinhas.

Não houve dahi por deante nenhuma relutancia na acceitação desses dois typos fermentativos, baseados na constancia e na immutabilidade dos seus caracteres, mas a sua especificidade pathogenica foi contestada por St. John Brooks & Rhodes em 1923, e por Beaudette em 1925. Os primeiros isolam o typo A, gazogeno, em gallinha adulta e Beaudette encontra o B, não gazogeno, em gemma residual de pinto.

Muitas discussões tem suscitado o assumpto. Gage affirma em 1911 serem gazogenicas todas as amostras provenientes de pintos ou de ovos. Doyle acha exacta, de uma maneira geral, a affirmação de Hadley, Elkins & Caldwell, comportando a regra frequentes excepções. São contradictorias as observações de Edington, publicadas em 1924. Em 3 epizootias de pintos isola elle amostras de *pullorum*, não gazogenas, mas que se tornavam gazogenas com o tempo; era a transformação exponencial do typo B em A. Transformação semelhante do typo B em A,

obteve Doyle anteriormente, em 1921, mediante inoculação em pintos sãos e recuperando destes a bacteria, transmutada. Convem salientar a possibilidade de erro na experiencia deste pesquisador. Seria aconselhavel repetirem-se as passagens em meios de cultura, como que para revigoral-a, antes de se dar uma amostra *pullorum* como não gazogena. É possivel que a omissão d'esse revigoroamento tenha falseado o resultado de Doyle, isto é, que a passagem em animal não tenha tido outra acção senão esta.

Encontram-se tambem referencias favoraveis á asserções de Hadley e collaboradores no trabalho de Miessner & Berge, de 1928. Estes isolam de pintos novos, até a 2.^a semana de vida, amostras de *pullorum* gazogenas, e dos pintos maiores desta idade, amostras não gazogenas.

Não foi dada ainda a ultima palavra sobre a relação entre a producção de gaz e a pathogenia do *pullorum*.

Quanto á capacidade gazogena em si, tambem não ha accôrdo unanime de opiniões. De um lado Hadley e collaboradores acham-n'a immutavel, o que lhes faculta crear os typos A e B, gazogeno e não gazogeno, escorados em suas proprias experiencias e nas de Rettger & Koser, de Goldberg e de Rebrassier em 1926; de outro lado estão Smith, Ten Broeck, Edington, além de outros, que toparam todos com transformação de um typo em outro, a custa de provas repetidas ou de artificios de cultura. St. John Brooks & Rhodes sustentam não ser a producção de gaz prova valiosa na caracterização do *pullorum*, tão fallivel é ella. Beller afina no mesmo diapassão, segundo Gressel. Apenas 50 % dos *pullorum* por este estudadas, dão gaz na glycose, um ou outro fermenta a maltose, tendo Gressel observado tambem a perda da propriedade gazogena em varias de suas amostras.



No capitulo da fermentação dos assucares pelo *pullorum* defronta-se outro ponto obscuro; é na acção sobre a maltose. Vimos como foi primeiro admittida a incapacidade dos typos *pullorum* de fermentar este assucar, que chegou a servir de caracter differencial. No entanto, nem todos os pesquisadores estão de accôrdo sobre esta incapacidade fermentativa, possivel de ser perdida ou adquirida no correr do tempo, segundo alguns. Mulsow foi o primeiro a chamar atenção para irregularidades na fermentação da maltose por amostras *pullorum* e *gallinarum*, invalidando idéas assentadas e tidas até ali como verdadeiras. Entre amostras *pullorum* por elle estudadas houve algumas fermentadoras da maltose; entre amostras de *gallinarum* observou tambem algumas que só fermenta-

tavam lentamente esse assucar. Mas o que maiores confusões acarretou foi a supposta capacidade potencial do *pullorum* em fermentar a maltose, demonstrada nas experiencias de Spray & Doyle, de 1921, confirmadas por Hendrickson em 1927. Verificaram elles que as amostras *pullorum*, incapazes de fermentar esse assucar nos meios communs de fermentação maltosados, tornavam-se fermentadoras, uma vez que se adicionasse sôro ao meio assucarado. E ainda mais, viram amostras *pullorum* gazogenas chegarem a produzir gaz nestas condições e que, dextrina e dulcita, ordinariamente não atacadas por essas bacterias, assim se conservavam nos meios com sôro. No minucioso estudo comparativo de amostras *gallinarum-pullorum*, abrangendo amostras americanas e europeas, publicado em 1927, May & Goodner assignalam a existencia de algumas amostras *pullorum* dotadas de capacidade fermentadora da maltose e da dextrina; acreditam elles ser devida esta anomalia a um prévio desdobramento da maltose na autoclavagem, e a impurezas da dextrina. Acrescentam que amostras recentemente isoladas se mostram mais irregulares que as antigas, neste particular. Concordam Manninger e Mallmann com a opinião de May & Goodner, ao discutirem, em 1928, o mesmo phenomeno observado com suas amostras, tanto mais quanto Mallmann não mais observou a fermentação da maltose ao provar a fermentação dos *pullorum* em liquido maltosado, esterilizado por filtração em véla. Mesmo assim acha elle improprio este assucar, bem como dextrina e dulcita, para a differenciação, tão frequentes são encontradas amostras *pullorum* fermentadoras desses assucars.

Novos detalhes são trazidos por Edwards nesse mesmo anno, ao verificar soffrer a maltose, sob acção das substancias alcalinas, produzidas pela vegetação da *S. pullorum* e do calor da estufa, desdobramento em glycose, assucar fermentecivel pelo *pullorum*. Impedida a alcalinisação do meio, não mais se observa a fermentação da maltose pelas amostras que anteriormente o faziam.



Outros assucars foram estudados com a intenção de serem applicados na distincção de *pullorum* e *gallinarum*, havendo, é verdade, divergencias entre os pesquisadores. Cernaianu e Popovici, 1930, consideram como caracter differencial a acção sobre a arabinose, que é rapida no *pullorum* não gazogeno e lenta no *pullorum* gazogeno. Esta observação é contrariada por Vaccaro, 1932.

Pode-se ver pelo quadro n. 11, abrangendo todos os trabalhos por nós compulsados, essas divergencias. Neste quadro não figuram os re-

Quadro 11

Fermentação dos assucares segundo varios pesquisadores.

Amostras	Glycose	Galactose	Rhamnose	Mannita	Saccharose	Dextrina	Dulcita	Levulose	Mannose	Xylose	Arabinose	Maltose	Lactose	Raffinose	Sorbita
<i>Pullorum</i> não gazogeno															
May & Goodner 1927	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Rebrassier 1926	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Pullorum</i> gazogeno															
Beaudette, Bushnell & Payne 1923	g	g	+	g	-	-	+	g	g	g	g	+	-	-	-
Mulsow 1919	g	0	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	g
May & Goodner 1927	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Manninger 1928	g	+	g	+	-	+	-	+	g	g	g	+	-	-	-
Beck & Eber 1927	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Klimmer & Haupt 1927	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Rettger & Koser 1917	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Doyle 1925	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Goldberg 1917	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Gressel 1928	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
Kraus 1919	g	g	g	g	-	+	-	g	g	g	g	+	-	-	-
<i>Intermedius</i>															
May & Goodner 1927	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Beck & Eber 1927	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Klimmer & Haupt 1927	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Gallinarum</i>															
Beaudette 1925	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Pfeiler 1921	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mulsow 1919	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
May & Goodner 1927	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Manninger 1928	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ehrlich 1925	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Pfeiler & Hoepke 1917	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Beck & Eber 1927	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Rettger & Koser 1917	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Goldberg 1917	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Gressel 1928	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Klimmer & Haupt 1927	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Notações — +, fermentação sem gaz; g, fermentação com gaz; -, não fermentado; ±, fermentação fraca.

sultados de Lerche, impossiveis de tabular ali. Lerche, partindo de germens isolados de pinto e de ovo, estuda 161 amostras, tendo obtido resultados tão variaveis em provas bioquimicas, que desalenta a possibilidade de uma separação segura dos typos com essas provas; atem-se elle somente á producção de gaz, como a mais valiosa de todas, não admittindo como significativas a fermentação da dulcita, maltose e dextrina.

Além destes, ha nos trabalhos de que retiramos os dados do quadro 13, referencias a outros assucars, menos experimentados ordinariamente.

Englobando o exame da litteratura, infere-se quanto á fermentação dos assucars, ser o grupo *pullorum-gallinarum* dotado de capacidade fermentativa sobre a glycose, galactose, manita, manose, levulose, arabinose, rhamnose; a fermentação é acompanhada de producção de gaz pelo *pullorum* chamado gazogeno, com certos assucars. Não são fermentados lactose, saccharose, raffinose, salicina, inulina, amido, erythrita, adonita. Seriam fermentados pelo *gallinarum*, segundo a maioria, mais a maltose, a dulcita e a dextrina, assucars estes geralmente não alterados pelo *pullorum*.

Curiosa é a referencia, encontrada em quasi todos os trabalhos dessa epocha para cá, a typos «anomalos», exactamente aquelles que ora descrevemos como *intermedius*. Lá estão no trabalho de May & Goodner duas amostras *gallinarum* incapazes de fermentar a xylose, assucar decomposto por todas as amostras *pullorum* e *gallinarum*. Beck & Eber chegam a denominar intermediario, «Uebergang», as duas amostras dentre outras por nós denominadas *intermedius*, Kücken IV e Ovar IV, que apresentam caracteres communs ás especies *pullorum* e *gallinarum*, e cuja frequencia não puderam precisar. Essas duas amostras eram, conforme referem, inicialmente gazogenas, ao actuar sobre varios assucars, mas perderam a propriedade nas repicagens seguintes.

Klimmer & Haupt estudam em 1927 duas epizootias em pintos, e conseguem isolar dois typos de germens crescendo com diverso aspecto no meio de Gassner, referido paginas atraz. Um dos typos possuia caracteres do *pullorum* gazogeno de Rettger, si bem que nas primeiras repicagens não produzisse gaz. O outro permaneceu não gerador de gaz, e com o decorrer do tempo foi-se apresentando capaz de fermentar a maltose, lentamente de começo, rapidamente depois.

Das 8 amostras desse grupo, por elles estudadas, 6 já se tornavam fermentadoras na 4.^a passagem ou repique em meio de cultura de laboratorio. Pode-se juxtapor este typo ao intermediario de Beck & Eber, com a differença apenas, da sua capacidade latente em fermentar a

maltose. Klimmer & Haupt o approximam do *gallinarum*, mas não o identificam a elle.

Analogas são as verificações de Gressel em 1928, a respeito desse typo, encontrado e considerado por elle como *pullorum* atypico.

Rochaix & Couture, finalmente, em 1933, observam amostras *pullorum*, não gazogenas, pouco ou nada sulfurigenas, não fermentadoras da xylose, caracteres que os approximam do nosso typo *intermedius*, como veremos.



Para estudo da fermentação de assucars usamos o meio de cultura que desde muito vimos empregando para levar a effeito essas provas. É um meio semisolido composto assim:

Agua	100 cc.
Nutrose	1 gr.
Peplona	2 grs.
NaCl	0,5 grs.
Agar-Agar	1 gr.

A este meio adiciona-se o assucar e indicador Andrade, ambos na proporção de 1%. Julga-se a acidez pelo envermelhecimento do meio, e pela precipitação da nutrose, quando a acidez é muito intensa, proxima de pH 5,0; a alcalinidade é percebida pelo desaparecimento do tom roseo do meio.

Segundo nossas observações, recentemente referendadas por Spray, o meio se presta bem á vegetação da maioria das bacterias.

Em Setembro de 1930 fizemos a nossa primeira prova de fermentação de assucars, lendo os resultados com 1 dia até 20 dias de cultura a 37°.

Nesta serie os assucars, da Fabrica Pfahnstiehl, foram esterilizados, juntamente com o meio a 108°, durante meia hora. Nas provas seguintes modificamos a technica, esterilizando o assucar separado, por aquecimentos descontínuos a 60° durante 30 minutos, repetidas vezes, ou por meio de filtração em véla préviamente esterilizada em autoclave, segundo os conselhos de Mallmann, acima citado. Talvez sejam devidas a isso pequenas discordancias entre os resultados observados, inicial e posteriormente. Possivelmente outro factor tenha influido nessas discrepâncias. Nem sempre foi possível empregar assucars da mesma fabricação (Pfahnstiehl) nas provas subsequentes, utilizando, então, os de fabricação Merck ou Schering (quadro 12).

Interessantes se nos afiguraram os resultados da fermentação da xylose, e principalmente da sorbita. Menos interessante, embora significativa para a diferenciação, nos pareceu a acção sobre a inulina e a rhamnose. Com effeito, a sorbita não foi alterada por nenhuma das amostras *gallinarum* não gazogeno e foi fermentada por todas as amostras dos 4 outros typos. A xylose separou muito bem o typo *intermedius*, que não foi capaz de alteral-a, a não ser a amostra P 25, mesmo assim muito lentamente.

As amostras *gallinarum* acidificaram, de modo passageiro, a inulina, em tempo mais curto no emtanto que os outros typos; a rhamnose foi atacada mais devagar pelas amostras *intermedius* e *gallinarum*, e rapidamente pelas *pullorum*.

Todas as amostras de todos os typos foram fermentadoras da glicerina, sobre cuja fermentação não ha accôrdo na litteratura. Ataque geral soffreram tambem a mannose, mannita, galactose, levulose, arabinose e glycose. Não foram fermentadas inosita, salicina, raffinose, dextrina e saccharose.

Quanto á dulcita e maltose, a sua fermentação mostrou-se nitidamente separativa dos differentes typos. Assim, a dulcita não foi alterada por nenhuma amostra *pullorum*, gazogena e não gazogena, e foi rapidamente atacada pelos outros typos. O mesmo pode-se dizer da maltose, separando esta tambem o *intermedius* do *gallinarum*, porque este fermentou-a rapidamente, e aquelle, em geral, o fez com mais lentidão, levando até 15 dias para fazel-o.

Para apurar bem o resultado com a maltose, sorbita, dulcita e inulina, principalmente com o *intermedius*, repetimos as provas nestes assucars com todas as amostras, decalcando-se quasi, com os anteriores, os resultados ora obtidos, com ligeiras differenças de um ou dois dias no apparecimento das fermentações demoradas. Nessa segunda experiençia foi incluída tambem a prova do vermelho de methyla, proposta por Rettger, como vimos. Houve estreita relação entre esta prova e a da fermentação da maltose, que entra na composição do meio, como se sabe. Ademais, ella falha nos fermentadores lentos da maltose, pesquisada como é antes que se manifeste o ataque ao assucar por este typo. Mais razoavel seria então realisar a prova substituindo a maltose pela dulcita, quando ha interesse em abranger o typo *intermedius*.

Quadro 12
Fermentação dos assucares, vista em 25 - 9 - 1930.

Amostras	Mannose		Glycerina		Mannita	Inosita	Xylose		Rhannose			Dulcita		Sorbita		Salicina	Maltose		Galactose		Inulina		Raffinose	Levulose	Arabinose		Dextrina	Glycose	Lactose	Saccharose			
	A	G	A	A	G	N	A	K	A	G	K	A	N	A	K	N	A	N	A	G	A	K	N	A	G	A	G	N	A	G	N	N	
<i>Pullorum</i> não ga- zogeno	P 1	+		+	+		1d							5d	15d						5d	10d		+									
	G 39	+		+	+		5d							15d							5d	10d		+									
<i>Pullorum</i> gazogeno	P 2	+		+	+		2d							5d							2d	10d		+									
	P 3	+	+	+	+		2d							5d							2d	10d		+									
	P 4	+	+	+	+		1d	15d						5d							2d	10d		+									
	P 5	+	+	+	+		2d	20d						5d							2d	5d		+									
	P 6	+		+	+	+	2d														1d	3d		+									
	P 8	+		+	+	+	1d																	+									
	P 9	+		+	+	+	2d							5d	15d						1d	10d		+									
	P 10	+		+	+	+	5d																										
	P 11	+	+	+	+	+	1d							5d	15d						1d	10d		+									
	P 12	+	+	+	+	+	1d	10d				10			5d	20d																	
	P 13	+	+	+	+	+	1d	10d				10																					
	P 15	+	+	+	+	+	1d								5d	20d						5d	10d		+								
	P 16	+	+	+	+	+	1d								5d	15d						3d	5d		+								
	P 17	+	+	+	+	+	1d								5d	15d						1d	10d		+								
P 18	+	+	+	+	+	2d								5d	15d						2d	5d		+									
P 19	+	+	+	+	+	2d								5d	10d						2d	10d		+									
P 22	+		+	+	+	3d															1d	15d		+									
<i>Intermedius</i>	P 7	+		+	+									5d							1d	10d		+									
	P 14	+		+	+							1d		5d								10d	15d		+								
	P 20	+		+	+							1d		5d								10d	15d		+								
	P 21	+		+	+							1d		3d	15d								1d	15d		+							
	P 24	+		+	+							1d		5d	15d								1d	3d		+							
	P 25	+		+	+		15d					1d		5d	15d								1d	5d		+							
	P 26	+		+	+							1d		5d									1d	5d		+							
P 27	+		+	+							1d		10d									1d			+								

Repetimos as provas de fermentação a intervallos irregulares neste e no decorrer do anno seguinte, sempre com o mesmo resultado, tendo-se passado, depois, um longo intervallo de anno e meio, quando foram novamente retomadas, em 1932. Nesta vez as series de assucares foram preparadas com soluções assucaradas, esterilizadas separadamente do meio, por aquecimentos descontínuos em temperatura baixa, como foi acima referido. Deve ser dito aqui que deste ponto por deante a amostra *gallinarum* gazogeno, P 28, ficou provisoriamente posta de lado. Assignalamos, entretanto, que pelos seus caracteres fermentativos observados nas provas acima, esta amostra deveria ser considerada antes um typo *intermedius* gazogeno, dada a sua actuação sobre o meio de Jordan, adeante descripto, e sobre a xylose e a sorbita.

Os resultados se juxtapõem, em geral, aos obtidos inicialmente, permittindo assegurar uma notavel constancia no tempo, dos caracteres fermentativos. Foi assim que a xylose continuou sendo fermentada por todos os typos, não fermentada pelo *intermedius*; a sorbita continuou não atacada pelo *gallinarum*, atacada pelos demais typos. Uma particularidade deve ser salientada na fermentação deste assucar, em relação ao *pullorum* gazogeno de um lado e ao *intermedius* e *pullorum* não gazogeno de outro lado. No primeiro grupo, do *pullorum* gazogeno, a fermentação é permanente, no segundo grupo, do *pullorum* não gazogeno e do *intermedius*, ella é mascarada sempre, tardiamente, por alcalinisações. Dulcita e maltose mantiveram se tal qual vistas nas primeiras provas e no correr das subseqüentes. Sómente o *intermedius* revelou, com as passagens repetidas, mas não successivas, nos assucares, maior rapidez de fermentação da maltose, pois, fermentava-a entre 2-10 dias no começo, e por fim, apenas duas amostras, a saber, P 24, o fazia em 3 dias e P 7 em dois; os demais representantes deste typo a fermentavam em 24 horas. De passagem, podemos adeantar que este typo apresentou no vermelho de methyla phenomeno analogo, isto é, passou a dar reacção positiva com todas as amostras.

Finalmente em Maio de 1933 fizemos novas provas de fermentação de assucares para cotejo com as anteriores. A glycose, levulose, xylose, saccharose, lactose, dulcita, mannita, salicina e raffinose conservavam identica a fermentação referida com os diversos typos. A maltose continuava fermentada em tempo irregular, de 2 a 10 dias, pelas amostras *intermedius*. Esta demora na fermentação fez, ainda uma vez, falsear a prova do vermelho de methyla de Clark & Lubs, applicada á differenciação do grupo *pullorum-gallinarum* por Rettger, revelando-a a sem valor na sua applicação neste sentido. Illustra a influencia de fa-

cores extrinsecos sobre o resultado da prova o que observamos, por exemplo, com as amostras P 24 e P 27. P 24 fermenta maltose no tubo de Schmidt em 6 dias e no entanto é Vm (vermelho de methyla) negativa; P 27, pelo contrario, fermenta este assucar no decimo dia e é Vm positiva.

No quadro 15 vão referidos os resultados das duas provas, para comparação.

Quadro 13

Fermentação da maltose e prova do VM (Clark & Lubs).

	Tempo em dias					
	1	2	3	6	10	VM
<i>Pullorum</i> não gazogeno						
P 1, G 39	0	0	0	0	0	—
<i>Pullorum</i> gazogeno						
P 3, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 22	0	0	0	0	0	—
<i>Intermedius</i>						
P 7	a	a	a	a	n	+
P 14	a	a	a	a	n	+
P 20	a	a	a	a	a	+
P 21	0	a	a	n	n	+
P 24	0	0	0	a	a	—
P 25, P 26	a	a	a	a	a	+
P 27	0	0	0	0	a	+
<i>Gallinarum</i>						
G 28, 29, 31, 32, 37, P 29	a	a	a	a	a	+
G 30	a	a	a	a	n	+

Notações: 0 — inalterado; a — acido; n — neutro; + positivo; — negativo.

Certa diferenciação foi conseguida com a rhamnose, levando em consideração o factor tempo, como se vê no quadro 14.

Fermentaram bem e rapidamente os 2 typos *pullorum*, enfraquecendo no fim a acidez, com os gazogenos; o *intermedius* fermentou um pouco mais devagar, sem alcalinizar depois; as amostras *gallinarum* fermentaram lentamente. Estes resultados foram obtidos com soluto do hydrocarbonado esterilizado por filtração e não differiam quasi daquelles conseguidos com esterilização baixa e descontinua.

Quadro 14

Fermentação da rhamnose.

A m o s t r a s	T e m p o e m d i a s						
	1	2	3	4	5	7	10
<i>Pullorum</i> não gazogeno							
P 1, G 39	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pullorum</i> gazogeno							
P 3, P 5, P 6, P 9, P 10, P 13, P 22	+	g	g	g	g	+	±
P 12	g	g	g	g	g	±	±
<i>Intermedius</i> :							
P 7, P 14, P 20, P 21, P 24, P 25, P 26, P 27	-	±	+	+	+	+	+
<i>Gallinarum</i>							
G 28, G 29, G 30, G 31, G 32, G 37	-	-	±	+	+	+	±
P 29	-	-	-	±	±	±	±

Notações — +, positivo; g, acido e gaz; -, negativo; ±, fracamente positivo

Em relação á fermentação da sorbita, duas amostras *pullorum*, P 1, não gazogeno e P 22, gazogeno, não a fermentaram em algumas provas, tendo-o porém feito no inicio, em 1930. As demais fermentaram constantemente, em ataque lento mas definitivo. Pode, pois, o *pullorum* ser considerado fermentador *constante e lento* deste assucar. Um pouco mais activo foi o *intermedius*, tambem fermentador constante. O *gallinarum* não a fermentou jamais. Deve ser notado que a observação destas modificações fermentativas necessita um periodo de observação muito prolongado, porque ellas muitas vezes só apparecem depois de 15 a 30 dias de cultura. Mas ficou bem assegurada esta propriedade do grupo *pullorum-gallinarum*. Tambem a acção favorecedora da sorbita sobre a producção de colonias filhas, a que já nos referimos nesta publicação, merece ser realçada.

Na nossa longa peregrinação, acompanhando as propriedades dessas bacterias, não pudemos confirmar as verificações de Hendrickson, de Edington e de Manninger, sobre modificações nas propriedades culturaes sobrevindas nas bacterias desse grupo, no correr do tempo. É provavel estarem certas as observações de May & Goodner, quanto á parti-

cularidade das amostras novas, recentemente isoladas, comportarem-se de maneira mais irregular na acção fermentativa sobre os assucars do que as amostras antigas, de longa conservação em laboratorio. Foi o que vimos se dar com as amostras *intermedius*, que, muito preguiçosas no ataque á maltose, em 1930, se nos mostraram mais diligentes nesta propriedade, posteriormente. Mas isto está longe de representar a perda ou aquisição da capacidade fermentativa, quer neste assucar quer na dulcita, assucars estes mais vezes referidos pelos pesquisadores como sujeitos a anomalias frequentes na fermentação pelas varias amostras estudadas na Europa e America do Norte.



Prendeu-nos particularmente a atenção a actividade dos representantes do grupo *pullorum-gallinarum* sobre a maltose, em meios usuas ou adicionados de sôro.

Como já foi dito acima, ha ainda desaccôrdo sobre o valor diferencial deste assucar. Não sendo elle normalmente alterado pelos typos *pullorum*, gazogeno ou não gazogeno, varios pesquisadores observaram amostras que se desviavam deste padrão, em meios normaes e especialmente em meios contendo sôro.

Em virtude das pesquisas já effectuadas no sentido de explicar estas anomalias de actuação do *pullorum*, tres causas provaveis foram aventadas para ellas, afóra, naturalmente, a possibilidade de haver amostras atypicas.

- a) Hydrolyse thermica da maltose (May & Goodner, Manninger, Mallmann)
- b) hydrolyse alcalina da maltose (Edwards)
- c) acção excitante da funcção fermentativa bacteriana em meio com sôro (Spray & Doyle).

Segundo Mallmann, a esterilização do meio por filtração em vela, evitando a acção do calor sobre o assucar, supprime o apparecimento da fermentação. Edwards observou, em opposição a Mallmann, fermentação anomala dos *pullorum*, mesmo nos casos de maltose esterilizada por filtração em vela.

Nas series de provas que realisamos, foram feitas esterilisações em condições variadas, seja filtrando, seja esterilizando por aquecimento descontinuo a 60°, seja ainda por aquecimento a 108° durante 1 hora. Resultou evidencia de nenhuma influencia thermica sobre a fermen-

tação da maltose. Chegamos mesmo, em algumas experiencias, a aquecer o assucar a 120° C., durante uma hora, sem notar apperecimento de fermentação pela sementeira posterior de amostras *pullorum*. Em todos os casos, aliás, em que foram usados meios habituaes, sem sôro, nenhuma amostra *pullorum*, gazogena ou não gazogena, provocou a mais ligeira fermentação deste assucar, mesmo observada durante 30 dias a 37° C.

Edwards, para explicar seus casos de fermentação anomala, acredita que a alcalinização do meio realizado pelo *pullorum*, provoca a hydrolise da maltose; em apoio á sua idéa, verifica que soluções alcalinas de maltose, de pH 8.06 ou 8.76, baixam rapidamente seu poder rotatorio, e que meios obtidos a partir destas soluções são rapidamente fermentados pelo *pullorum*. Assim, de accôrdo com Edwards o cyclo — Alcalinização — Hydrolise — Fermentação — é indispensavel para que se verifiquem casos de fermentação anomala pelas amostras *pullorum*.

Seria interessante, a vista dos resultados de Edwards, alcalinizar préviamente o meio de cultura total, com um germen fortemente alcalinizador e inactivo sobre os assucares, fazendo depois a verificação biologica da hydrolise da maltose, no meio filtrado ou aquecido, por meio do *pullorum* ou outro qualquer germen, capaz de fermentar a glycose e não a maltose. Foi-nos impossivel entretanto realizar no momento esta experiencia, por nos faltar uma amostra alcalinizadora nas condições estipuladas. Mas as verificações de Edwards nos suggeriram a hypothese de ser a ausencia de acção tardia sobre a maltose devida ao facto de não serem nossas amostras *pullorum* capazes de alcalinizar os meios de cultura. Não havendo o desdobramento prévio da maltose em glycose, pela acção combinada da alcalinidade e do calôr da estufa, era de prevêr que não se observasse, como não se observou, fermentação.

Quadro 15

Variações do pH em agua de peptona a 3 0/0, adicionada de maltose Riedel a 1 0/0, esterilizada por filtração. Temperatura 37° C.

<i>Pullorum</i>	pH inicial	1d.	2ds.	4ds.	5ds.	7ds.	9ds.	13ds.	18ds.	25ds.	37ds.
P 1	6.8	6.4	6.4	6.5	6.5	6.7	6.6	6.6	6.8	6.8	6.8
P 22	6.8	6.4	6.5	6.5	6.7	6.7	6.6	6.6	6.7		

Occorreu-nos então alcalinizar o meio de cultura artificialmente, até pH 9.0, por meio de uma solução esteril de carbonato de sodio. Depois de deixar este meio alcalino esteril, durante 20 dias na estufa, foi elle neutralizado e semeado com varias amostras *pullorum* e outras especies de germens. O resultado inteiramente negativo desta experiencia deixa-se vêr no quadro 16. O meio de cultura utilizado foi agua de peptona a 3 %, esterilizada a 120° C., durante 15', alcalinizada até pH 9.0 e juntada de 2 % de maltose Riedel, esterilizada por filtração. Como indicador foi juntado o de Andrade.

Quadro 16

A m o s t r a s	Meio normal para prova de fermentação, com 1o/o de maltose	Meio com base na agua de peptona a 3o/o. Hydrolysado a pH 9.0 durante 20 dias a 37o C.
G 39, P 2, P 3, P 4, P 5, P 6, P 8, P 9, P 12, P 13, P 16, P 18, P 19, P 22, P 1	0 até 25 dias	0 até 5 dias
Bacillo dysenterico typo Schmitz, D 17	0 até 25 dias	0 até 5 dias
Bacillo dysenterico typo Shiga, n. 849	0 até 25 dias	0 até 5 dias
Bacillo dysenterico typo Flexner, n. 329-a	AA 48 horas	AA 24 horas
Bacillo dysenterico typo Flexner, n. 804	A 24 horas	AA 24 horas
Tests.	0 até 25 dias	0 até 5 dias

Notações — 0, inalterado; A, acido; AA, fortemente acido. Dosagem colorimetrica.

É provavel que a contradicção existente entre nossas verificações e as de Edwards seja por termos submettido á hydrolyse a maltose no meio de cultura total, ao passo que este autor utilizou uma solução em agua distillada alcalinizada.

Considerando, entretanto, os resultados obtidos com nossas amostras, no prazo de 30 dias em meios habituaes, e o fracasso das nossas tentativas para obter um desdobramento da maltose, tambem nos meios de cultura habituaes, não nos parece que sejam frequentes anomalias ou irregularidades no comportamento dos germens dos typos *pullorum* em contacto com a maltose, nem que falem aos meios com base deste assucar condições de estabilidade suficientes para o trabalho bacteriologico.

A verificação inicial de Spray & Doyle, sobre a fermentação rapida da maltose em meios contendo sôro, foi inteiramente confirmada por nós. Todas as nossas amostras *pullorum* fermentaram francamente, em 24 horas, e a maioria dos *pullorum* gazogenos, com abundante pro-

dução de gaz. Como havíamos entretanto usado nestas experiencias sôro não aquecido, fizemos novas series em que o sôro era submettido previamente a temperaturas variadas, e as semeamos tambem com outros germens inactivos sobre maltose (Quadro 17).

Quadro 17

Influencia do sôro na fermentação da maltose. Temperatura 37° C. Leituras em 1 e 3 ds.

A m o s t r a s	Maltose em meio habitual	Maltose em meio com sôro não aquecido	Maltose com sôro aquecido a 55° C.	Maltose com sôro aquecido a 60° C.
Bacillo dysenterico typo Shiga,	0	A	A	A
Bacillo dysenterico typo Shiga, n. 793	0	A	A	A
Bacillo dysenterico typo Schmitz, n. 824	0	A	A	A
<i>Pullorum</i> P 16	0	AG	AG	AG
Gonococcus n. 9	0	A (3ds.)	A (3ds.)	A (3ds.)
<i>Pasteurella avicida</i> . n. 1716	0	A	A	A
<i>Tests :</i>				
Bacillo dysenterico typo Flexner, n. 822	A	A	A	A
Bacillo <i>coli</i> , n. 938	AG	AG	AG	AG
Bacillo <i>coli</i> , n. 489	AG	AG	AG	AG

Assim, o sôro aquecido até 60° não perdeu seu poder activador sobre a fermentação da maltose.

Quadro 18

Influencia de temperaturas elevadas sobre a acção activadora do sôro na fermentação da maltose. Cultura a 37° C. Amostra empregada na prova P 22.

Prazo de incubação	Sôro não aquecido	Sôro aquecido a 100° C.	Sôro aquecido a 120° C.
Dias	pH	pH	pH
0	7.3	7.5	7.5
1	muito acido	7.2	7.2
2	«	7.1	7.1
3	«	7.1	7.1
4	«	7.1	7.1
6	«	7.2	7.2
7	«	7.2	7.2
9	«	7.2	7.2
11	«	acido 7.0	7.3
15	«	muito acido	7.2
20	«	«	7.1
27	«	«	7.1
41	«	«	7.1

Notações — Dosagem colorimetrica.

Uma outra experiencia, feita com a amostra P 22, parece indicar ser necessario um aquecimento prévio do sôro, superior a 100° C. durante 30 minutos, para destruir totalmente a acção activadora do sôro, vê-se no quadro 18.

Esta experiencia indicava a probabilidade de ser o phenomeno de fermentação da maltose regido por um factor existente no proprio sôro, provavelmente um enzima, capaz de desdobrar a maltose até glycose, a qual seria então facilmente atacada pelo *pullorum*, bem como por todos os germens capazes de agir sobre glycose e não sobre maltose, como aliás succedeu na experiencia reproduzida no quadro 17.

A presença de uma *maltase* no sôro de cavallo, perturbando as verificações de fermentação dos assucares pelas bacterias, já se fizera notada a Ten Broeck, quando este estudava a capacidade fermentativa dos germens da septicemia murina. Em 1920 verificou elle que nos meios enriquecidos com sôro de cavallo, o bacillo dysenterico typo Shiga parecia capaz de desdobrar a maltose, o que não fazia nos meios comuns de fermentação. Imaginamos confirmar a verificação de Ten Broeck, estudando o desvio polarimetrico da solução de maltose, submettida á acção do sôro. As dosagens polarimetricas foram feitas repetidamente pelos Drs. Decio A. de Souza e Candido Florence, a quem agradecemos a valiosa collaboração, e seus resultados tem expressão nos dois protocollos de exames reproduzidos nos quadros 19 e 20.

Quadro 19

Protocollo de exame polarimetrico de solução de maltose com sôro de cavallo, recolhido um anno antes. Temperatura 37° C.

	Hora 0	Hor. 24	Hor. 48	5° dia	10° dia
Solução de sôro a 5 0/0, não aquecida	0° 5	0° 4	0° 45	0° 45	0° 45
Solução de sôro a 5 0/0, com chlorhydrato de quinina a 0.025 0/0	0° 5	0° 5	0° 55	0° 5	0° 5
Solução de maltose a 2 0/0 em agua physiologica	4° 75	4° 85	4° 75	4° 80	4° 75
Solução de maltose a 2 0/0 mais sôro a 5 0/0 em agua physiologica, não aquecida	4° 40	4° 00	3° 90	2° 35	1° 75
Solução de maltose a 2 0/0 mais sôro a 5 0/0 em agua physiologica, aquecido a 60°30m.	4° 30	4° 20	4° 15	4° 05	3° 80
Idem mais sôro aquecido a 70° *	4° 25	4° 15	4° 05	4° 20	4° 15
Idem, mais sôro aquecido a 80° *	4° 20	4° 00	4° 05	4° 15	4° 05
Solução de maltose a 2 0/0 mais sôro não aquecido a 5 0/0, e Chlorhydrato de quinina a 0.025 0/0	4° 30	4° 10	3° 90	2° 80	1° 70
Sol. de glycose a 2 0/0, mais sôro a 5 0/0 não aquecido.	1° 45	1° 45	1° 45	1° 50	1° 35

*As leituras foram prejudicadas pela opacificação consequente á coagulação parcial do sôro pelo aquecimento.

Quadro 20

Protocollo de exame polarimetrico da solução de maltose com sôro de cavallo recolhido ha 3 mezes. Temperatura 37° C.

	Hora 0	Hor. 24	Hor. 48	5 dias	10 dias
Solução (') de sôro a 5 o/o, não aquecida	0 ^o ,50	0 ^o ,50	0 ^o ,45	(o)	0 ^o ,50
Solução de sôro a 5 o/o, não aquecida, mais chlorhydrato de quinina a 0.025 o/o	0 ^o ,55	0 ^o ,60	0 ^o ,60	0 ^o ,55	0 ^o ,60
Solução de glycose a 2 o/o	1 ^o ,70	1 ^o ,70	1 ^o ,70	1 ^o ,70	1 ^o ,70
Solução de glycose a 2 o/o mais sôro não aquecido a 5 o/o	1 ^o ,30	1 ^o ,25	1 ^o ,30	1 ^o ,20	1 ^o ,20
Solução de maltose a 2 o/o	4 ^o ,05	4 ^o ,05	4 ^o ,05	4 ^o ,05	4 ^o ,05
Solução de maltose a 2 o/o mais sôro não aquecido a 5 o/o	3 ^o ,60	3 ^o ,20	2 ^o ,80	1 ^o ,65	(o)
Solução de maltose a 2 o/o mais sôro fresco a 5 o/o e chlorhydrato de quinina a 0.025 o/o	3 ^o ,60	3 ^o ,00	2 ^o ,60	1 ^o ,45	1 ^o ,20
Solução de maltose a 2 o/o mais sôro aquecido a 60° 1 hora, a 5 o/o	3 ^o ,60	3 ^o ,55	3 ^o ,50	3 ^o ,40	3 ^o ,10
Solução de maltose a 2 o/o mais sôro aquecido a 70° 1 hora, a 5 o/o	3 ^o ,45	3 ^o ,40	(o)	(o)	(o)

(') — Em agua physiologica.

(o) — Contaminados os tubos.

Nota — Em outra esperiencia foi usado tambem o fluoreto de sodio a 0.025 o/o, como antifermento. Não foi possivel observar nenhuma influencia deste corpo na queda do poder rotatorio da maltose em contacto com o sôro.

Ficou desta fórma evidenciada a presença no sôro de cavallo de um factor capaz de desdobrar a maltose, extraordinariamente resistente ao calor, ao envelhecimento e aos anti-fermentos chimicos mais geralmente conhecidos.

Creemos razoavel deduzir das provas bacteriologicas e polarimetricas, que o sôro normal ou insufficientemente aquecido, decompõe a maltose em glycose, a qual é por sua vez desdobrada pelas bacterias até acido ou até gaz, conforme a capacidade fermentativa de cada grupo observado.

7) *Produção de gaz.* — Relacionada á fermentação está a produção de gaz, ponto importante na differenciação do grupo *pullorum-gallinarum*, mas um tanto controvertido na opinião dos pesquisadores, vimos acima.

Durante o tempo que vae do segundo semestre de 1930 ao primeiro semestre de 1933, quasi tres annos, por consequencia, não observamos modificação da propriedade gazogena, seja na aquisição, seja na perda della, em qualquer das amostras, menos ainda entre os *pullorum*. Sendo de longa conservação em laboratorio quasi todas as amostras por nós manuseadas, em numero de 25, podemos considerar este caracter como constante, com segurança.

8) *Acção sobre o sal de Seignette (Tartarato duplo de potassio e sodio)*. — Duncan & Henry, em 1927, servem-se do acido tartarico dextrogyro para caracterisar as bacterias do grupo *pullorum-gallinarum*. Para elles o *gallinarum* acidifica o meio contendo essa substancia e o *pullorum* nada faz. Publicado o trabalho de Jordan & Harmon, em 1928, sobre o sal de Rochella na caracterização bacteriana, serve-se Mallmann, tres annos depois, do d-tartarato de potassio e do mucato de sodio na differenciação das bacterias do grupo *pullorum-gallinarum*. Suas conclusões são assim resumidas:

SAL	BACTERIA	
	<i>pullorum</i>	<i>gallinarum</i>
d-tartarato de potassio	alcali	acido
mucato de sodio	acido	alcali

Nós só dispuzemos do sal de Seignette e deu-nos elle resultados uniformes, observado até o 6.º dia. Usamos na preparação do meio a modificação proposta ao meio de Jordan & Harmon por Rodrigues, em 1931, na caracterização do bacillo de Sonne (Kruse E); nesta modificação o meio é recoberto de paraffina, porque Rodrigues observou ser a anaerobiose favoravel ao ataque do tartarato pela bacteria.

Não acidificaram-n'ò todas as amostras *pullorum* gazogeno e não gazogeno, bem como o *intermedius*. Acidificaram-n'ò dentro de 24 a 72 horas, todos os *gallinarum*. A amostra P 28 se comportou aqui como os *intermedius*, não acidificando o meio. Durante tres annos a capacidade fermentativa dos *gallinarum* e a indiferença no ataque ao sal pelo *pullorum* e pelo *intermedius*, mantiveram-se constantes.

Nossos resultados concordam com os de Mallmann, applicados no mesmo sentido.

*

*

*

Recapitulando, em resumo, para fixar bem, os caracteres biologicos observados nas amostras por nós trabalhadas, podemos classificalos em:

1) *Caracteres geraes*. — Bastonetes curtos, arredondados nas extremidades, não dotados de mobilidade, Gram negativos. Fórmias filamentosas produzem-se nas culturas em meios liquidos. Dispõem-se isoladamente, excepcionalmente são vistas em cadeias de poucos elementos. Em meios de cultura solidos dão colonias, de tamanhos variaveis com

o typo, microbiano, transparentes, de superficie lisa e brilhante, terminando os bordos regulares ou denteados. Turvam uniformemente o caldo peptonado e dão pequeno deposito pulverulento, com o correr dos dias, dissolvido pela agitação. Algumas vezes dão collar; não dão pellicula.

Acidificam lentamente o leite e o sôro de leite tornasolados; algumas amostras alcalinizam tardiamente. Não dão indol. Transformam irregularmente nitratos em nitritos. Formam no agar-chumbo ou agar-bismutho quantidade variavel de gaz sulfhydrico. Não são proteolíticas; crescem na gelatina a 20°, sem fundil-a. Mal crescem na batata, em induto, quasi invisível. Não geram pigmentos nem fluorescencia. Decompõem sempre, com producção de acido, acompanhada ou não de gaz, conforme o typo bacteriano — glycole, arabinose, levulose, galactose, mannita, inulina, mannose e glicerina. Saccharose, lactose, raffinose, salicina, inosita não são alterados. Rhamnose, dulcita, maltose e sorbita são fermentadas por alguns, não por outros, e se prestam á diferenciação dos componentes do grupo.

2) Caracteres diferenciaes.

Meio de cultura	<i>Putorum</i> não gazogeno	<i>Pullorum</i> gazogeno	<i>Gallarum</i> gazogeno ?	<i>Gallarum</i> não gazogeno	<i>Intermedius</i>
Agar de Gassner	Colonia e meio de cultura azues	Col. e meio de cult. amarellados	Col. e meio de cult. amarellados	Col. e meio de cult. amarellados	Col. e meio de cult. amarellados
Agar Drigalski (maltosado)	Colonia e meio de cultura azues	Col. e meio de cultura azues	Col. e meio de cult vermelhos	Col. e meio de cult. vermelhos	Col. e meio de cult. vermelhas
Vermelho neutro, anaerobio, sem glycole	Inalterado	Fluorescencia	Inalterado	Inalterado	Fluorescencia
PRODUÇÃO DE H ² S					
a) gelatina e "Iron-peptone"	+	+	+	+	irregular e -
b) Pacheco & Mello	-	-	-	+	-
c) Pacheco & Mello cystinado	-	-	-	++	-
FERMENTAÇÃO					
a) glicerina	+ irregular	+ irregular	+	+ irregular	+
b) rhamnose	+ 1 dia	+ 1 dia	+ 5 dias	+ 4 dias	+ 2 dias
c) xylose	+	+	-	+	-
d) dulcita	-	-	+	+	+
e) sorbita	+ lento	+ lento	+ lento	-	+ lento
f) maltose	-	-	+	+	+
Produção de gaz	-	+	+	-	+
Tartarato	-	-	-	+	-

RELAÇÕES ANTIGENICAS

Desde que Smith & Ten Broeck, em 1915, lançaram as bases para o estudo das relações antigenicas dos representantes do grupo *pullorum-gallinarum*, numerosos autores tem-se occupado do assumpto, tendo sido postos em confronto com a maioria dos representantes dos generos *Salmonella* e *Shigella*. Seria demasiado longo enumerar todos estes trabalhos, sendo preferivel agrupar seus resultados n'um quadro, como se vê no quadro 20. Dispensamo-nos de incluir neste quadro verificações esparsas que demonstram a inexistencia de quaesquer relações de parentesco sôrologico com as especies do genero *Shigella*, com o *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a *Pasteurella avicida* e a *Escherichia coli*.

Até 1928 estava bem estabelecido:

- a) que todos os germens do grupo *pullorum-gallinarum* tem a mesma constituição antigenica.
- b) que existe parentesco sôrologico muito pronunciado com a *Salmonella (Eberthella) typhosa*, menos pronunciado com a *Salmonella enteritidis* e com a *S. paratyphi* (B. paratyphico A).

Estas relações decorrem dos trabalhos resumidos no quadro 21.

Observações de Takaianagi, referidas por Aoki, e do proprio Aoki, differiram entretanto deste consenso geral, por terem podido verificar nos *pullorum* um antigeno especial, que só reagia com os sôros *pullorum*.

As verificações de Aoki foram confirmadas por Takaianagi, que chegou a demonstrar, por imunização cruzada de camondongos, a sua validez. Os trabalhos de Aoki e colaboradores não foram entretanto aceitos pela « Comissão de Nomenclatura das Salmonellas », reunido recentemente, e da qual o proprio Aoki era membro.

Kauffmann, em longa exposição sobre a sôrologia das salmonellas, publicada em 1931, reúne todo o grupo *pullorum-gallinarum* sob a mesma designação « *pullorum* », e lhe dá uma posição antigenica definida, dentro das salmonellas, com presença unica de um só antigeno O, aliás identico ao da *S. typhosa*. Assim, de accôrdo com Kauffmann, um sôro obtido com *pullorum* é inteiramente saturado pelos germens typho ou enteritidis, que possuem o mesmo antigeno O. Em compensação não deve ser saturado nem deve agglutinar suspensões da *Salmonella paratyphi* (B. paratyphica A), de constituição antigenica completamente diferente no esquema de Kauffmann.

A discriminação de Kauffmann vem de encontro a todos os demais pesquisadores; entretanto ella não é integralmente aceita pela Sub-

Commissão de Nomenclatura das Salmonellas, que subdivide o typo « *pullorum* » de Kauffmann em *pullorum* e *gallinarum*, a custa de elementos puramente culturaes.

Nenhum dos numerosos pesquisadores que se tem preocupado com o problema, procurou estudar separadamente o typo *pullorum* não gazogeno, sob o ponto de vista de suas relações sôrologicas com os demais typos. Sobre o *intermedius*, ha ligeiras referencias no trabalho de Beck & Eber, de 1927. Quanto ao typo *gallinarum* gazogeno ainda não se encontram referencias na litteratura. Finalmente, o typo *gallinarum* Duisburg, posto em evidencia por Kauffmann, a nosso vêr identico ao que descrevemos como *intermedius*, não foi ainda estudado sôrologicamente em conjunto.



Iniciando o trabalho de caracterização cultural de nossas amostras, procuramos tambem apoiá-lo em exames sôrologicos. Com sôros obtidos de cabras imunizadas, procedemos a agglutinação de todas as amostras em estudo, além de outras da Collecção do Instituto Biologico de S. Paulo, representando diversas especies de Salmonellas e Shigellas. Preparamos assim sôros agglutinantes com as amostras: P 1, *pullorum* não gazogeno; P 14, *intermedius*; G 30, *gallinarum*. *Salmonella typhosa* n.º 895 (Amostra Hopkins); *S. enteritidis* 669 (273 da Coll. de Krumwiede); *S. schottmülleri* n.º 690; *S. columbensis* n.º 658; *S. anatum* n.º 817 da Amer. Type Cult. Coll.; *S. anatum* n.º 818 da Amer. Type Cult. Coll.; *S. psittacosis*, recebida de Lewis; *Shigella paradysenteriae*, var. Sonne, n.º 115; *S. paradysenteriae*, var. Flexner, n.º 820; *S. paradysenteriae*, var. Schmitz, n.º 844. Os sôros eram preparados inoculando em cabra, subcutaneamente, emulsões vivas de culturas de 24 horas, cada tres dias; em seguida, culturas mortas pelo phenol ou pelo calor (60º), na veia.

Nada de novo, além do conhecido e acima referido, foi observado sobre a relação sôrologica entre os germens estudados. Nenhuma affinidade revelaram os representantes do grupo *pullorum-gallinarum* para os bacillos dysentericos. Eguamente não houve coagglutinações com as salmonellas de aves por nós utilizadas, nem com as *S. schottmülleri*. O parentesco universalmente conhecido, entre germens do grupo *pullorum-gallinarum* e as *Salmonellas typhosa*, *paratyphi* e *enteritidis*, foi por nós de novo encontrada. Em relação as affinidades entre os diversos componentes do grupo, pareceu-nos, pelos resultados desta primeira

Quadro 21

S Ô R O S	A M O S T R A S																						
	<i>S. pullorum</i>		<i>S. gallinarum</i>		<i>S. typhosa</i>		<i>S. paratyphi</i>		<i>S. shottmülleri</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>S. suipestifer</i>		<i>S. abortus equi</i>		<i>S. typhimurium (Breslau)</i>		<i>S. suipestifer (Newport)</i>		<i>S. suipestifer (Stanley)</i>		
	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	Agg.	Autor	
<i>Salmonella pullorum</i>			T	Reb. M	+	Reb.	+	Reb. A	0	A	+	Reb. M A	0	Reb.	0	x	0	x	0	A	0	A	
<i>S. gallinarum</i>	+	T Reb. M			+	Auto-res	+	Reb. A	0	A	+	A M G	0	Reb.	+	M G	T	Mt. G	0	A	0	A	
<i>S. typhosa</i>	+	Reb. M A	+	Auto-res	+		+	Reb. A	0	A	+	Reb. A	0	Reb.	0	x	0	x	0	A	+	A	
<i>S. paratyphi</i>	+	Reb. A	+	Auto-res	+	Reb. A			0	x	+	Reb. x	0	Reb.	0	x	0	x	0	x	0	x	
<i>S. shottmülleri</i>	0	A	0	A	+	Reb. A	0	x			+	ou 0	x	+	x	+	x	+	x	+	x	+	x
<i>S. enteritidis</i>	0	Reb. M A	+	Auto-res	+	A	+	Reb.	0	Reb. x			x ?	Reb.	0	x	0	x	0	x	0	x	
<i>S. suipestifer</i>	0	Auto-res	0	Auto-res	+	A	0	Reb. x	+	x	0	Reb. x			0	x	+	x	+	x	+	x	
<i>S. abortus-equi</i>	0	M	0	M	0	x	0	x	+	x	0	x	0	x	x		+	x	+	x	+	x	
<i>S. typhimurium (Breslau)</i>	0	A	0	A	+	A	0	x	+	x	0	x	+	x	+	x			+	x	+	x	
<i>S. suipestifer (Newport)</i>	0	A	0	A	0	A	0	x	+	x	0	x	+	x	+	x	+	x			+	x	
<i>S. suipestifer (Stanley)</i>	0	A	0	A	+	A	0	x	+	x	0	x	+	x	+	x	+	x			+	x	

Notações — Takaianagi, (T) Rebrassier, (Reb.) Mulsow, (M) Matthews, (Mt) Gressel, (G) Aoki, (A) Eschema de Kauffmann, (x).

NOTA — Quadro compilado dos trabalhos de Takaianagi 1926, Smith & Ten Broeck 1916, Rebrassier 1926, Pfeiler & Stand fuss 1919, Mulsow 1919, Matthews 1928, Krumwiede & Conh 1917, Kraus 1919, Hadley 1919, Gresse 1927, Ehrlich 1926, Aoki 1928.

prova, não ser possível estabelecer diferença sôrológica importante entre elles.

Sendo os sôros obtidos em cabra geralmente de fraco poder agglutinante, as amostras que demonstraram nesta prova inicial alguma afinidade sôrológica foram utilizadas para se preparar sôro em coelho, melhor productor de agglutinas que a cabra. Usamos agora, as amostras P 1 e G 39 *pullorum* não gazogeno, P 13 *pullorum* gazogeno, P 14 *intermedius*, G 30 e G 27 *gallinarum* não gazogeno, P 28 *gallinarum* gazogeno, *S. typhosa* 895, *S. enteritidis* « Jena » e *S. paratyphi* « Tunis », as duas ultimas recebidas do Prof. Kauffmann. Germens, mortos pelo phenol e depois vivos, eram inoculados na veia marginal da orelha, de tres em tres dias. Para obter antigeno retiramos induto de cultura do agar aconselhado por Meyer & Batchelder, usado para obter antigeno da *Pasteurella pestis*. Conseguimos assim em 24 horas vegetação abundante, com todas as amostras, mesmo da amostra P 1, *pullorum* não gazogeno, cujo crescimento é lento nos meios habituaes de cultura, como vimos.

Pode-se inferir do quadro 22, onde estão tabellados os resultados obtidos, a perfeita identidade sôrológica entre os diversos typos do grupo *pullorum-gallinarum*, ao lado de suas relações sôrológicas com a *S. typhosa* e *S. enteritidis*.

Finalmente, por ocasião de finalizar as provas biologicas, repetimos o exame sôrológico de representantes de todos os typos do grupo estudado, usando ainda sôros obtidos em coelhos, immunisados recentemente, pelo mesmo processo acima referido (quadro 23).

Não é possível deduzir dos resultados obtidos qualquer diferenciação sôrológica entre os diversos typos do grupo *pullorum-gallinarum*; uma menor agglutinação das amostras *gallinarum* gaz negativas, já vista anteriormente, parece correr por conta antes de mais fraca agglutinabilidade, como o demonstra o seu confronto com os sôros homologos. O sôro obtido com a amostra P 14, *intermedius*, embora de mais fraco poder agglutinante, atuou igual e indifferentemente com todas as amostras do grupo.

A unidade sôrológica entre todos os typos do grupo é ainda reforçada pelo exame das provas de saturação das agglutininas, vistos nos quadros 24 a 30.

Quadro 22

Provas de agglutinação das diversas amostras *pullorum-gallinarum* entre si e das bacterias com ellas relacionadas.

Amostras	S Ô R O S				
	P. 1	P. 14	G. 30	<i>S. typhosa</i>	<i>S. enteritidis</i>
P 1	15000	8000	400	—	500
G 39	15000	15000	1600	400	500
P 7	10000	8000	800	1600	100
P 14	15000	15000	400	400	100
P 20	15000	10000	800	1600	200
P 21	10000	6000	800	400	100
P 24	15000	8000	1600	400	200
P 25	15000	12500	800	800	200
P 26	10000	4000	800	400	50
P 27	7500	6000	800	800	0
P 2	15000	15000	800	400	200
P 3	15000	15000	1600	—	1000
P 4	10000	4000	400	400	50
P 5	15000	6000	400	800	0
P 6	15000	15000	200	1600	1000
P 8	15000	15000	400	3200	200
P 9	15000	4000	200	400	100
P 10	15000	15000	1600	800	—
P 11	15000	8000	400	1600	500
P 12	10000	15000	1600	400	1000
P 13	12500	15000	1600	400	100
P 15	15000	15000	1600	1600	500
P 16	15000	15000	1600	800	200
P 18	10000	15000	1600	400	200
P 19	15000	4000	400	800	0
P 22	10000	15000	1600	200	500
P 29	5000	2000	200	200	0
G 27	10000	4000	200	0	—
G 28	15000	2000	400	200	50
G 29	15000	2000	200	100	1000
G 30	15000	4000	400	200	—
G 31	10000	2000	400	0	0
G 32	7500	2000	400	0	—
G 33	10000	2000	100	400	—
G 34	5000	2000	200	0	—
G 36	10000	2000	200	0	—
G 37	5000	2000	100	0	0
<i>S. typhosa</i> 892	15000	15000	200	1600	0
<i>S. paratyphi</i> 687	5000	2000	100	0	1000
<i>S. enteritidis</i> 600	15000	4000	400	400	1000

NOTA — Os sôros referidos no texto não incluídos no quadro foram omitidos porque não offereciam interesse os resultados.

Quadro 23

	Soro pullorum gaz —		Soro Pullorum gaz + P 13 (coelho 8956) Tit. 20000	Soro Intermedius P 14 (coelho 9839) Tit. 6400	Soros gallinarum gaz —		Soro gallinarum gaz + P 28 (coelho 9840) Tit. 1200	Soro S. typhosa 896 (coelho 9943) Tit. 2560	Soro S. enteritidis "Jena" (coelho 9793) Tit. 2500	Soro S. paratyphi "Tunis" (coelho 9886) Tit. 640
	P 1 (coelhos 8974 e 8976) Tit. 15000	G 39 (coelho 8957) Tit. 20000			G 27 (coelho 8965) Tit. 7500	G 30 (coelho 8977) Tit. 3500				
Pullorum não gazogeno	P 1 15000	20000	10000	320	10000	15000	1200	640	1600	640
	G 39 15000	20000	15000	640	15000	10000	640	1200	800	640
Pullorum gazogeno	P 5 10000	20000	5000	640	15000	5000	1200	640	800	640
	P 10 10000	20000	20000	640	5000	7500	1200	1200	1600	640
	P 13 10000	20000	20000	640	5000	7500	1200	640	1600	640
	P 22 10000	20000	20000	640	5000	7500	1200	320	400	160
Intermedius	P 14 7500	15000	5000	3200	10000	5000	1600	1600	3200	1200
	P 7 7500	15000	5000	320	10000	5000	640	1200	1600	640
	P 21 7500	15000	5000	320	10000	5000	1200	320	1600	640
	P 27 7500	15000	5000	640	10000	5000	2500	320	1600	320
Gallinarum	G 27 2000	5000	3500	320	7500	3500	1200	320	1600	320
	G 30 3500	15000	5000	640	7500	3500	1200	640	1600	640
	G 31 3500	15000	5000	160	7500	3500	640	320	1600	320
	G 37 3500	15000	5000	160	7500	3500	1200	640	800	640
Gallinarum gazogeno ?	P 28 20000	20000	10000	1600	10000	7500	1600	1600	3200	1600
S. typhosa	896 3500	3500	1000	320	7500	5000	320	2560	640	160
Gonococcus	669 7500	5000	5000	1200	5000	3500	1200	1200	3200	80
S. paratyphi	1000 1000	500	200	0	200	500	200	20	40	2500

Quadro 24

Soro agglutinante P 1 (*Pullorum* não gazogeno). Coelho 8976. Titulo 1/15000.

Provado com	A B S O R V I D O P O R					
	<i>Pullorum</i> gaz —	<i>Pullorum</i> gaz +	<i>Intermedius</i>	<i>Gallinarum</i> gaz —		<i>Gallinarum</i> gsz +
	P 1	P 13	P 14	G 27	G 30	P 28
P 1	—	—	—	—	—	—
G 39	—	—	—	—	—	—
P 13	—	—	—	—	—	—
P 14	—	—	—	—	—	—
G 27	—	—	—	—	—	—
G 30	—	—	—	—	+ 1/100	—
P 28	—	—	—	—	—	—

Quadro 25

Sôro agglutinante G 30 (*Gallinarum*). Coelho 8977. Titulo 1/5000.

Provado com	A B S O R V I D O P O R					
	<i>Pullorum</i> gaz —	<i>Pullorum</i> gaz +	<i>Intermedius</i>	<i>Gallinarum</i> gaz —		<i>Gallinarum</i> gaz +
	P 1	P 13	P 14	G 27	G 30	P 28
P 1	—	—	—	—	—	—
G 39	—	—	—	—	—	—
P 12	—	—	+ 1/25	—	—	—
P 14	—	—	—	—	—	—
G 27	—	—	—	—	—	—
G 30	—	—	—	—	+ 1/200	—
P 28	—	—	—	—	—	—

Quadro 26

Sôro agglutinante P 13 (*Pullorum* gazogeno). Coelho 8956. Titulo 1/20000.

Provado com	A B S O R V I D O P O R						
	<i>Pullorum</i> gaz —		<i>Pullorum</i> gaz +	<i>Intermedius</i>	<i>Gallinarum</i> gaz —		<i>Gallinarum</i> gaz +
	P 1	G 39	P 13	P 14	G 27	G 30	P 28
P 1	—	—	—	—	—	—	—
G 39	—	—	—	—	—	—	—
P 13	—	—	—	—	—	—	+ 1/100
P 14	—	—	—	—	—	—	—
G 27	—	—	—	—	—	—	—
G 30	—	—	—	—	—	—	—
P 28	—	—	—	—	—	—	—

Quadro 27

Sôro agglutinante G 27 (*Gallinarum*). Coelho 8968. Titulo 1 / 7500

Provado com	A B S O R V I D O P O R						
	<i>Pullorum</i> gaz -		<i>Pullorum</i> gaz +	<i>Intermedius</i>	<i>Gallinarum</i> gaz -		<i>Gallinarum</i> gaz +
	P 1	G 39	P 13	P 14	G 27	G 30	P 28
P 1	-	-	-	-	-	-	-
G 39	-	-	-	-	-	-	-
P 14	-	-	-	-	-	-	-
P 13	-	-	-	-	-	-	-
G 27	-	-	-	-	-	-	-
G 30	-	-	-	-	-	-	-
P 28	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 28

Sôro agglutinante P 28 + (*Gallinarum* gazogeno?). Coelho 7321. Titulo 1/2000.

Provado com	A B S O R V I D O P O R					
	<i>Pullorum</i> gaz -		<i>Pullorum</i> gaz +	<i>Intermedius</i>	<i>Gallinarum</i> gaz -	<i>Gallinarum</i> gaz +
	P 1	G 39	P 13	P 14	G 27	P 28
P 1	-	-	-	-	-	-
G 39	-	-	-	-	-	-
P 13	-	-	-	-	-	-
P 14	-	-	-	-	-	-
G 27	-	-	-	-	-	-
G 30	-	-	-	-	-	-
P 28	+ 1/200	+ 1/200	+ 1/200	+ 1/800	+ 1/1650	-

Quadro 29

Sôro agglutinante P 14 (*Intermedius*).

Provado com	A B S O R V I D O P O R		
	<i>Pullorum</i> gaz -	<i>Gallinarum</i> gaz -	<i>Gallinarum</i> gaz +
	G 39	G 30	P 28
P 1	-	-	-
G 39	-	-	-
P 13	-	-	-
P 14	-	+ 1/20	-
G 30	-	-	-
P 28	-	-	-

Quadro 30

Sôro agglutinante G 39 (*Pullorum* não gazogeno). Coelho 8975. Titulo 1/20000.

Provado com	A B S O R V I D O P O R						
	<i>Pullorum</i> gaz -		<i>Pullorum</i> gaz +	<i>Intermedius</i>	<i>Gallinarum</i> gaz -		<i>Gallinarum</i> gaz +
	P 1	G 39	P 13	P 14	G 27	G 30	P 28
P 1	—	—	—	—	—	—	—
G 39	—	—	—	—	—	+ 1/100	—
P 13	—	—	—	—	—	—	—
P 14	—	—	—	—	—	—	—
G 27	—	—	—	—	—	—	—
G 30	—	—	—	—	—	1/400	—
P 28	—	—	—	—	—	—	—

Duas questões não ficaram convenientemente esclarecidas: a presença de um antígeno especial no typo *pullorum*, visto por Aoki e colaboradores, e a afinidade entre os germens do grupo *pullorum-gallinarum* e a *S. paratyphi*. Segundo Kauffmann, cujo esquema de divisão sôrologica das salmonellas foi integralmente aceito pela Sub-Comissão de Nomenclatura das Salmonellas, não existe qualquer afinidade sôrologica entre *S. paratyphi* (*B. paratyphosus* A) (antígenos I, II e "a") e o grupo *pullorum-gallinarum* (antígeno IX, unico). Vê-se, pelo quadro acima, que numerosas de nossas amostras reagem, embora fracamente, no sôro obtido com a amostra «Tunis» de Kauffmann, assim como emulsões desta são parcialmente agglutinadas nos sôros *pullorum-gallinarum*. A este respeito, não foram feitas provas de saturação de agglutininas.

Por outro lado, dada a absoluta identidade antigenica observada por nós em nossas amostras, incluindo todos os typos do grupo, não nos parece provavel existir uma estrutura antigenica especial nos typos *pullorum*.

RESUMO

Foram examinadas 38 amostras de germens do grupo *pullorum-gallinarum*, de origem européa, americana ou isoladas no Brasil, acompanhadas bacteriologicamente durante 3 annos, na fixidez de suas propriedades ou na possibilidade de sua transformação dum typo em outro.

a) Distinguiram-se no estudo das propriedades cinco typos de germens no grupo *pullorum-gallinarum* — 1) *pullorum* gazogeno, 2) *pullorum*

não gazogeno, 3) *intermedius*, 4) *gallinarum* ou *intermedius*? gazogeno, 5) *gallinarum* não gazogeno. Os 2 primeiros e o 5.º já bem conhecidos e aceitos; o 4.º admittido por Beck & Eber, em 1929, o 3.º evidenciado por nós em 1935.

- b) O typo *gallinarum* gazogeno deve ser mais propriamente talvez considerado como typo *intermedius* gazogeno a vista de sua acção sobre sorbita e a xylose e sobre o meio de Jordan.
- c) O quadro final resume as características mais importantes destes cinco typos, baseando-se a diferenciação principalmente na alteração do vermelho neutro, na produção de H²S, na fermentação de glicerina, rhamnose, xylose, dulcita, sorbita e maltose, na acção sobre o tartaro, na produção de gaz e no aspecto das colonias na superficie de certos meios de cultura.
- d) Outras propriedades biologicas examinadas — acção sobre o leite, sôro de leite, dextrina, etc., admittidos por varios pesquisadores na diferenciação, parecem distituidas de valor.
- e) As amostras mantiveram fixas as suas propriedades durante todo o tempo em que foram acompanhadas. A hypothese de uma possivel transformação de um typo em outro não foi confirmada em nenhuma das amostras estudadas, justificando a entidade dos varios typos admittidos.
- f) Discrepancias observadas na fermentação da maltose, referidas por varios pesquisadores com germens desse grupo, não foram confirmadas no presente trabalho.
- g) Encontrou-se no sôro sanguineo um factor capaz de transformar a maltose em glycose, tornando aquelle assucar fermentescivel. Essa substancia é thermo-estavel e resiste á acção de substancias anti-diasticas.
- h) A analyse sôrologica das amostras estudadas não permittiu differenciar os typos entre si.

REFERENCIAS

AOKI, K.

1928. Ueber die immunisatorische Beziehung zwischen den Typhusbazillen einerseits und die Hühnertyphus-Pullorum-Bazillen andererseits. Cent. Bakt. **107** : 324.

BEAUDETTE, FR.

1925. The possible transmission of fowl typhoid through the egg. Jl. of Amer. Vet. M. Ass., **67** : 741.

BEAUDETTE, FR., BUSCHNELL, L. D. & PAYNE, L. F.

1923. Study of an organism resembling *Bact. pullorum* from unabsorbed yolk of chicks « dead in shell ». *Jl. of Inf. Dis.*, **32** : 124.
1923. Relation of *Bact. pullorum* to hatchability of eggs. *Jl. of Inf. Dis.*, **33** : 331.

BECK & EBER, R.

1929. Bakterielle weisse Ruhr der Kücken. *Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk.*, **56** : 77.
1929. Die wichtigsten bakteriellen Hühnererkrankungen. *Zeitschr. f. Inf. d. Haust.*, **55** : 77.

BELLER

1926. Bakterielle Kückenruhr (sog. weisse Ruhr) und ihre Beziehungen zum Hühnertyphus. *Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt.*, **57** : 462.

CERNEAIANU & POPOVICI

- Quoted by VACCARO — *B. pullorum* au Chili. *C. R. S. Biologie*, **110** : 629.

CILLI, V.

1932. L'analisi dei recettori somatici nelle metasalmonelle aviarie. *Bol. Inst. Sierot. Milanese*, **5** (2) : 359.

CLARK, W. M. & LUBS, H. A.

1915. The differentiation of bacteria of the *Colon-aerogenes* family by the use of indicators. *Jl. Inf. Dis.*, **17** : 160.

DONATION, A., PLANTUREUX E. & LESTOQUARD, F.

1924. La typhose aviaire en Algerie. *Rev. Gén. de Med. Vét.*, **33** : 65.

EDINGTON, J. W.

1924. The bacteriological study of Fowl typhoid and allied infections, with special reference to three epidemics. *Jl. of Path. a. Bact.*, **27** : 427.

EDWARDS, P. R.

1928. The fermentation of maltose by *Bacterium pullorum*. *Jl. of Bact.*, **15** : 235.
1932. A variante occurring naturally in cultures of *Salmonella pullorum*. *Jl. of the Am. Vet. Med. Ass.*, **33** : 891.

EHRlich, D.

1925. Ueber Hühnertyphus und einige Fälle von Hühnerparatyphus. *Deut. tierärztl. Woch.*, 627.

GAGE, E. E.

1911. Notes on ovarian infection with *Bact. pullorum* (Rettger) in the domestic fowl. *Jl. of Med. Res.*, **24** : 491.

GOLDBERG, S. A.

1917. A study of the fermenting properties of *Bact. pullorum* (Rettger) and *Bact. sanguinarum* (Moore). *Jl. of the Am. Vet. Med. Ass.*, **51** : 203.

GRESSEL,

1927. Vergleichende Untersuchungen über das *Bact. paradysenteriae* (*Bact. gallinarum* Klein, *Bact. sanguinarum* Moore, *Bact. typhigallinarum alcalifaciens* Pfeiler). *Deutsche Tierärztl. Woch.*, 267.
1928. Zur Differenzierung des *Bact. pullorum* (Rettger) vom *Bact. paradysenteriae* (*Bact. gallinarum* Klein, *Bact. sanguinarum* Moore, *Bact. typhigallinarum alcalifaciens* Pfeiler). *Deutsche Tierärztl. Woch.*, **281**.

GUERBERT, M.

1911. Étude de la réaction du rouge neutre au point de vue chimique. *C. R. S. Biologie*, **70** : 514.

GUENTHER, K,

1933. Vergleichende Untersuchungen über das *Bact. pullorum* Rettger 1909 das *Bact. gallinarum* Klein, 1889. *C. f. Bakt. O.*, **128**, 1927.

HADLEY, P.

1918. *R. I. Exper. Sta. Bull.*, **64**.
1919. The diagnosis of fowl-cholera and fowl-typhoid infections in domestic birds. *Jl. of the Am. Vet. M. Ass.*, **55** : 186.

HALLÉ & DISSARD,

Ref. de ROCHAIX & DUFOURT (1910) — *loc. cit.*

HADLEY, ELKINS & CALDWELL

R. I. Agr. Exp. Sta. Bull., **174**.

HENDRICKSON, J. M.

1927. The differentiation of *Bact. pullorum* (Rettger) and *Bact. sanguinarum* (Moore). *Jl. of the Am. Vet. M. Ass.*, **70** : 629.

HOLT-HARRIS, J. E. & TEAGUE, O.

1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. *Jl. Inf. Dis.*, **18** : 596.

KAUFFMANN, KAUPP, B. K. & DEARSTYNE, R. S.

1925. The differential diagnosis of fowl-typhoid. *Jl. Am. Vet. M. Ass.*, **78** : 249.

KLEIN, E.

1889. Ueber eine epidemische Krankheit der Hühner, verursacht durch einen Bazillus — *Bacillus gallinarum*. *C. f. Bakt. O.*, **5** : 689.

KLIMMER, M. & HAUPT, H.

1927. Ueber Infektion von Hühnern mit dem Bakterium gallinarum Klein. C. f. Bakt. O., **105** : 99.

KONNO, T.

1929. Japanische infektiöse Diarrhea « Kiifun » (Bazilläre weisse Ruhr der Kücken in Japan). Deut. Tier. Woch., 482, 1929.

KRAUS, E. J.

1919. Zur Kenntniss des Hühnertyphus. C. f. Bakt. O., **82** : 282.

KRUMWIEDE, C. & KOHN, L.

1917. The differentiation of the members of the paratyphoid-enteritidis group from *B. typhosus*, with special reference to anaerogenic strains, and observations on the fermentative characteristics of the avian group. Jl. Med. Res., **36** : 509.

LERCHE

1929. Die bakterielle weisse Ruhr der Kücken. Ztschr. f. Infkh. der Haust., **55** : 139.

MALLMANN, W. L.

1929. Salmonella pullorum in the intestinal contents of baby chicks. Jl. of Inf. Dis., **46** : 16.
1931. Use of organic acids for differentiation of Salmonella pullorum and *S. gallinarum*. Proc. Soc. exp. biol. a. Med., **28** : 501.

MALLMANN, W. L., THORP, JR. F. & SEMMES, M.

1928. A medium for the isolation of Salmonella pullorum and other members of the paratyphoid group from avian tissues. Jl. Am. Vet. M. Ass., **73** : 825.

MANNINGER, R.

1928. Untersuchungen über Kückenruhr und Hühnertyphus. Ztschr. f. Infekh. d. Haust., **36** : 265.

MATHEWS, F. P.

1926. The agglutinative and antigenic properties of Salmonella pullora and Eberthella sanguinaria. Jl. Am. Vet. M. Ass., **69** : 371.
1927. Factors influencing the control of Bacillary white Diarrhœa. Jl. Am. Veter. M. Ass., **71** : 585.

MAY, H. G. & GOODNER, K.

1927. Cultural and antigenic studies on *S. gallinarum* and *S. pullorum*. Jl. of Bact., **13** : 129.

MIESSNER, H. & BERGE, R.

1928. Die weisse Ruhr der Kücken. Deut. Tier. Woch. Festsch. zur Jubiläumsfeier der Tierarztschul., Hannover, 44.

MOORE, V. A.

1895. A study of a bacillus obtained from three outbreaks of fowl-cholera. U. S. Dept. of Agr., Bureau of An. Ind., Bull. n.º 8.

MULSOW, F. W.

1919. The differentiation and distribution of the paratyphoid enteritidis group. VI—Avian paratyphoid bacilli: A comparative study of *B. pullorum* and *B. sanguinarum*. Jl. of Inf. Dis., **25** : 135.

PACHECO, C. & MELLO, T.

1932. Novo methodo para pesquisa do hydrogenio sulfurado nas culturas bacterianas. Ann. Fac. Med. de São Paulo, **8**.

PFEILER, W.

1921. Identitätsnachweis für den Erreger der Kleinschen Hühnerseuche und dem Pfeiler-Reseschen Hühnertyphus-Bazillus. C. f. Bakt., **85** : 193.

PFEILER, W. & HOEPKE

1917. C. f. Bakt. O., **79** : 125.

PFEILER W. & STANDFUSS, R.

1919. Kasuistische, bakteriologische, pathologisch-anatomische sowie experimentelle Untersuchungen über Hühnertyphus. Arch. f. Tierhk., **45** : 163.

PLASAJ, S.

1931. Cent. f. Bakt. Ref.

REBRASSIER, R. E.

1926. Studies of *Salmonella pullora*. Jl. of the Am. Vet. Med. Ass., **73** : 603.

RETTGER, L. F.

1900. Septicemia among young chickens. The N. Y. Med. Jl., **71** : 803.
1901. Septicemia among young chickens. The N. Y. Med. Jl. **73** : 267.
1909. Further studies on fatal septicemia in young chickens. Jl. of Med. Res., **21** : 115.
1914. Ovarian infection in the domestic fowl and the direct transmission of the disease to the offspring. Jl. of Exp. Med., **19** : 552.

RETTGER, L. F. & HARVEY, S. C.

1908. Fatal septicemia in young chickens, or white diarrhea. Jl. of Med. Res., **18** : 277.

RETTGER, L. F., HULL, F. G. & STUERGES, W. S.

1916. Feeding experiments with *Bacterium pullorum*. The toxicity of infected eggs. *Jl. of Exp. Med.*, **23** : 475.

RETTGER, KIRCKPATRICK & STONEBURN

1912. *Con. Storrs Agr. Sta. Bull.*, **74**.

RETTGER, L. F. & OSER, S. A.

1917. A comparative study of *Bact. pullorum* (Rettger) and *Bact. sanguinarum* (Moore). *Jl. of Med. Res.*, **35** : 443.

RETTGER, L. F. & STONEBURN, F. H.

1909. Bacillary white diarrhea of young chicks. *Con. Storrs Agric. Exp. Sta. Bull.*, **60**.

1911. Bacillary white diarrhea of young chickens. *Con. Storrs Agric. Exper. Sta. Bull.*, **68**.

ROCHAIX, A. & COUTURE, E.

1933. Au sujet de quelques souches de *Bacterium pullorum*. *C. R. S. Biol.*, **114** : 647.

ROCHAIX, A. & DUFOURT

1910. Remarques sur l'action du neutral-rot. *C. R. S. Biol.*, **69** : 314.

1910. Signification de la réaction du neutral-rot. Essai sur son mécanisme. *C. R. Soc. Biol.*, **68** : 326.

RODRIGUES C.

1931. Ação do Bacillo « E » de Kruse sobre os tartaratos. *Arch. do Inst. Biol.*, **4** : 17.

ROTHBERGER, C. J.

- Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährboden. *C. f. Bakt. O.*, **24** : 513.

SCHAEFFLER, W.

1900. Das Neutralroth als Hilfsmittel zur Diagnose der *Bacterium coli*. *Cent. f. Bakt.*, **28** : 199.

ST. JOHN BROOKS, R. & RHODES, M.

1923. The organismus of the fowl typhoid group. *Jl. of Path. a. Bact.*, **26** : 433.

SMITH, T. & TEN BROECK, C.

1915. A note on the relation between *B. pullorum* (Rettger) and the fowl typhoid bacillus (Moore). *Jl. Med. Res.*, **31** : 547.

SPRAY & DOYLE

1921. *Jl. of Inf. Dis.*, **28** : 47.

SPRAY, R. S.

1932. A coagulable sugar — free basis for fermentation studies. 33th. annual Meeting of the Society of American Bacteriologists, Dec. 1931. *Jl. of Bact.*, **23** : 43.

TAKAIANAGI, G.

1926. Ueber die Beziehung der Hühnertyphusbazillen gegenüber Menschen-typhusbazillen. *C. f. Bakt. O.*, **98** : 61.

TAYLOR, N. J.

1916. A report upon an outbreak of fowltyphoid. *Jl. of the Am. Vet. Med. Ass.*, **49** : 35.

THOMPSON, L. R.

1920. Advantages of solid paraffin for sealing anaerobic fluid cultures. *Jl. of Inf. Dis.*, **28** : 240.

TILLEY

Quoted by Pacheco & Mello.

TITSLER, R. P.

1930. Reduction of nitrates to nitrites by *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum*. *Jl. of Bact.*, **19** : 261.
1931. The effect of temperature upon the production of hydrogen sulphide by *Salmonella pullorum*. *Jl. of Bact.*, **21** : 111.

TRUCHE, G.

1923. De la typhose aviaire. *Ann. de l'Institute Pasteur*, **37** : 478.

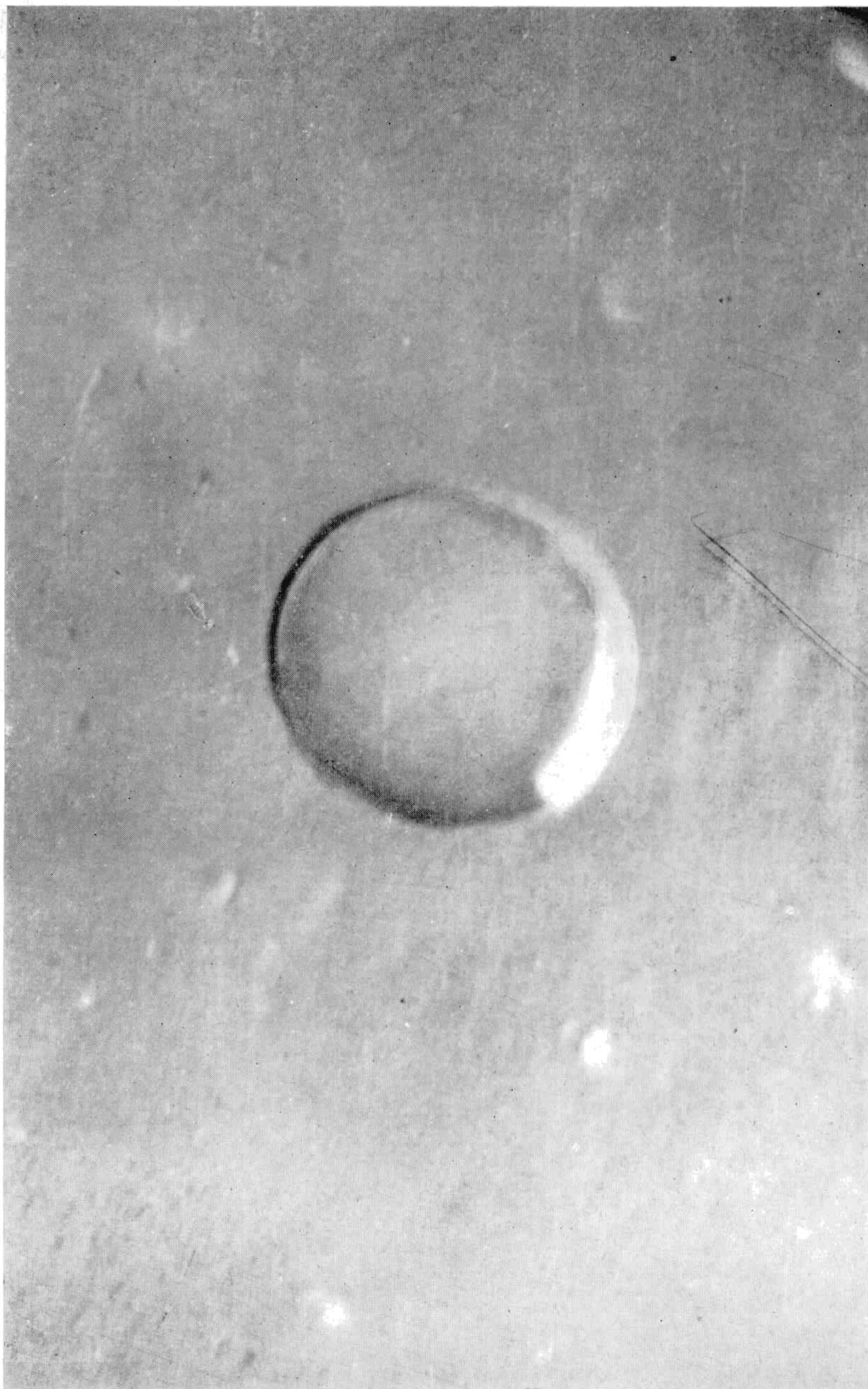
VACCARO, A.

1932. Infection des poules á Bacille pullorum au Chili. *Compt. R. S. Biol.*, **110** : 629.
-

Estampa 1

Colonia typica (P 25, typo *intermedius*).

Typical colony (P 25, *intermedius* type).

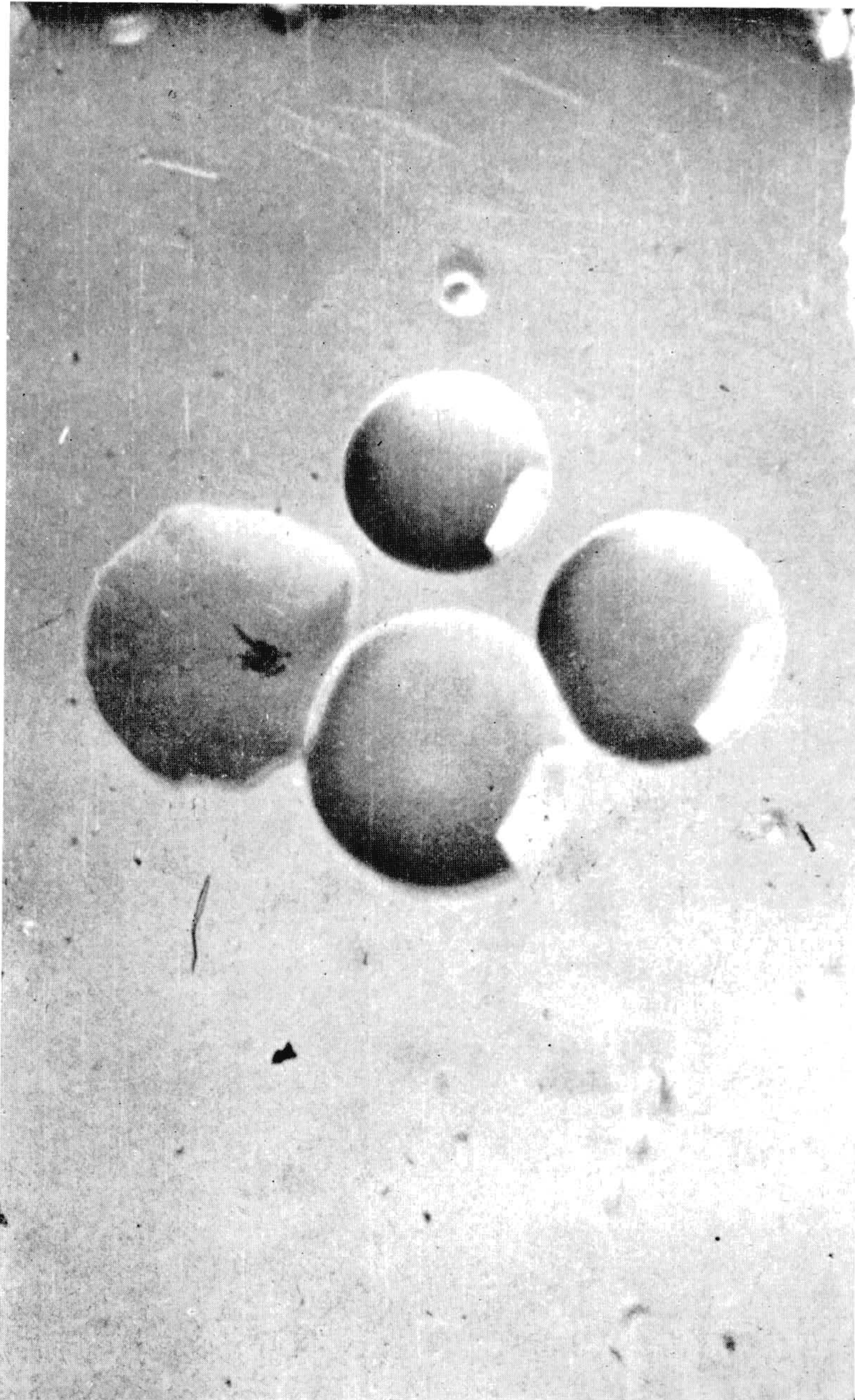


Pacheco & Rodrigues: Grupo *pullorum-gallinarum*.
pullorum-gallinarum group.

Estampa 2

3 colonias typicas ao lado de uma atypica, mucoide, numa phase inicial de transformação (amostra P 25).

3 typical colonies and 1 atypical colony, mucoide, in inicial phasis of transformation (P 25).

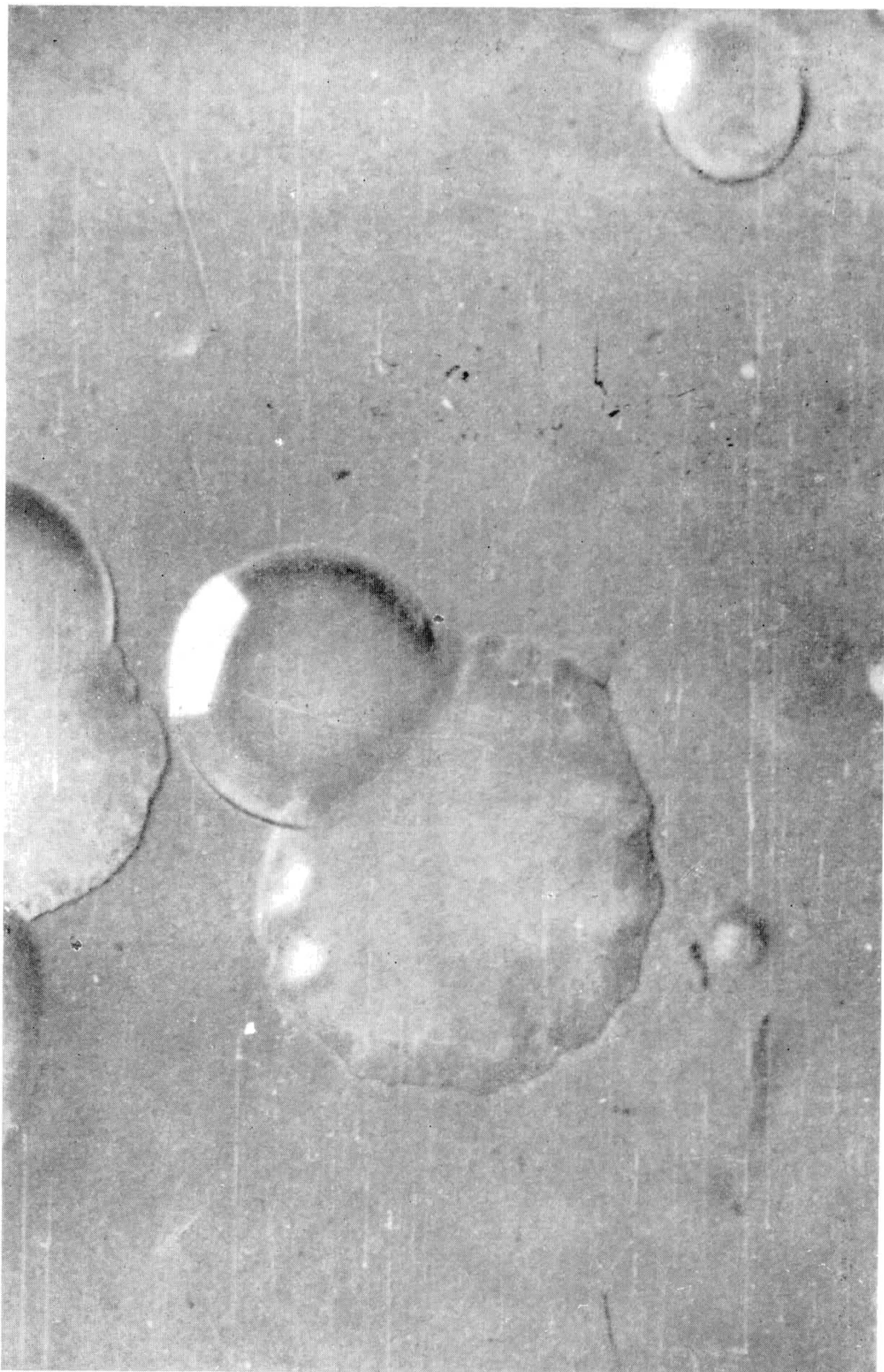


Pacheco & Rodrigues: Grupo *pullorum-gallinarum*.
pullorum-gallinarum group.

Estampa 3

Colonia typica ao lado de uma atypica, mucoide (P 25).

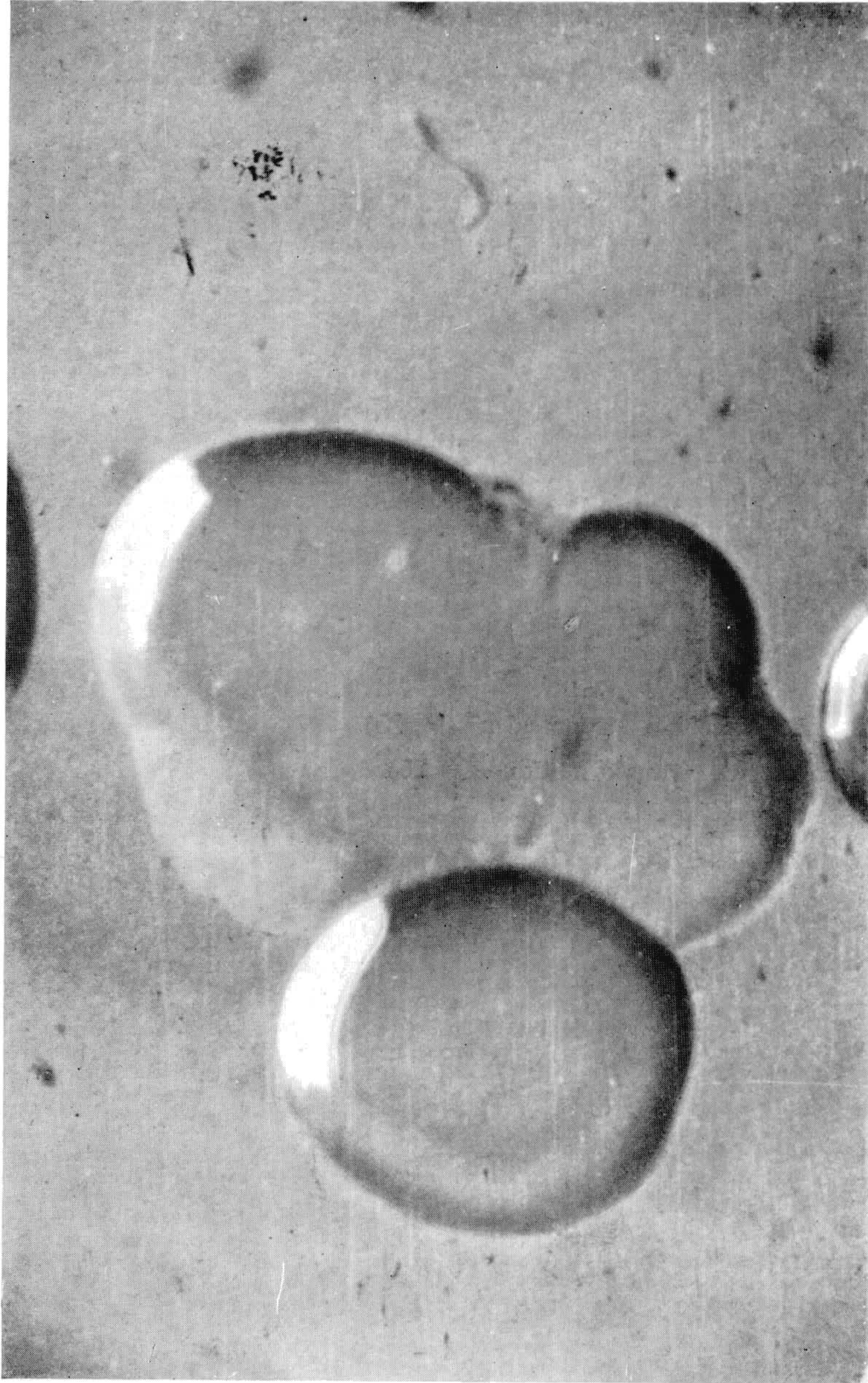
Typical colony and atypical, mucoid colony (P 25).



Pacheco & Rodrigues : Grupo *pullorum-gallinarum*.
pullorum-gallinarum group.

Estampa 4

Colonias em vias de transformação mucoide, estado intermediario (P 25).
Mucoid transformation (intermediate stage, P 25).

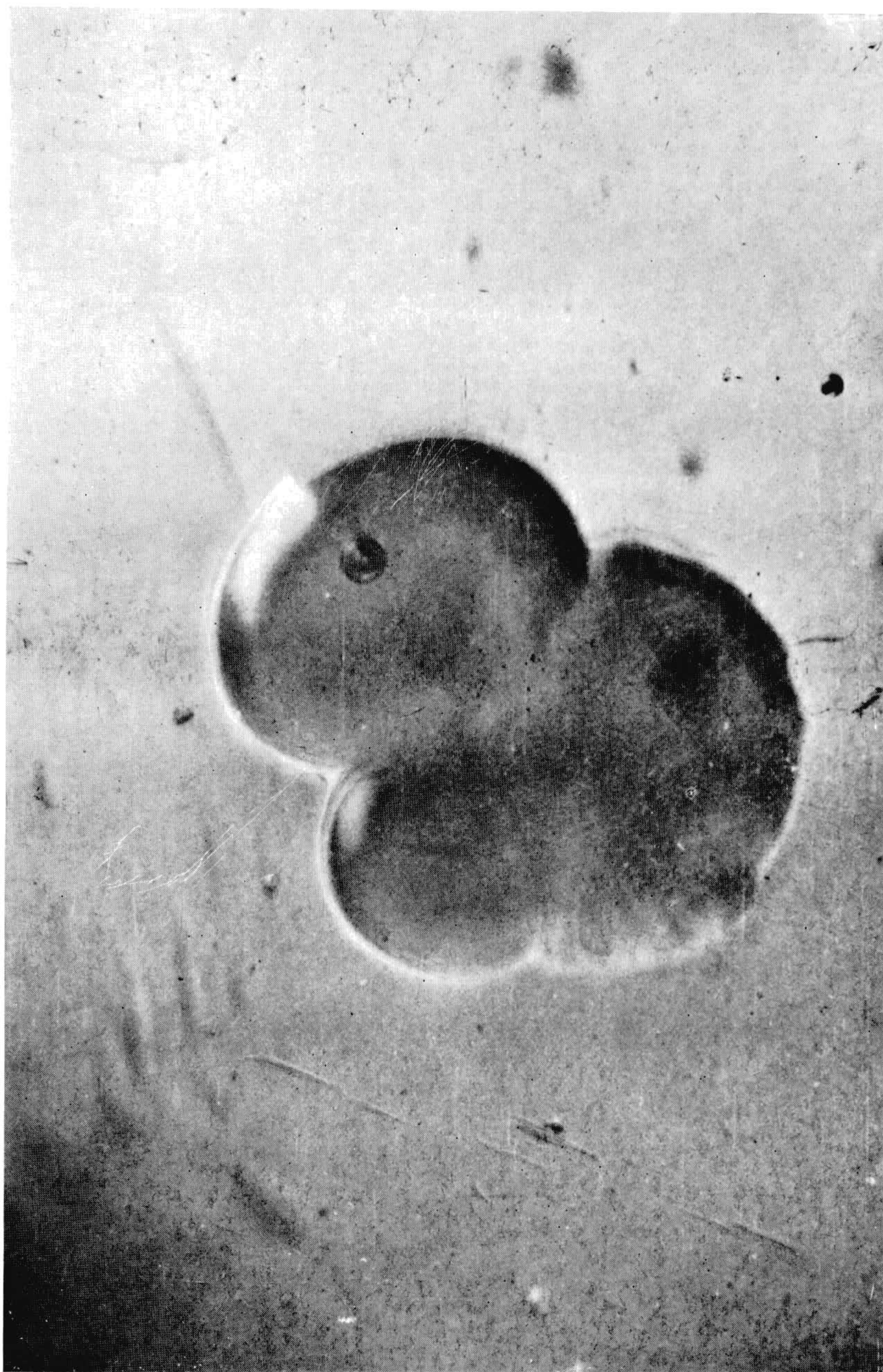


Pacheco & Rodrigues: Grupo *pullorum-gallinarum*.
pullorum-gallinarum group.

Estampa 5

Transformação mucoide progressiva (P 25).

Mucoid progressive transformation (P 25).

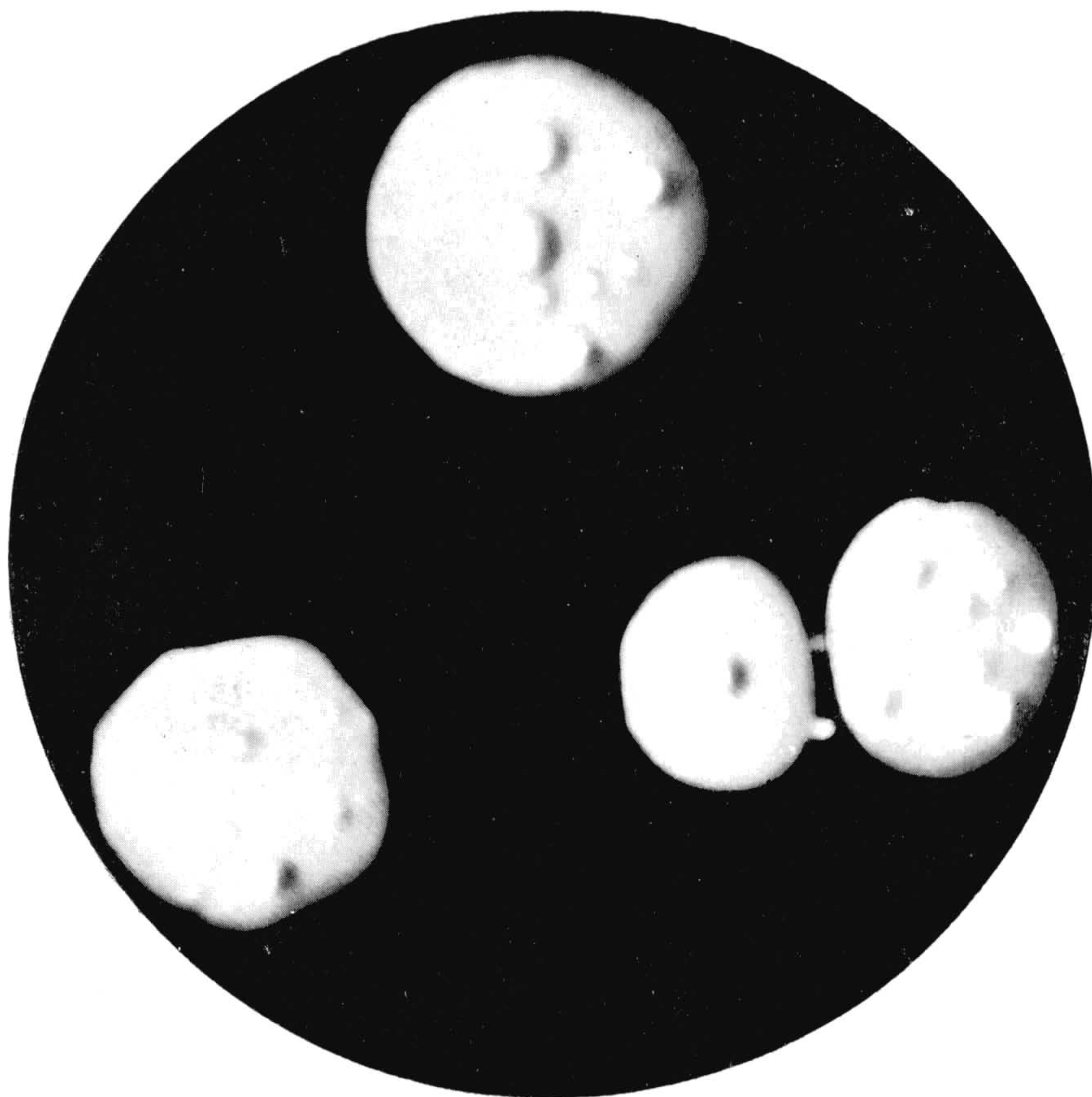


Pacheco & Rodrigues: Grupo *pullorum-gallinarum*.
pullorum-gallinarum group.

Estampa 6

Colonias redondas com colonias filhas (P 14, typo *intermedius*), em placa com meio de Drigalski-sorbita, após 5 dias de cultura.

Round colonies, with daughter colonies (P 14, *intermedius* type), in Drigalski-sorbitol plate, 5 days old.



Pacheco & Rodrigues: Grupo *pullorum-gallinarum*.
pullorum-gallinarum group.