

quarters and school, residents' houses, playground, laundry shops, etc. Interns are lodged in the hospital, which also has housing accommodations on the top of the fifth floor, intended for doctors from other States who have come for special training and also for foreign doctors studying at the hospital. Dr. Frederico Gómez is the Director of the hospital and Mr. José Villagrán García, the architect.

MÉTODO DE LABORATÓRIO NA PROFILAXIA DA PESTE

Pelo Dr. ATHOS HENRIQUES

Do Laboratório de Peste da Delegação Federal de Saúde da 3ª Região, Fortaleza, Ceará, Brasil

Todo Serviço contra a peste deverá ter um laboratório, devidamente aparelhado para elucidação de diagnóstico, preparo de vacinas e sôros, e servir de orientação da seção de profilaxia contra um possível surto epidêmico. A remessa diária do boletim esclarecerá, pela elevação do índice pulicidiano, com predominância da *X. cheopis* ou o isolamento da *P. pestis* dos ratos capturados, qual a zona e distrito que deverão ser bloqueados com intensidade.

Ratos.—Deverão ser trazidos mortos mergulhados em solução de creolina a 5% ou outra solução inseticida, distribuídos em latas por zonas. Os ratos capturados vivos deverão ser mortos por afogamento nas latas, no próprio local, evitando-se desta forma que tragam para o laboratório ou disseminem pelo percurso, pulgas vivas possivelmente pestosas, mesmo quando vêm nas gaiolas dentro de sacos de estopa, como é ainda usado em alguns Serviços. Como meio de verificação dos que foram capturados vivos, poderemos empregar fichas metálicas com cores diferentes, gravadas nelas a zona, distrito, setor e número, e amarradas nas patas dos roedores capturados mortos. Depois de despoluídos, são remetidos à sala de necropsia. Com material cirúrgico aséptico abre-se o ventre e caixa torácica, observa-se o aspeto das vísceras e gânglios, retira-se um fragmento de fígado, baço e gânglio de 30 ratos no máximo, esmagando-os num gral estéril, emulsiona-se com alguns centímetros cúbicos de caldo simples ou água fisiológica e passa-se a mão do gral numa escarificação feita num rato ou cobáia. Si formos usar rato para inoculação deveremos antecipadamente submetê-lo por 5 minutos a uma atmosfera impregnada de *flit*, afim de matarmos todos os pulicídeos.

Gaiolas.—As gaiolas em que estão colocados os animais inoculados são constituídas por um quadrado com paredes de ferro zincado de 25x25 ou mesmo uma lata de gasolina ou querosene tendo um estrado no fundo que o isola das fezes e urinal. Numa das paredes laterais terá uma janela de vidro, afim de observarmos com facilidade o animal, ajustando-se perfeitamente o vidro à parede metálica, e obturando-se todo o orifício com massa. A tampa é coberta com tela milimétrica lubrificada com parafina líquida afim de impossibilitar a passagem de pequenos mosquitos ou pulgas. Pela mesma razão as paredes laterais e superiores da gaiola são lubrificadas com vaselina sólida. Os animais permanecem na gaiola até sua morte, ou 17º dia da inoculação. A alimentação é devidamente calculada e as folhas do capim são enfeixadas para que não fique grande depósito.

Bacteriologia.—Após a morte do animal inoculado fita-se o interior da gaiola através da tampa telada transferindo-o para a bandeja onde será autopsiado.

A gaiola será lavada ou imersa em anosol a 10% ou outro qualquer bactericida. Com material cirúrgico aséptico abre-se o ventre e a caixa torácica observando-se o aspeto das vísceras e gânglios. Fazem-se esfregaços em lâmina de gânglio, fígado, baço e exsudatos para coloração de Gram. Após queimar-se uma superfície do coração com um tubo de ensaio ou uma lâmina aquecida, retira-se um pouco do sangue das cavidades cardíacas, com pipeta Pasteur previamente flambada e semea-se em caldo simples e agar plasma ou simples. Nesses mesmos meios são semeados material de fígado e baço retirados com alça do interior desses órgãos após corte com tesoura. Depois de 24 horas, a 30° C preferivelmente, havendo crescimento doutros germens, isola-se, semeando em agar plasma, colhendo-se as colônias suspeitas após 24 horas em estufa, repicando-se para caldo simples, agar plasma, caldo de fígado, água peptonada dextrosada, manitada, lactosada, ramnosada e sucrosada com tubos para evidencição de gás e indicador de Andrade. Nos casos humanos com todo cuidado de asepsia, deixando-se a tintura de iodo agir por 2 minutos, punciona-se o bubão, diluindo-se a serosidade purulenta dentro da seringa, com caldo simples ou água fisiológica, semeando-se em caldo simples inoculando-se em cobáia peritonealmente, e por fim faz-se esfregaço em lâmina para coloração de Gram. Com o mesmo cuidado de asepsia usado na punção do bubão procede-se a retirada de 10 a 20 cc de sangue da veia basilica, semeando-se em 150 cc de caldo simples. Após 24 horas de estufa a 30° C, si estiver em cultura pura, repica-se para os mesmos meios usados no caso dos ratos, relatados acima. A verificação de bastonetes Gram-negativos, vacuolados, imóveis, sem produzir indol, dando a reação nitrosa pelo ácido sulfanílico e alfanaftilamina em caldo de fígado ou caldo simples, fermentando glicose e manita sem produção de gás e não fermentando lactose ramnose e sucrose em 24 a 48 horas a 30° C, evidencia a presença de *P. pestis*.

Diferenciação.—A reação nitrosa citada por G. Petragani, não é exclusiva da *P. pestis* e *V. colerico* como diz esse autor. Apesar de todas as fontes de *P. pestis* experimentadas darem a reação nitrosa, não se verificando, entretanto com diversas fontes citadas por G. Girard, no laboratório do Instituto Pasteur de Tananarivo, outras bactérias positivavam também a reação nitrosa em caldo simples, caldo de fígado e água peptonada. Entre as bactérias que dão a reação nitrosa nos 3 meios estão 4 fontes de *S. sonnei*, 1 de *S. flexneri-hiss* e 1 de *Alcaligenes fecalis*. Positivando a reação nitrosa somente em água peptonada após 24 a 48 horas em estufa a 37° C encontram-se três fontes de *S. shigae*. A fermentação da lactose pela *P. pestis* tem sido citada por alguns autores, podendo verificar-se após 30 dias em estufa a 37° C, isso mesmo, somente com fontes repicadas durante muito tempo no referido meio. As *P. pestis* recentemente isoladas dos roedores ou homens durante um surto epidêmico, não fermentam a lactose. A *P. pseudotuberculosis* fermenta a ramnose e a *P. avicida* a sucrose em 48 horas de estufa a 37° C, enquanto que, algumas amostras de *P. pestis*, embora raras, não fermentam a ramnose e sucrose nesse mesmo tempo, podendo-se verificar, entretanto, entre 15 a 30 dias. As *P. pseudotuberculosis* e *avicida* até o presente experimentadas, não dão a reação nitrosa.

Pulcões.—Os ratos chegados ao laboratório são despulizados por jato de água, colhendo-se com alça as pulgas presas na gaze após filtração do líquido da lata e tanque. Como meio de clarificação poderemos usar o adotado na Índia Britânica que consiste em desidratar as pulgas em álcool aquecido levemente durante 5 minutos; deixa-se esfriar e substitue-se o álcool pelo óleo de anilina aquecendo também levemente durante 5 minutos. Incluem-se em bálsamo. Póde-se também usar o fenol ou ácido láctico com a técnica de método da Índia Britânica. Desidrata-se por 5 minutos em álcool absoluto ao calor brando, depois deixa-se esfriar e substitue-se o álcool pelo fenol ou ácido láctico aquecendo-

se também por 5 minutos. Inclue-se em balsamo do Canadá e classifica-se. Estes métodos são indicados para classificação imediata.

Ratoeiras.—Procurando saber qual o melhor tipo de ratoeiras para captura de ratos vivos, verifiquei ser as que continham uma entrada em forma de funil, colocada na parte superior da gaiola em direção ao interior, ou numa das suas extremidades. As gaiolas com alçapão, têm a desvantagem de tornar necessário o abaixamento duma portinhola sob o péso do animal. Sendo o rato um animal muito astuto e desconfiado recuará ante o abaixamento da tampa, e somente a fome ou a tentação da isca o decidirá a entrar. As gaiolas com tampa armada, têm a desvantagem de só capturar 1 a 2 ratos e afugentar outros roedores com o barulho produzido pelo disparo da tampa.

Meios de cultura.—*Agua peptonada simples*: Dissolve-se à quente 1% de peptona seca em água de bica filtrada, junta-se 0.5% de cloreto de sódio. Ajustase o pH a 7.8 com hidróxido de sódio, precipita-se os fosfatos, autoclavando-se a 118° C durante 10 minutos, filtra-se em papel, distribue-se 10 cc em cada tubo de ensaio e esteriliza-se a 112° C durante 15 minutos.

Agua peptonada açucarada.—Adiciona-se à água peptonada simples 1 a 0.5% de dextrose, manita lactose etc., e junta-se o indicador de Andrade na proporção de 2 a 3%. Os tubinhos para coleta do gás produzido pelas bactérias será emborcado dentro do tubo de ensaio que se encherá sob a pressão de 112° C utilizada na esterilização.

Caldo simples: Adiciona-se à água peptonada simples 1.5% de extracto de carne ou prepara-se a infusão fazendo-se ferver 500 gm de carne moída em 1000 cc de água de bica durante 2 horas. Filtra-se, eleva-se o volume a o pH a 7.8, precipitam-se os fosfatos, filtra-se em papel, distribue-se e esteriliza-se como no caso da água peptonada simples.

Caldo de fígado.—Procede-se como no caldo simples substituindo-se a carne de vaca por fígado.

Agar simples.—Adiciona-se ao caldo simples 2% de agar-agar. Distribue-se em tubos e placas.

Agar plasma.—Adiciona-se plasma na proporção de 1.3 ao agar simples fundido a 56° C. O agar-agar empregado deve entrar na proporção de 4 a 5%.

Reagentes.—Para a pesquisa do indol usaremos o reagente de Bohme. Adiciona-se ao caldo simples após 24 ou 28 horas de estufa a 37° C, 1 cc de éter e agita-se vigorosamente, rolando o tubo entre as mãos. Adiciona-se ao tubo de cultura 1 cc do reagente de Bohme, fazendo-o escorrer pelas paredes. Si após um minuto uma cor rósea ou violácea não aparecer junta-se 1 cc duma solução aquosa saturada de persulfato de potássio. Conforme Happold e Hoyle (1934) pode-se substituir o éter pelo xilol na extração do indol. Para a reação nitrosa usamos o reagente de Griess Ilosva ou o mesmo preparado pela técnica empregada no laboratório do pórtio de Napoles que é a seguinte: Solução A: ácido sulfanílico numa solução a 4% de ácido acético; Solução B: alfanaftilamina, 0.20 gm, levando-se à ebulição com 40 cc de água destilada, que se eleva para 300 cc com uma solução de 4% de ácido acético. A reação será positiva pelo aparecimento dentro de poucos minutos duma coloração rósea ou purpúrea.

Transporte de material suspeito.—Para transporte de material suspeito de peste, poderemos usar a parafina sólida com ponto de fusão de 42 a 44° C. Liquefaz-se a parafina e logo que começa a se solidificar na superfície da lata imerge-se o fragmento de material suspeito. Outro método de grande eficiência é o de transportar material suspeito dentro dum tubo de ensaio arrolhado e parafinado, colocado no interior duma garrafa térmica cheia de gelo quebrado em pequenos pedaços. Além de conservar o material por vários dias numa temperatura de 0° C, impede a proliferação de outros germens, continuando, entretanto, o crescimento da *P. pestis*, embora lentamente, conforme Tumansky (1935). Para

conservação de pulgas usaremos o meio de Broquet (carbonato de cálcio 2 gm; glicerina 20 cc, e água destilada 80 cc) das quais poderemos ainda isolar a *P. pestis* após 6 dias (Devignat, 1938).

Sumário.—Relata o autor métodos para despulização, autópsia e inoculação de animais suspeitos de peste e o transporte à grande distância de fragmentos de órgãos para isolamento da *P. pestis*. Descreve um tipo de gaiola para animais inoculados; ratoeiras para capturas de roedores vivos; reagentes e meios de cultura empregados para diagnóstico e métodos para clarificação de sifonápteros. Faz o A. a diferenciação das *P. pestis*, *pseudotuberculosis* e *aviciida* do seguinte modo: A *P. pseudotuberculosis* é móvel, fermenta a ramnose em 48 horas a 37° C e não é patogênica para ratos brancos; a *P. aviciida* fermenta a sucrose em 48 horas a 37° C e produz indol; a *P. pestis* não fermenta a ramnose e sucrose em 48 horas, não é móvel, é patogênica para ratos brancos, não produz indol e dá a reação nitrosa. Até o presente, todas as fontes de *P. pseudotuberculosis* e *aviciida*, não deram a reação nitrosa em caldo de fígado ou caldo simples, pelo ácido sulfanílico e alfa-naftilamina.

Bibliografia

- Petragnani, G.: "Le diagnostic de la peste chez les rats," *Bull. Off. Int. Hyg. Pub.*, 1937, p. 2522.
- Devignat, R.: "L'utilisation du milieu de Broquet pour la recherche de la peste des puces," *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1938, p. 215
- Henriques, A.: "Emprego da reação nitrosa na identificação da *P. pestis* e *B. disentericos*," *O Hosp.*, 1940, p. 195; "Considerações sobre clarificação de sifonápteros," *Ibid.*, p. 125; "Ainda a propósito da reação nitrosa na identificação da *P. pestis* e *B. disentericos*," *Imp. Méd.*, 1940, p. 925; "Ratoeiras e raticidas," *Ibid.*, 1940, p. 1039.
- Russo, E.: "Contribuição ao estudo fermentativo das bacterias do genero *Pasteurella*," *O Hosp.*, 1939, p. 57; Nota adicional à "Contribuição ao estudo fermentativo das bacterias do genero *Pasteurella*," *Ibid.*, 1940, p. 47.
- Topley e Wilson: "Principles of Bacteriology and Immunity," Wm. Wood & Co., Baltimore, 1937; "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," Williams & Wilkins, Baltimore, 1939.
- Jorge, Ricardo: "Rongeurs et puces dans la conservation et la transmission de la peste," *Enquête de l'Office International d'Hygiène Publique, 1924-1927*, Masson et Cie., Paris, 1928.
- Girard, G.: "La reaction des nitrites pour la differentiation du bacille de la peste et de la pseudotuberculose," *Cont. Rend. Soc. Biol.*, 1940, p. 133.

PLAGUE LABORATORY PROCEDURE

Summary.—The author describes the work of a plague laboratory, which should be equipped for diagnosis, preparation of vaccines and sera, and to serve as the orientation center for prevention of a possible outbreak. Points discussed include precautions against release or transport of live infected fleas when sending in rats for examination (use of insecticides and metal shipping cans); identification of place where rats were found (different colored metal tags are suggested); autopsy and inoculation procedures; bacteriological examination including differentiation (*P. pseudotuberculosis* is motile, ferments rhamnose in 48 hours at 37° C and is not pathogenic for white rats; *P. aviciida* ferments sucrose in 48 hours at 37° C and produces indole; *P. pestis* does not ferment rhamnose and sucrose in 48 hours, is not motile, is pathogenic for white rats, does not produce indole, and gives a nitrose reaction); examination and classification of fleas; best type of traps (those with funnel type of entrance on top of cage); culture media; reagents; and transportation of suspected material (paraffin).