

MEMORIAS  
DO  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

---

---

Tomo XXVIII

Junho -- 1934

Fasciculo 2

---

---

Contribuição ao conhecimento dos actinobacilos (\*)

por

**GENESIO PACHECO**

(Com as estampas XXXII — XXXV)

---

Ha um certo numero de especies bacterianas sobre as quais pouco se conhece. Estão neste caso os actinobacilos descritos por Lignières e Spitz na Argentina em 1904; são microbios patogenicos para os animais, nos quais causam doença caracterizada por endurecimento dos tecidos da lingua e dos musculos do pescoço, sob fórmula epizootica, mais ou menos frequente.

Estes germens foram vistos mais tarde parasitando tambem o homem (Ravaut e Pinoy), sob a fórmula de inflamações cronicas da mastoide, do ouvido e das meningeas e foram erigidos em genero por Brumpt, em 1910, sob o nome de *Actinobacillus*.

No correr das investigações que realisamos sobre doenças de psittacideos tivemos ocasião de encontrar um papagaio infectado por uma especie dessas bacterias, cujos caracteres diferem da especie descrita por Lignières e Spitz.

Tratava-se de um papagaio (*Amazona aestiva*), trazido pelo Dr. Floriano de Almeida ao nosso serviço. SINTOMAS — O animal adoecera subitamente, dois dias antes, apresentando-se triste, inapetente e com intensa enterite disenteriforme. Quando o examinamos repousava num canto da gaiola, com olhos cerrados, azas pendentes, plumas não arre-

---

(\*) Recebido para publicação a 15 de Setembro de 1933.

piadas; não tremia e movia-se bem quando provocado a fazê-lo. No fundo da gaiola esparramavam-se fezes líquidas, brancacentas ou misturadas com sangue, consequentes á forte diarréa.

NECROPSIA — O animal morreu durante a noite do dia em que o recebemos e á necropsia apresentava: figado de consistencia firme, com manchas amareladas, parecendo depositos fibrinosos, baço de consistencia mole e intestino cheio de material mucoso, de côr verde. Cloaca contendo abundante material de coloração pardacenta. Ao exame histológico foram encontradas alterações importantes apenas no figado, consistindo em focos de proliferação mesenquimatosa, em redor dos vasos ou fóra deles, constituída por elementos celulares redondos, semelhantes a linfocitos, e por elementos dotados de protoplasma fortemente eosinófilo. Ocasionalmente, entre os elementos atrás mencionados, viam-se algumas células com nucleo rodeado de uma orla de protoplasma basófilo. Não havia reação celular em torno das necroses, nem inclusões celulares. Exames bacterioscòpicos do figado, seja no esfregaço do órgão, seja nos córtes, não revelaram a existencia de elementos bacterianos.

Demos a esta ave a denominação de Pg Fl.

Os exames microscòpicos das fézes, *ex-vivo* e dos órgãos, *post-mortem*, não revelaram a presença de parasitos ou bacterias aos quais se pudesse atribuir a doença. Figado e fézes foram semeados em placas de meios de cultura solidos e em tubos contendo meios liquidos. Em todos cresceram colonias de uma bacteria, diferindo de outras que ordinariamente vegetavam naqueles meios quando semados com material semelhante, oriundo de papageios que então examinavamos e que foram assimilados ás salmonelas, num rapido exame microscòpico.

Consistiam as diferenças na fórmula e dimensões da bacteria e no aspecto das colonias de cultura, de tal maneira que nos pareceu, no momento, tratar-se de uma pasteurela, isto é, eram colonias, pequenas, transparentes e isoladas. Reisoladas, por passagens sucessivas em placas de agar, estudamos 3 amostras nas suas propriedades bacteriológicas, 2 de figado e 1 de fézes.

CARACTERES MICROSCÓPICOS — Aparecem como bastonetes pleomórficos, variando de tamanho de menos de um micron até muitas dezenas de micra, ora com aspecto de cocobacilos atarracados, ora em fórmulas alongadas, ou mesmo filamentosas. Os elementos microbianos dispõem-se isoladamente, quando pequenos, ou em aglomerados ou novelos, quando longos. As fórmulas filamentosas muitas vezes se desfazem numa cadeia de bastonetes pequenos, não sendo raro surprehender-se uma transformação dessas ainda a meio caminho. Este aspecto é identico ao de uma

hifa segmentando-se em artrospóros. Outras características morfológicas apresentam as fôrmas longas: entumescimentos terminais ou no corpo bacilar, semelhantes a dilatações conhecidas da *Pasteurella pestis* e de outras bacterias, como fôrmas de degeneração. Observam-se entumescimentos tambem nas fôrmas curtas, que assumem aspetos bizarros, como se fossem bolas de substancia plastica, comprimidas pelos dedos. Os desenhos e as fotografias dão idéa da sua variabilidade de fôrma. Além disso, essas entumescencias apresentam uma particularidade: é uma menor afinidade corante, aparecendo nas dilatações mais volumosas espaços quasi incolores, separados ou não por septos, corados mais intensamente. Este aspecto microscopico é muito semelhante ao obtido por Red & Orr com o *H. influenzae*, fazendo variar a concentração do pH do meio de cultura.

O microorganismo não toma o Gram, nem é acroresistente (acido-resistente). Corado pelo metodo de Neisser não foram vistas granulações no corpo bacilar.

Examinado em culturas recentes, em meios liquidos, mostrou-se imovel. Espóros não foram encontrados em culturas novas ou velhas. Nestas, quando conservadas em agar, as fôrmas filamentosas praticamente desapareciam e só se viam elementos cocobacilares identicos aos das fôrmas filamentosas, quando estas se desfasiam em cadeias. A sobrevivencia das culturas é pequena, pois, mesmo conservadas em tubos fechados á lampada, não chegavam a durar 60 dias.

C. CULTURAIS — Visto nos seus caracteres culturais, o microorganismo turva o caldo simples, uniformemente, com produçção de pequeno deposito pulverulento, colar na parte superior e fina pelicula. Acidifica o leite muito fracamente, nas primeiras 24 horas, mas logo a seguir (3.º á 4.º dias) o coagula; mais tarde o alcalinisa e depois peptonisa. Não altera o vermelho neutro. Não produz indol nem acetoina. Não reduz os nitratos a nitritos. Não produz pigmentos, fluorescencia ou odor nas culturas. Possui fermentos proteoliticos, pois, não só peptoniza o leite coagulado como tambem funde a gelatina dentro de poucos dias. Não cresce sobre batata, mas turva a agua do meio. Exerce fraca açção sobre os assucares: fermenta, sem produçção de gás, quasi unicamente os monosaccharideos, exceto a levulose. isto é, age sobre glicose, galactose, mannose, arabinose e xilose; a rhamnose é fermentada tardiamente, do 4.º ou 10.º dia em deante. Dos dissaccharideos só fermenta a lactose. Não fermenta saccharose, maltose, rafinose, esculina, dextrina, inulina, amido, adonita, manita, glicerina, sorbita, dulcita, inosita e salicina.

O crescimento em meio Sabouraud é muito pobre e demorado.

Vegeta bem a 37.º e em presença de oxygenio. Cresce em anaerobiose, pobre e lentamente.

CRESCIMENTO EM VARIAS CONCENTRAÇÕES DE pH — Numa serie de tubos de caldo com pH variando de 4.2 a 8.0, foi semeada uma gota de cultura de 24 horas em caldo. Houve crescimento nos tubos em que o pH era de 6.4 para cima. Quarenta e oito horas após appareceu fraca vegetação no tubo em que o pH era 5.2; esta vegetação progrediu até crescimento normal, no 3.º dia. Nos tubos de mais baixas concentrações de pH não houve crescimento. Examinadas essas culturas ao microscopio notava-se que, nos primeiros tubos, de concentração mais baixa, as fórmulas mais frequentes eram de bastonetes pequenos, curtos, com raras cadeias e que, naqueles de pH 7.0 para cima, os bastonetes se alongavam e as fórmulas filamentosas e as cadeias se tornavam muito mais frequentes.

CRESCIMENTO EM VARIAS CONCENTRAÇÕES SALINAS — Uma serie de tubos de agar simples fundido, adicionado de quantidades crescentes de solução de NaCl a 20 %, variando de 0,01 até 3 cc., foi semeada com uma gota de cultura, depositada na superficie do agar de cada tubo.

O crescimento deu-se bem em 24 horas, exceto nos dois ultimos tubos, que acabaram vegetando mais tarde. As culturas foram examinadas ao Gram, cada dois dias. Inicialmente não appareceram alterações importantes, mas ao cabo duma semana notou-se maior frequencia de fórmulas filamentosas e bizarras nos tubos de concentração salina mais elevada.

DISSOCIAÇÃO MICROBIANA — Repassadas em placas as culturas, quer as da série em que fizemos variar o pH, quer as de varia concentração salina, encontravam-se nas placas dois tipos de colonias, não observadas anteriormente, isto é, os tipos S e R, bem caracterisadas, além de tipos mixtos (V. fotografias). Repassadas em placas, verificamos que o tipo S se mantinha puro desde o inicio, e que o tipo R, pelo contrario, dava sempre os dois tipos S e R. Sómente depois de muitas passagens foi possivel obter este tipo em estado puro. Ambos os tipos S e R foram ainda purificados por meio de passagens em placas e por fim estudados nas suas propriedades bacteriologicas:

MORFOLOGIA — (Exame diréto com o aparelho de Zeissler). A forma da colonia S era no inicio regularmente redonda, de superficie lisa, convexa e brilhante, á luz diréta; seu aspeto por transparencia era translucido. No 2.º ou 3.º dia os bordos se adelgaçavam e a parte primitiva mantinha-se saliente com o centro ligeiramente granuloso, dando a fórmula de uma bacia emborcada.

As colônias R tinham os caracteres normais deste tipo de colônia: irregularmente redondas, superfície rugosa, rasas, sem brilho, à luz direta, opacas, quando vistas por transparência; bordos ondulados ou largamente denteados, cheios de dobras ou elevações.

Com o tempo as colônias dos dois tipos tomavam coloração amarelada.

COLÔNIAS FILHAS — Sobre a superfície dos dois tipos, particularmente sobre as colônias rugosas, apareciam frequentemente botões de colônias filhas, de vários tamanhos e em grande número, espalhadas irregularmente sobre a superfície das colônias.

DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS — Microscopicamente diferiam fundamentalmente os elementos componentes destes dois tipos de colônias: o tipo S era constituído de bastonetes, na maioria mais longos que largos, encurvados, com extremidades arredondadas, quasi sempre dispostos isolados, e raras formas bacterianas filamentosas e cadeias, formadas de poucos microorganismos. O tipo R possuía bastonetes curtos, quasi cocos, também isolados, numerosas cadeias de muitos elementos e formas filamentosas, monstruosas, de aspeto bizarro, com dilatações no corpo ou nas extremidades. Foram notadas, nas formas monstruosas aqui observadas, os mesmos aspectos morfológicos e tintoriais anteriormente observados na cultura original, antes de ter sido por nós dissociada a bactéria.

PROPRIEDADES CULTURAIS — Não diferiam as propriedades culturais de qualquer dos tipos S e R, da amostra original; elas se mantinham inalteradas na época das provas com os dois tipos S e R. Em relação à amostra original notou-se apenas ligeira precocidade da amostra R em fermentar a galactose. Ambas fermentavam a lactose no fim de uma semana, um pouco mais cedo que a original, que o fez em 12 dias. As colônias em placas de meio de Holt-Harris & Teague, talvez por esta razão, apresentavam, após 48 horas, centro escuro, como as colônias de *Escherichia* (coli) de fermentação lenta.

PROPRIEDADES SOROLÓGICAS — Postas em contacto com soro aglutinante preparado com a amostra original, S e R aglutinaram bem, até o título do soro (1:5.000), ao cabo de 6 horas; examinada a série aglutinante no dia seguinte, verificou-se aglutinação espontânea da série R, inclusive do tubo testemunha.

Saturado o soro com o tipo R não restaram aglutininas para S, mas este deixava na soro uma pequena fração para R, que ainda aglutinava a 1/100.

A amostra original não apresentou relações sôrologicas, posta em contáto com sôro aglutinante para as *Salmonella enteritidis*, *pullorum*, *gallinarum*, *psittacosis*, *nocardi*, *morgani*, *paratyphi*, *schottmülleri*, *typhimurium*, *abortus-equi*, *aertrycke*, *suispestifer* e *anatum*.

Amostras de bacilos disentericos, *Shigellas dysenteriae flexneri*, *sonnei*, *schmitzii* e *hiss-russeli* e das *Salmonellas pullorum* e *gallinarum*, não foram aglutinadas pelo sôro aglutinante Pg. Fl.

PATOGENIA — Ao ensaiarmos o poder patogenico do germen o fizemos com os dois tipos dissociados acima. Estes ensaios foram feitos sobre:

*Cobaias.* — Um lóte de 8 animais foi inoculado: 4 com dóse de 0,5 cc., pela boca e 4 com 1 cc. pela via intra-peritonial, com culturas recentes, de 24 horas, em caldo. Nenhuma adoeceu e uma delas, sacrificada um mês depois, não apresentava alterações necroscopicas, nem de seus órgãos se obteve cultura de bacterias nos meios usuais.

*Camondongos.* — De 4 animais inoculados com cada um dos tipos S e R, i. p. e p. o., na mesma data que as cobaias, morreu somente um, que fôra inoculado com 0,1 cc. i. p., com cultura tipo R, sem alterações necroscopicas aparentes.

*Ratos.* — Inoculados dois, cada um com 0,5 cc. de cultura, i. p., não adoeceram.

*Aves.* — Dois pombos e duas galinhas inoculadas no musculo peitoral não adoeceram. Quatro pintos, de duas semanas de idade, também inoculados pela mesma via, não adoeceram igualmente.

Restava realisar ensaios sobre bois e cavalos, animais mais sensiveis ás especies isoladas por Lignières e Spitz na Republica Argentina e sobre o papagaio, animal de que fôra isolada a nossa amostra.

Inoculamos 1 alça de cultura recente em agar, de baixo da péle de um boi e de um cavalo. Não observamos alteração no local inoculado ou qualquer repercussão em outros pontos do organismo daqueles animais.

Um papagaio foi inoculado, repetidas vezes, com amostras isoladas do figado e fezes: 0,2 cc. de uma alça de cultura emulsionada em 10 cc. de agua fisiologica no peritonio e 1 cc. da mesma emulsão pela boca. Manifestou doença, durante 2 ou 3 dias seguintes, mostrando-se triste, inapetente, mas restabeleceu-se logo depois; sacrificado, 2 semanas após, em estado de saúde aparente, verificou-se ao exame necroscopico a existencia de lesões congestivas intestinais e ao exame hístologico fôcos de necrose no figado e no pulmão, além de proliferação de celulas reticulares do baço.

Outro papagaio foi inoculado por ingestão com a cultura R, apresentando, como o precedente, doença passageira, seguida de pronto restabelecimento. Sacrificado, 3 semanas depois, apresentou, como o primeiro, necroses em focos no fígado.

TRANSMISSÃO DIRETA DA DOENÇA. — Fêzes do animal doente *ex-vivo*, foram emulsionadas em água fisiológica e dadas a beber a outro papagaio. Este, não adoeceu e um mês depois foi utilizado numa experiência com o *virus* que isolamos de outro papagaio. A ave inoculada teve a doença de *virus* típica, mas ao exame histológico revelou, porém, no fígado, além de lesões da doença de *virus*, lesões semelhantes às encontradas em Pg. Fl., isto é, focos de necrose sem reação celular em torno, encontrados também no baço e nos pulmões. As culturas destes órgãos ficaram estereis para bacterias.

Emulsão de órgãos (fígado e baço) do animal doente, *post-mortem*, foi inoculada numa maitaca (*Psittacula passerina*), por via peritonial e oral, sem nenhuma consequencia para a saúde do animal.

## DISCUSSÃO

O estudo comparativo das propriedades da bacteria, e mais do do que elas, sua morfologia, levou-nos a inclui-la na ordem *Actinomyce-tales* da classificação proposta pela Sociedade de Bacteriologistas Americanos.

Esta ordem compreende bacterias com fórmulas alongadas, apresentando entumescimentos em massas ou dilatações monstruosas, não esporuladas, não tomando o Gram e não dotadas de movimento. A ordem compreende 2 familias: *Actinomycetaceae* e *Mycobacteriaceae*. Esta envolve as bacterias acroresistentes, propriedade de que não goza a nossa bacteria, que fica compreendida por isso na primeira destas familias bacterianas.

As *Actinomycetaceae* formam 2 generos, *Actinobacillus*, que apresentam cadeias e *Actinomyces*, que não possuem esta propriedade.

Enquadra-se, pois, a nossa bacteria naquele genero, representado por uma especie unica, o *Actinobacillus lignièresi*, proposto por Brumpt e aceito pela referida Sociedade.

Algumas diferenças apresenta a especie por nós encontrada, que chamaremos Fl, por ora, vistas no seguinte quadro cotejador:

Quadro comparativo dos caracteres diferenciais do actinobacilo por nós isolado e do de Lignières & Spitz.

	<i>A. lignièresi</i>	Fl
Forma e dimensões	Bastonetes muito curtos, $1 \mu \times 0,4 \mu$ ; formas (de involução), atingindo a $25 \mu$ ; cadeias.	Bastonetes muito curtos, $1 \mu$ ; formas filamentosas bizarras, atingindo a $50 \mu$ ; cadeias.
Mobilidade e Gram	Imovel, Gram negativo.	Imovel, Gram negativo.
Caldo	Turvação, deposito, pelicula.	Turvação, deposito, colar e fina pelicula.
Lactose	Fermenta fraco	Fermenta fraco
Glicose	Fermenta	Fermenta
Leite	Não coagula	Acidificação fraca (24 hs.), coagulação (2 <sup>o</sup> a 3 <sup>o</sup> dias), peptonização lenta do coagulo.
Gelatina	Não liquefás	Liquefação (iniciada no 3 <sup>o</sup> dia), fusão de forma cilíndrica.
Agar	Crescimento mau no inicio, como induto seco, aderente, difficilmente destacavel; mais tarde, com as repicagens, torna-se viscoso.	Crescimento fraco de inicio, como induto umido, esbranquiçado, brilhante, não aderente ao meio.
Batata	Crescimento pobre	Não cresce
Indol	Prodús	Não prodús
Redução de nitratos a nitritos	Não redús <sup>1</sup>	Redús
Exigencia de O	Microaerofilo <sup>2</sup>	Microaerofilo

<sup>1</sup> Apud Bergey.

<sup>2</sup> Apud Ford.

Como diferenças mais importantes dos dois germens salientam-se: a ação coagulante sobre o leite e a produção de fermentos proteolíticos, que fundem a caseína e a gelatina. Seria pois, a especie em questão, diferente da de Lignières, da qual se distingue principalmente pela ausencia da produção de indol, pela capacidade de reduzir os nitratos e pela ação peptonisante sobre a caseína e a gelatina. Alguma duvida poderia surgir, sobre a especificação acima, com as bacterias do genero *Proteus*. De fáto, trata-se de uma bacteria peptonisante, Gram negativa, não esporulada, encontrada nas fézes e dotada de grande pleomorfismo. Mas Fl não é gazogeno como o são todos os *Proteus*; não é movel,

e só se conhece um *Proteus* imóvel, o *P. asiaticus*; mas além dos caracteres acima, o *P. asiaticus* não coagula o leite, não liquefás a gelatina e prodús indol. Fl dá cadeias, propriedade não descrita nos *Proteus*; as suas culturas são inodoras e as dos *Proteus* são de cheiro putrido. Finalmente, o crescimento pobre inicial e a produção de colonias rugosas normais não são caracteres inherentes aos *Proteus*. Formações monstruosas também não fôram descritas neles. A sobrevivencia do *Proteus* em tubos protegidos do dessecamento é quasi indefinida e Fl morria antes de 60 dias. Os *Proteus* alteram o vermelho neutro.

Outras bacterias que se poderiam aproximar dela seriam as pasteurellas. Nenhuma destas, porém, liquefás a gelatina, de modo que são afastados desde logo. Recentemente Boncinelli descreveu uma bacteria com caracteres analogos aos da nossa, isolada por ele de abcesso de rato e por ele filiada ás pasteurellas. Esta bacteria, no entanto, não era dotada de ação sobre o leite nem possuía fermentos proteolíticos. Era justificavel, pois, a filiação que lhe deu Boncinelli.

A semelhança de nossa bacteria com o *Actinobacillus* é, pelo contrario, quasi completa, como vimos acima.

Das suas propriedades merece menção o aspeto da colonia, lisa quando nova, e rugosa com o envelhecimento. Conseguimos dissociar nêle dois tipos de colonias, S e R, bem diferenciados. Uma particularidade se nos deparou interessante: o tipo S mostrou-se puro na dissociação, logo de saída, ao passo que do tipo R fôram necessarias varias passagens sobre placa para consegui-lo puro, donde supôrmos ser aquele o tipo normal da colonia e S a sua fôrma variante, tal qual se observa com outras bacterias que crescem normalmente em colonias rugosas, como o *Bacillus anthracis*, os *Mycobacterium*, etc.

Denominamos a bacteria ora estudada *Actinobacillus psittaci*.

Resta considerar a sua ação patogenica. O actinobacilo isolado por Lignières & Spitz mostrou-se patogenico para anmais de laboratorio e para cavalo e cão. Nada fez sobre passaros. A nossa bacteria, ao contrario, mostrou-se inocua para camondongo, cobaia, rato, galinha, boi e cavalo. Sómente em papagaios obtivemos doença passageira mas deixando traços de sua existencia nos órgãos viscerais, particularmente no figado. Anteriormente já viramos que estes animais são passíveis de se infectarem por bacterias diversas, sob fôrmas frustras ou passageiras, não mortais, incluindo-se mais esta bacteria como agente patogenico deste grupo para eles.

## LITERATURA REFERIDA

- LIGNIERES J. & SPITZ, G. — Contribution à la classification et à la nomenclatura des affections connues sur le non d'actinomyose. *Centralb. f. Bakt.*, Bd. 25, pp. 452-458, 1904.
- BRUMPT, E. — Précis de Parasitologie, p. 1.207, 1927.
- BERGEY, D. — Determinative Bacteriology, 3.<sup>a</sup> Ed., 1930.
- FORD, W. W. — Textbook of bacteriology, 1.<sup>a</sup> Ed., 1927.
- BONCINELLI, U. — Studio su un germe del grupo Pasteurella isolato dal rato bianco. *Boll. Ist. Sierot. Mil.*, vol. II, pp. 834-854, 1932.
- PACHECO, G. — Investigações sobre doenças de psittacideos. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, T. 26, pp. 169-233, 1932.

## EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XXXII—XXXV

## ESTAMPA XXXII

- Fig. 1 — Colonias da cultura original, com varios dias de crescimento, apresentando colonias filhas.
- Fig. 2 — Colonias do typo S.
- Fig. 3 — Colonias dos typos S e R, com colonias filhas.

## ESTAMPA XXXIII

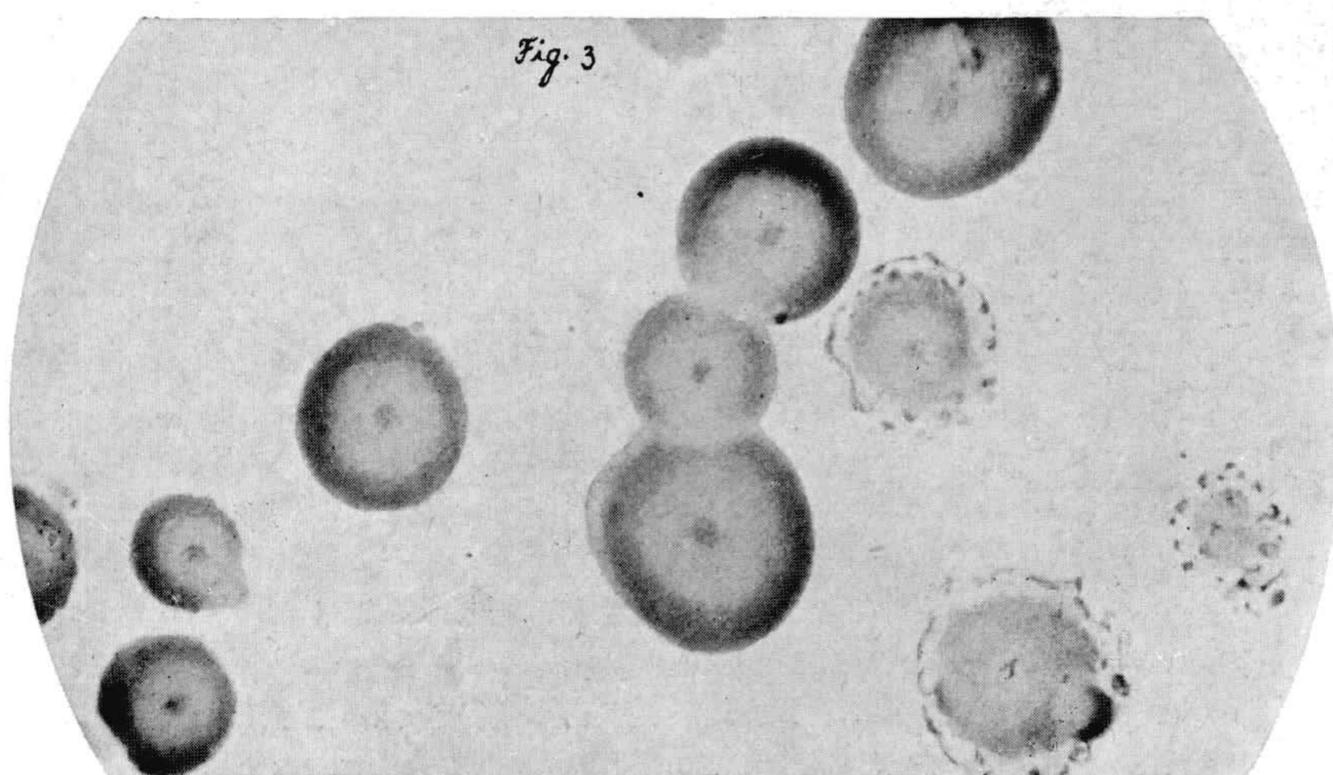
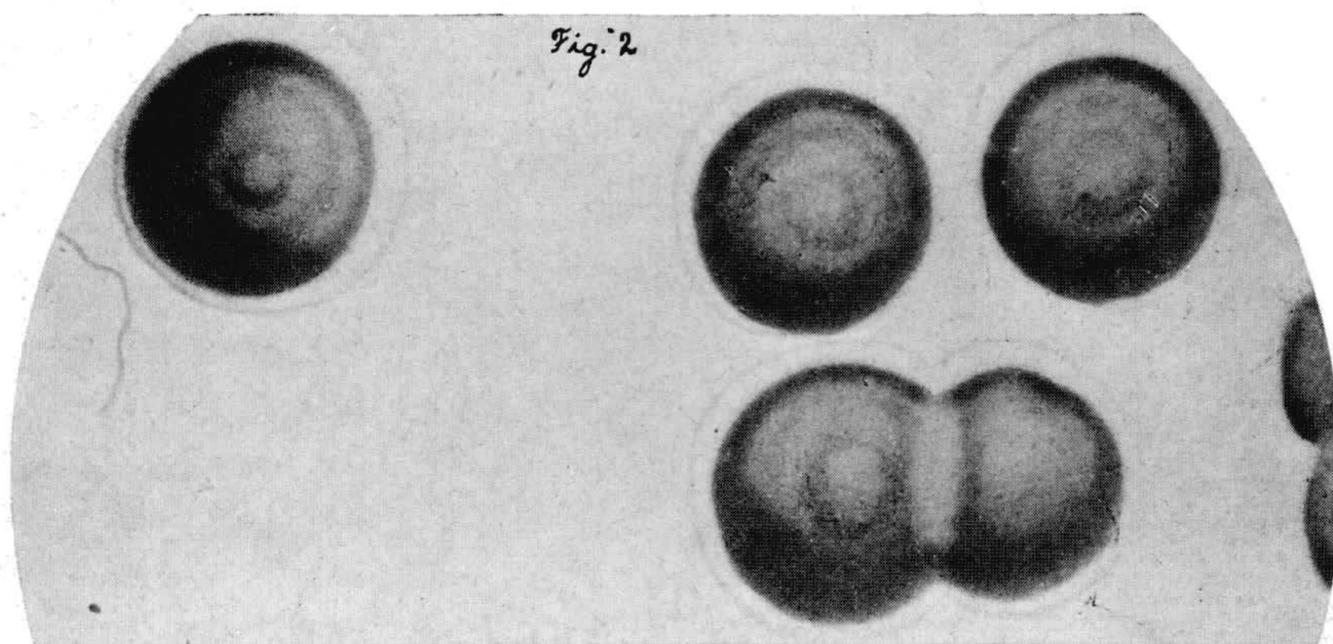
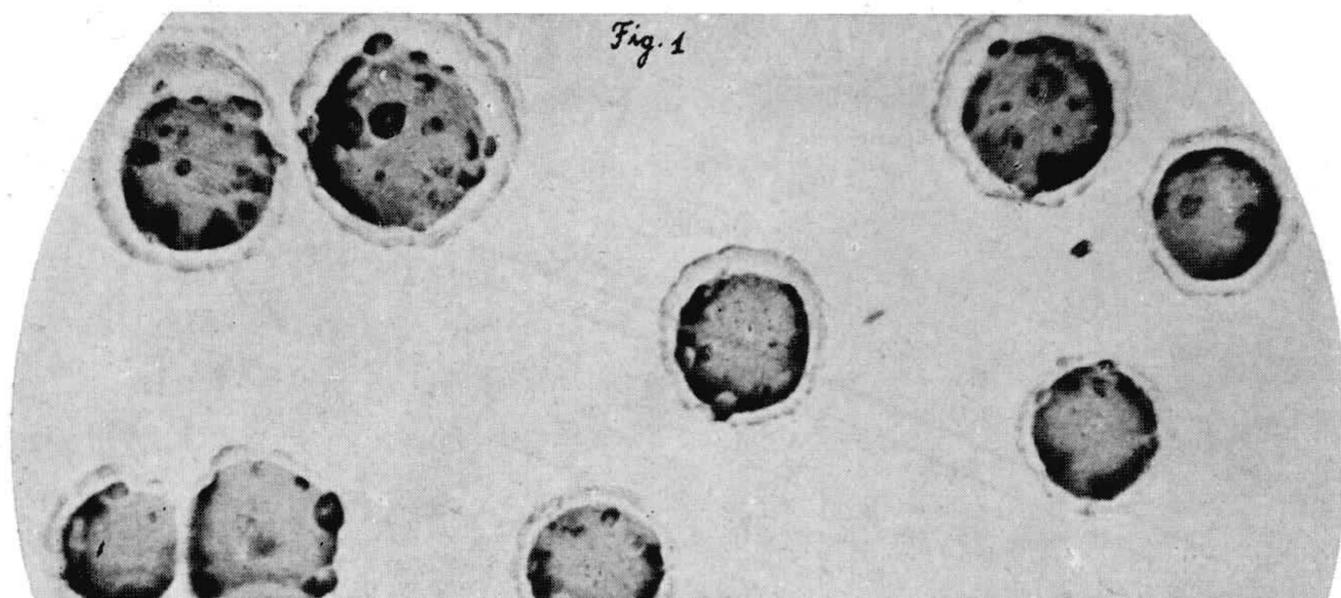
- Fig. 4 — As mesmas muito aumentadas.
- Fig. 5 — Colonias R quasi puras.
- Fig. 6 — Esfregaço da cultura original (2.000 ×).

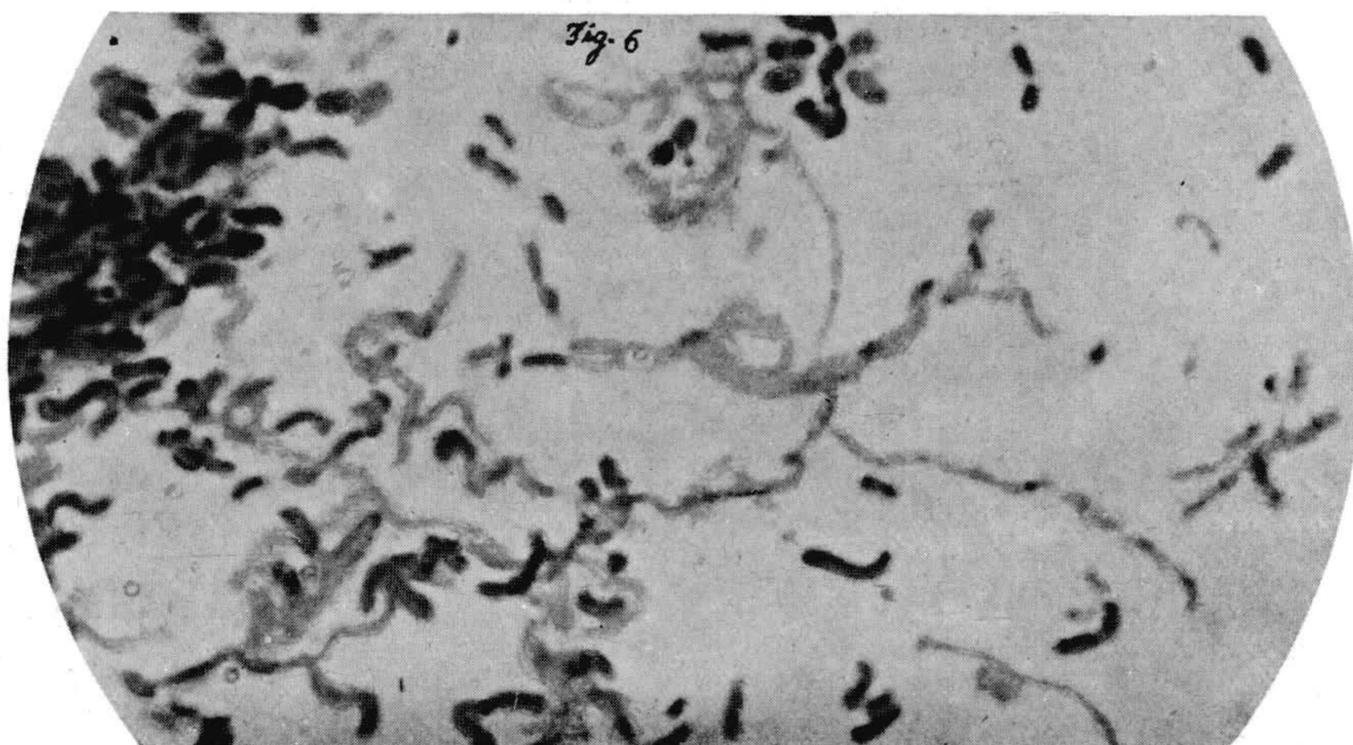
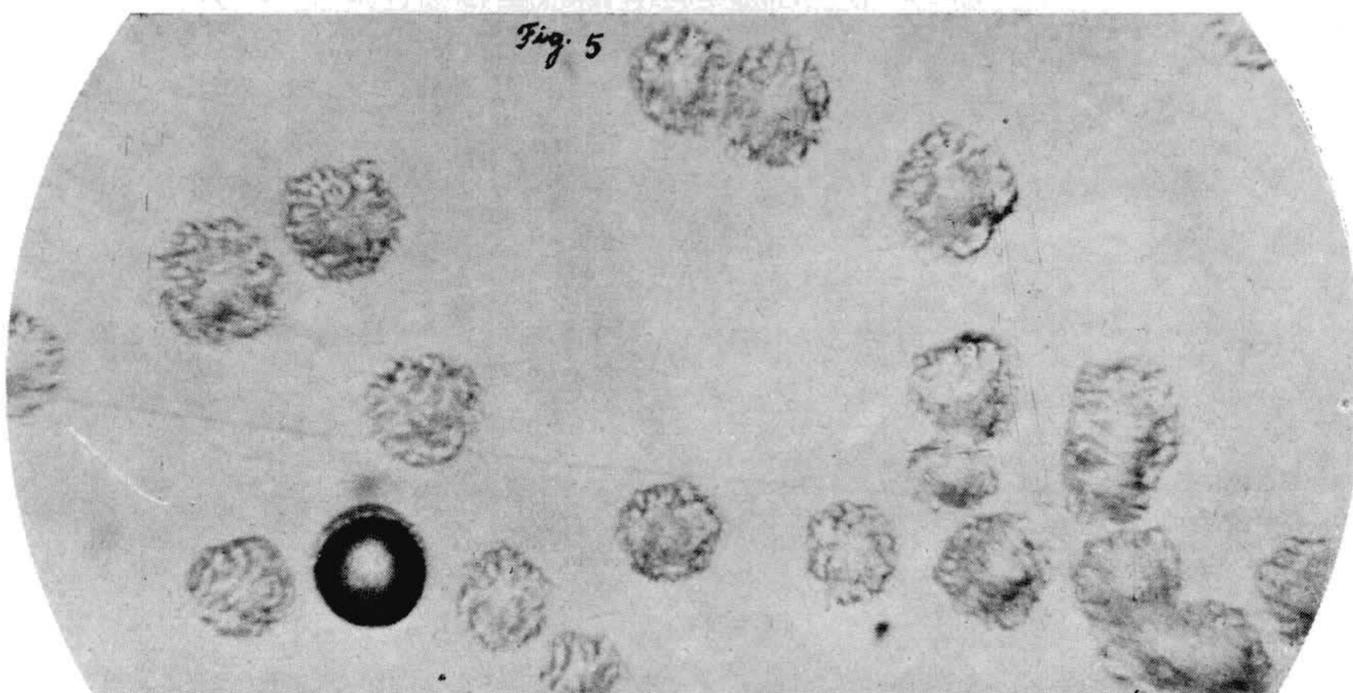
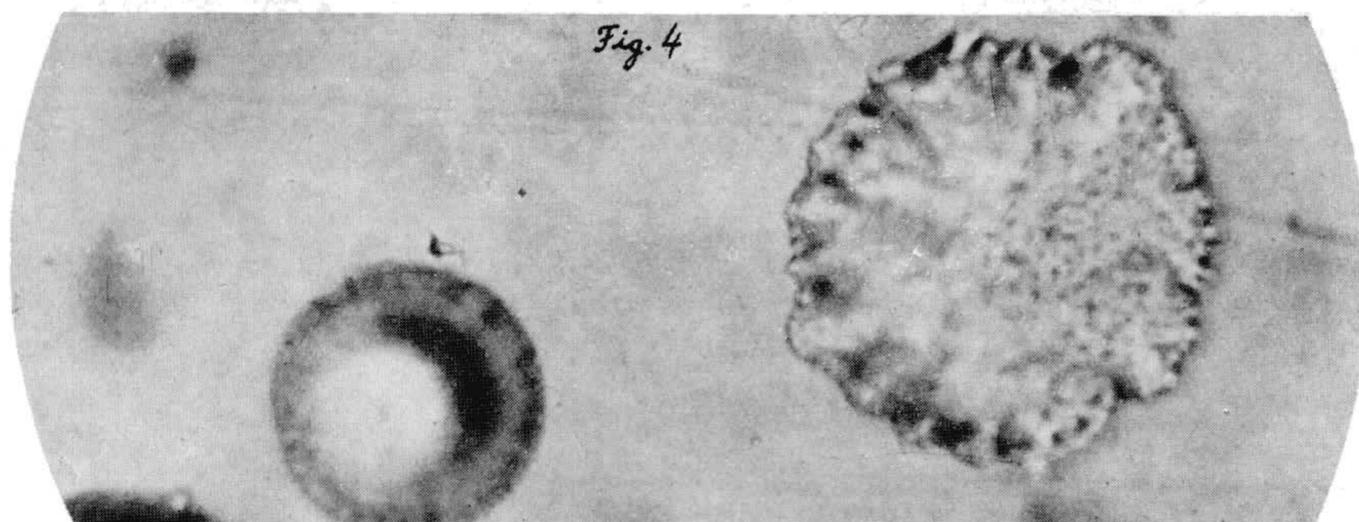
## ESTAMPA XXXIV

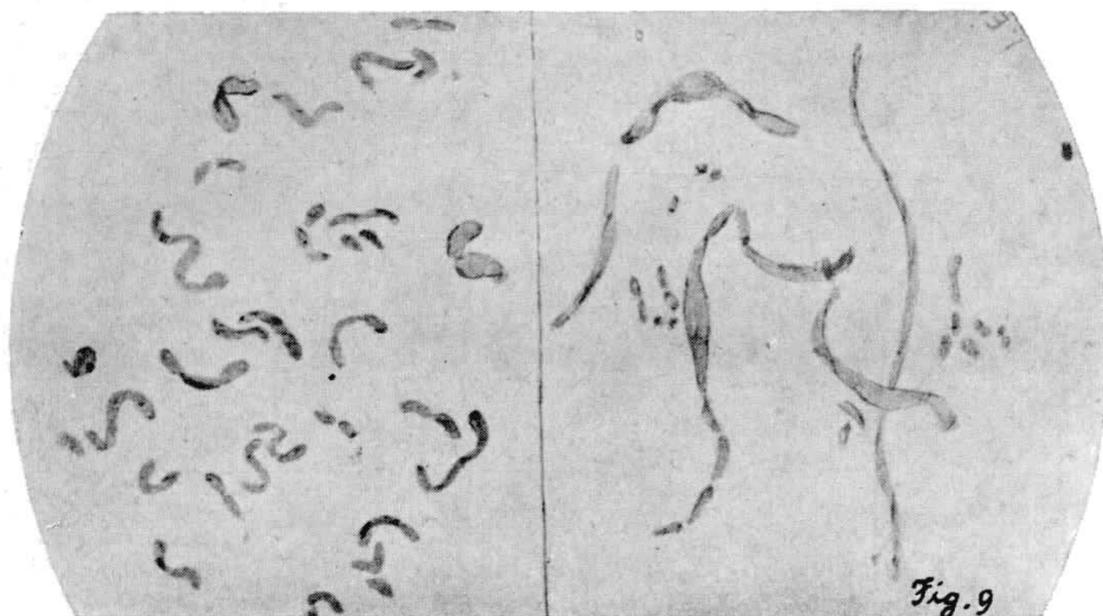
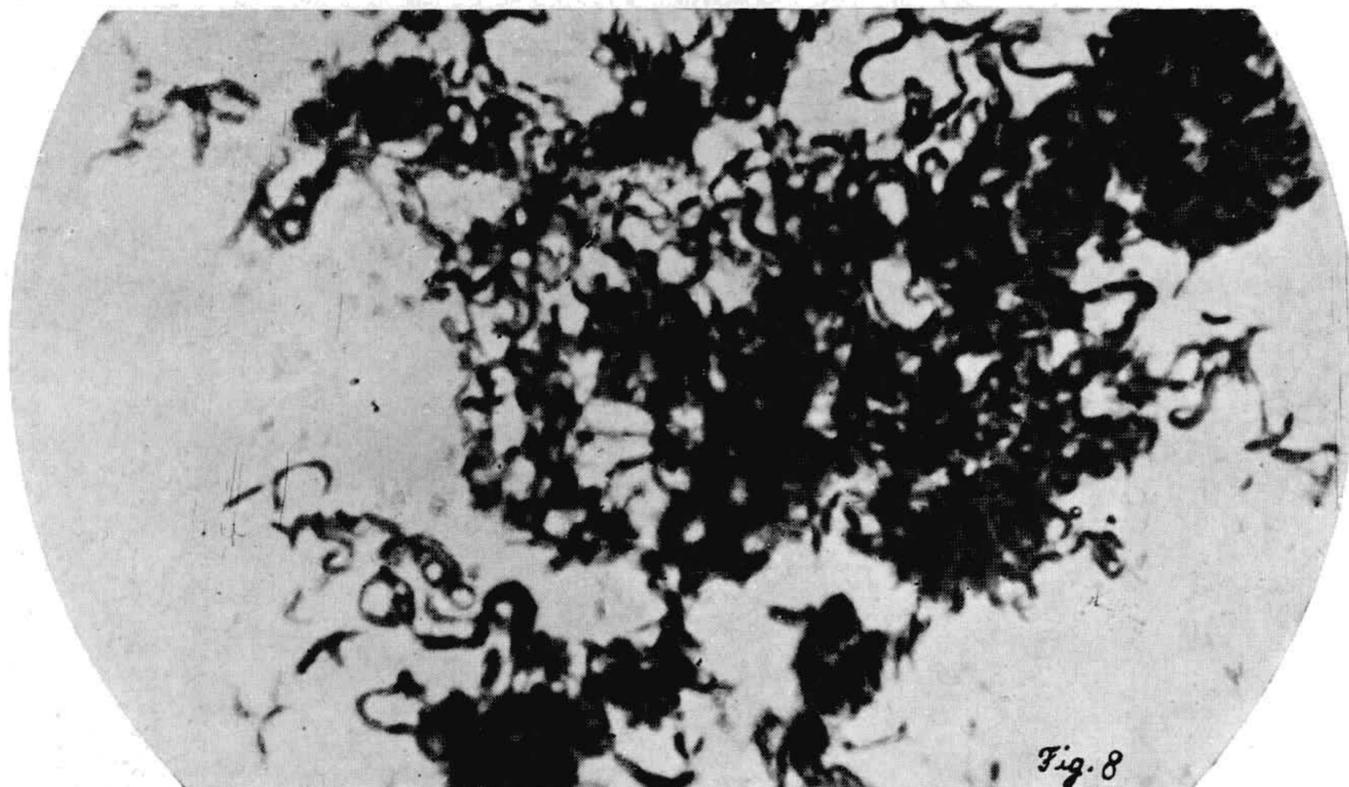
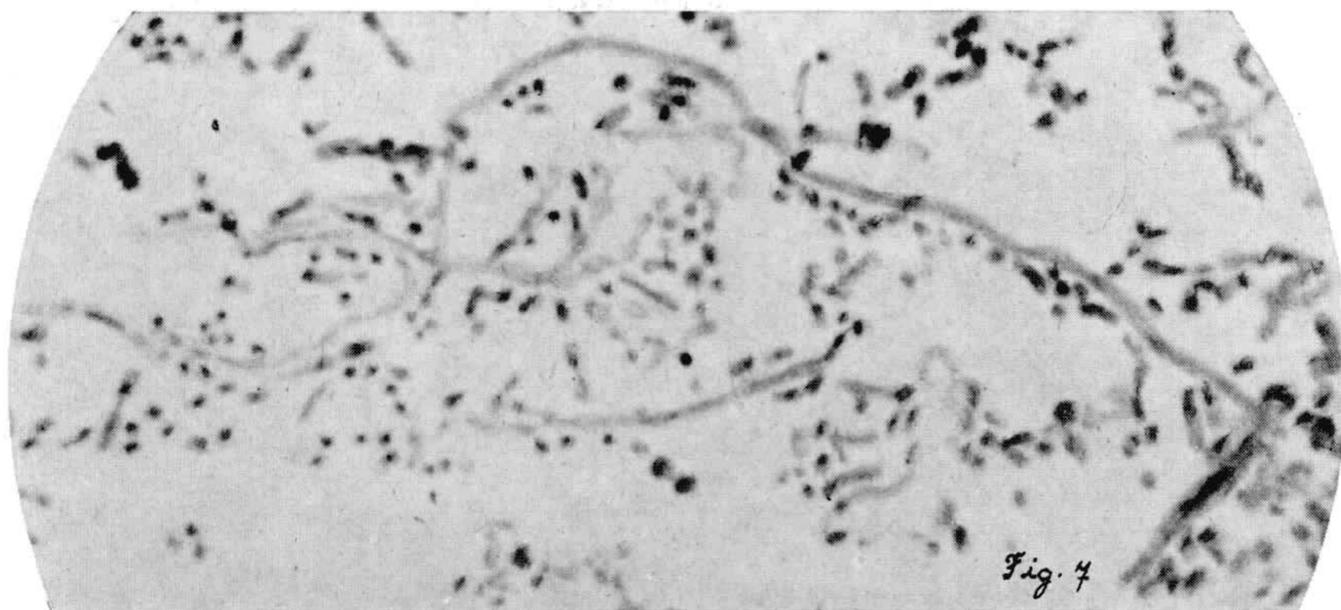
- Fig. 7 — Esfregaço da colonia S (2.000 ×).
- Fig. 8 — Esfregaço da colonia S (2.000 ×).

## ESTAMPA XXXV

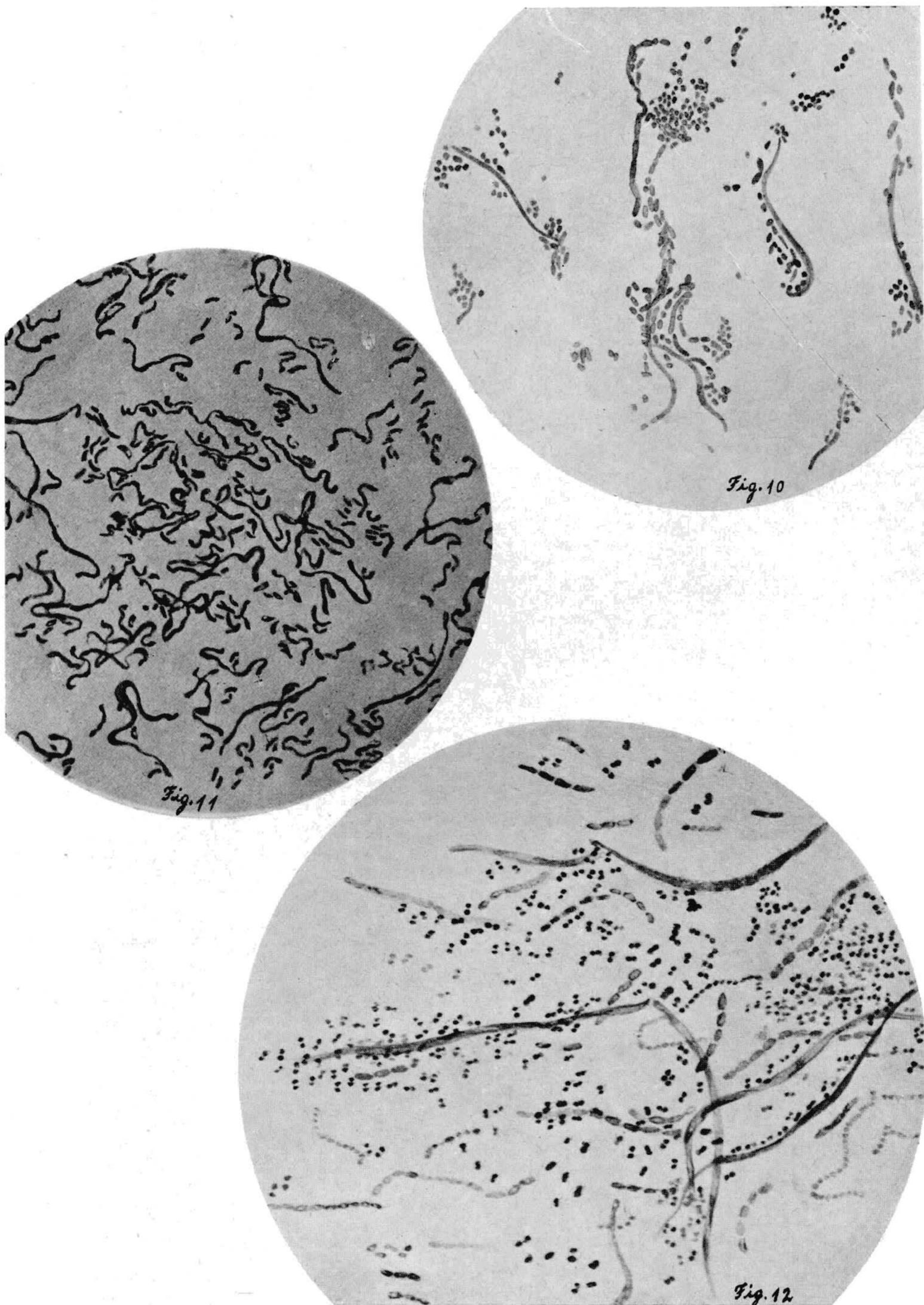
- Figs. 9 a 12 — Fotografias de desenhos mostrando os diversos aspetos microscopicos da bacteria.
-







Genesio Pacheco : Contribuição ao conhecimento dos actinobacilos.  
Contribution à l'étude des actinobacilles.



Genesio Pacheco : Contribuição ao conhecimento dos actinobacilos.  
Contribution à l'étude des actinobacilles.