

TIPAGEM DE SALMONELAS NO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA.*

JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES, ANGUSTO DE E. TAUNAY e
SYLVIO SOARES DE ALMEIDA

Do Instituto "Adolfo Lutz"

O conceito de patogenicidade das Salmonelas tem sofrido profundas alterações desde que o gênero foi criado por Lignières em homenagem a Salmon. Durante muito tempo reinou grande confusão sobre a ação patogênica destes germes para o homem e animais. Somente depois dos estudos sobre a constituição antigênica, estudos esses que permitiram uma análise sorológica capaz de separar tipos distintos, perfeitamente diferenciados entre si, é que o assunto foi se tornando mais claro e melhor estudado. O primeiro passo nesse sentido foi dado em 1910 por experimentadores do Instituto de Higiene da Universidade de Kiel com a criação da Doutrina de Kiel, que dividiu a Salmonelas em 2 grupos: umas adaptadas à espécie humana e outras aos animais. As Salmonelas humanas, bacilo da febre tifóide e os bacilos paratíficos A, B e C são altamente patogênicos para o homem, bastando poucos germes para produzir a infecção. Esta é em geral grave, com invasão do organismo, enfim o quadro tífico clássico.

Muito diferente é o comportamento para o homem das Salmonelas do 2.º grupo, as adaptadas aos animais: são pouco virulentas, praticamente não existindo o contágio inter-humano direto. A mortalidade é baixa, não havendo septicemia. O processo infeccioso localiza-se no tubo gastrintestinal, causado pela ingestão de alimentos contaminados, e somente uma grande massa de germes é capaz de produzi-lo. A moléstia não se manifesta em forma epidêmica, sendo raros os portadores de germes.

Já os animais, mostrando-se pouco sensíveis às salmonelas humanas, são altamente suscetíveis às que lhes são próprias sendo freqüentes as epizootias com quadro semelhante ao da febre tifóide humana.

Recebido para publicação em 15 de abril de 1950.

(*) Trabalho apresentado no Departamento de Patologia da Associação Paulista de Medicina, sessão de 18 de julho de 1949.

Tudo estava estabelecido e aceito nesta base, quando apareceram os trabalhos de Hormaeche e colaboradores, realizados em Montevideu, por volta de 1936. Estes autores não invalidaram a Doutrina de Kiel em relação aos adultos, continuando ela a interpretar a contento os fatos observados.

Porém o conceito da patogenicidade das Salmonelas de origem animal sofreu profundas alterações. Demonstraram os pesquisadores de Montevideu que as crianças apresentam uma grande sensibilidade às salmonelas de origem animal.

A sintomatologia das salmoneloses infantis é bastante variada. Em geral o início da moléstia é lento e insidioso como nas formas tíficas, ou manifesta-se de um modo brusco e violento, com vômitos, abundantes dejeções e grande desidratação, como nas intoxicações alimentares.

Em muitos casos os sintomas são precedidos de angina, não sendo raro isolar-se das fezes e do rinofaringe o mesmo tipo de Salmonela. As localizações extra-intestinais são bastante frequentes, não sendo a enterite manifestação obrigatória. Vários casos de anginas, otites, septicemias, meningites, endo e pericardites, sinusites, pielonefrites, têm sido descritos com ausência de sintomatologia entérica. A mortalidade nas crianças é bastante alta, contrastando com a relativa benignidade do processo quando atinge o adulto.

Em resumo, após a divulgação da Doutrina de Montevideu ficou estabelecido o seguinte: 1.º) na criança são comuns as complicações extra-entéricas; 2.º) a localização intestinal não é obrigatória, havendo casos extra-entéricos primários; 3.º) a maior sensibilidade das crianças para as salmonelas animais condiciona facilidade de contágio, e alta mortalidade.

Não se conhece ainda uma definição de Salmonela que inclua todos os característicos do grupo e abranja tôdas as exceções.

Quando nos referimos a elas empregamos o termo de acôrdo com a definição do Comitê de Salmonelas da Associação Internacional de Microbiologia, que só aceita os caracteres antigênicos próprios do grupo, achando que as propriedades bioquímicas, embora muito importantes, não são suficientes para incluir uma espécie no gênero.

As propriedades antigênicas das Salmonelas dependem de certos fenômenos de variação a que êsses bacilos estão sujeitos.

Possuem dois tipos de antígenos, somático e flagelar, que diferem em suas características físicas, cada um dêles estimu-

lando *in vivo* seu próprio anticorpo e reagindo exclusivamente com êle.

O antígeno flagelar H é termolábil, sendo progressivamente inativado em temperatura acima de 60°C. Suas propriedades aglutinogênicas são destruídas após aquecimento a 100°C. durante uma hora, ou pelo contacto com ácidos e álcool. Em presença de anticorpos correspondentes são aglutinadas, rapidamente, em flocos grandes e fofos prontamente desfeitos mediante uma agitação não muito intensa.

As Salmonelas podem apresentar dois tipos de antígenos flagelares: fase I e fase II, designados respectivamente por letras minúsculas e algarismos arábicos. Algumas espécies encerram apenas antígenos flagelares de uma fase, sendo denominadas monofásicas. Nos tipos difásicos uma das fases pode estar temporariamente suprimida.

O antígeno somático O, simbolizado por algarismos romanos, resiste à ação dos ácidos e do álcool, e um aquecimento prolongado a 100°C não afeta suas propriedades aglutinogênicas. Reage com suas aglutininas muito mais lentamente que o antígeno H, dando origem, entretanto, a grumos granulosos que dificilmente se desfazem.

Baseado nas propriedades dos seus antígenos torna-se possível a obtenção de soros monovalentes que permitem a identificação dos vários tipos.

O caminho certo a seguir quando se pretende a tipagem de uma Salmonela depende da cuidadosa interpretação de provas bioquímicas e sorológicas do organismo suspeito. Alguns testes bioquímicos devem ser executados preliminarmente, com o intuito de afastar de início um grande número de germes que não possuem os atributos bioquímicos do gênero. As amostras restantes são então submetidas a provas sorológicas, o único meio que nos permite uma tipagem exata e segura.

Vejamos, muito sumariamente, a marcha por nós seguida no Instituto "Adolfo Lutz".

Chegado ao laboratório é o material semeado imediatamente em dois tubos, um contendo glicerina-cloreto de sódio a 30% e o outro tetracionato de Kauffmann. São meios preservativos e de enriquecimento. A emulsão em glicerina-cloreto de sódio fica em temperatura ambiente cerca de 30 minutos, sendo semeada nos meios seletivos de eosina-azul de metileno de Holt-Harris-Teague e ágar SS. O tubo de tetracionato de Kauffmann vai para a es-

tufa a 37°C., só sendo passado para as placas seletivas depois de incubado 24 horas. As colônias suspeitas são inoculadas no tríplice açúcar de Krumwiede modificado com a inclusão de sulfato ferroso para a produção de H₂S, o que, após uma incubação de 24 horas em estufa, muitas indicações pode fornecer. Havendo produção de ácido e gás na base, com ou sem produção de H₂S, serão utilizados os seguintes meios diferenciais: dextrose, lactose, sacarose, sorbita, água peptonada para verificação do indol, meio de Clark-Lubs para acetilmetilcarbinol, meio de Simmons para verificar a utilização do citrato, meio de Stuart para desdobramento da uréia, caldo comum para verificação de movimento e um tubo de ágar comum inclinado para eventuais provas sorológicas.

Esta série de meios permite diferenciar a maior parte das vezes uma *Salmonela*, dos *Proteus* e *Paracoli* que freqüentemente se comportam no tríplice açúcar de maneira idêntica às *Salmonelas*.

Tôdas as culturas que acidificam a dextrose e sorbita com produção de gás, produzem H₂S, não alteram a lactose e sacarose, utilizam o citrato, não produzem indol e acetilmetilcarbinol, não hidrolizam a uréia e são móveis, devem ser consideradas bioquimicamente como *Salmonelas*.

Algumas dessas reações são tardias. Assim é que muitos germes só hidrolizam a uréia em 48 horas. A pesquisa de acetilmetilcarbinol deve ser feita em 24 horas e 5 dias. A acidificação da lactose e sacarose algumas vezes só se processa em 20 dias, devendo os tubos serem arrolhados com borracha ou cortiça para apressar a reação.

Eliminam do gênero a acidificação da lactose ou sacarose, a produção de indol, de acetilmetilcarbinol e a hidrólise da uréia.

Os germes que bioquimicamente se comportarem como *Salmonelas*, são emulsionados em solução fisiológica e feita a aglutinação em lâmina com dois soros polivalentes, um somático e outro flagelar. O primeiro é preparado com várias amostras de *Salmonelas* para que contenha aglutininas somáticas que reajam com todos os tipos.

O soro polivalente flagelar é também produzido com todos os antígenos H específicos e inespecíficos, do qual se retira por saturação as aglutininas somáticas.

Obtendo-se aglutinação rápida e evidente em ambos os soros damos um resultado provisório de *Salmonela* sp.

Iniciamos então a identificação específica desses germes, que pode ser conseguida como demonstraremos, com um pequeno número de soros somáticos e flagelares devidamente purificados por saturação ou diluição.

O antígeno somático é primeiramente identificado, usando-se oito soros puros O, representando os principais grupos do esquema de White-Kauffmann.

Os soros somáticos empregados são devidamente diluídos ou absorvidos, possuindo apenas aglutininas capazes de reagirem com os antígenos específicos de cada grupo. Usamos soros por nós denominados A, B, C₁, C₂, D, E₁, E₂, E₃, contendo respectivamente aglutininas II-IV, V-VII-VIII-IX-X, XXVI-XV e XIX.

Praticamos as aglutinações em placa usando antígenos preparados pelo método de White que consiste na emulsão dos germes em 1cc de álcool absoluto, aquecimento a 60°C. durante 1 hora, sedimentação por centrifugação, sendo em seguida o álcool decantado, os bacilos resuspenso em 0,5cc. de salina normal e filtrados em algodão. Este método é particularmente útil para o exame de colônias ligeiramente rugosas. A aglutinação é rápida processando-se, em geral, dentro de 1 minuto.

As culturas que não aglutinaram nos 8 soros descritos são posteriormente testadas com os soros somáticos restantes. Depois de identificados os antígenos somáticos recorreremos ao esquema de Kauffmann para verificar quais os antígenos flagelares que podem ocorrer em combinação com os antígenos O da cultura examinada.

Freqüentemente torna-se dispensável a pesquisa de todos os antígenos flagelares do grupo, porquanto apenas alguns tipos são comumente encontrados.

Se por exemplo, o organismo é membro do grupo B, provavelmente será *S. paratyphi B* ou *S. typhimurium*. Portanto é lógico experimentar o germe inicialmente com fatores b e i para a fase específica, 2 e 3 para a não específica, antes de testá-lo para os antígenos dos membros mais raros.

No preparo dos soros flagelares deve ser levada em conta uma série de requisitos. É extremamente importante que somente formas bem móveis sejam usadas, pois os antígenos H estão associados com os flagelos.

A motilidade pode ser ativada com repiques sucessivos em ágar semi-sólido.

Na produção dos soros flagelares procuramos empregar quando possível apenas raças monofásicas. Isto, porém, às vezes é impraticável, sendo necessário obtermos uma fase de um tipo difásico, para ser usada como antígeno. Usamos um método rápido e seguro descrito por Gard, que consiste em semear a raça difásica na parte superior de um tubo de ágar semi-sólido contendo pequena quantidade de sôro aglutinante capaz de reagir especificamente com a fase que se deseja suprimir. Esta é dessa forma immobilizada e a outra difunde-se no ágar semi-sólido. Fundindo-se a parte superior do meio na chama obtém-se no fundo do tubo a fase desejada.

Os soros derivados de uma fase induzida contêm uma pequena quantidade de aglutininas para a fase suprimida. Devem ser purificados por diluição ou saturação.

As aglutinações flagelares são praticadas em tubos. Os antígenos usados são culturas em caldo, de germes móveis, diluído com igual volume de salina formolada a 0,6%. Os tubos são colocados em banho-maria a 50°C. durante 1 hora e então lidos.

Usando o método que acabamos de descrever conseguimos identificar 216 salmonelas isoladas no Instituto "Adolfo Lutz", entre 1942 e 1948. Encontramos 17 tipos diferentes.

Verificamos que a espécie de maior incidência entre nós é a *S. newport*, isolada 63 vezes com uma porcentagem de 29,1%. *S. anatum* vem em seguida, isolada 40 vezes com 18,5%. Identificamos, ainda, 19 *S. typhimurium* com porcentagem de 8,7%; 15 *S. butantan* e *give* com 6,9% e 14 *S. paratyphi B* com 6,4%. Os tipos de menor incidência que encontramos são os seguintes, citados na ordem de freqüência: *S. derby*, *reading*, *panama*, *oranienburg*, *bredeney*, *paratyphi A*, *london*, *scfttenberg*, *minnesota*, *gaminara* e *montevideo*.

Trabalhos publicados em nosso meio por um de nós e por Peluffo e colaboradores confirmam os resultados que obtivemos relativamente à freqüência das principais Salmonelas.

Para identificação das raças por nós isoladas foram necessários apenas 8 soros somáticos, 10 flagelares específicos e 5 flagelares inespecíficos. Os primeiros já descrevemos anteriormente. Dos flagelares específicos usamos a, b, d, eh, fg, gms, gst, i, lv, e mt. E dos inespecíficos 2, 3, 5, 6 e 7.

Este método dá resultados perfeitamente satisfatórios para trabalhos de rotina que exigem testes rápidos e simples.

Concluimos, portanto, afirmando ser possível uma tipagem segura das principais Salmonelas encontradas em nosso meio, com o emprêgo de um reduzido número de soros aglutinantes.

RESUMO

Os Autores referem-se inicialmente ao conceito de patogenicidade das Salmonelas, segundo as doutrinas de Kiel e de Montevideu. Após considerações sobre os antígenos somáticos e flagelares descrevem a técnica que usam no Instituto "Adolfo Lutz", para o isolamento e identificação das Salmonelas. Os germes que se enquadram, bioquimicamente, dentro do gênero são emulsionados em solução salina, sendo feita aglutinação em lâmina com dois soros polivalentes, um somático e outro flagelar, contendo respectivamente aglutininas O e H capazes de reagirem com tôdas as espécies de Salmonelas.

Para a identificação específica, os Autores empregam pequeno número de soros somáticos e flagelares, devidamente purificados por saturação ou diluição.

Dêsse modo, conseguiram tipar 216 amostras, encontrando 17 tipos diferentes. Verificaram que as espécies de mais incidência entre nós são as seguintes, citadas na ordem de freqüência: *S. newport*, *S. anatum*, *S. typhimurium*, *S. butantan*, *S. give* e *S. paratyphi*.

SUMMARY

The Authors refer primely to the idea of pathogenicity of the Salmonella. After making considerations about the somatic and flagellated antigens, they describe the technique used in the Instituto "Adolfo Lutz" for the isolation and identification of the Salmonella. The organisms which by their biochemical characteristics are classified in this genus are emulsionated in a saline solution. A slide test with two polyvalent sera is performed, containing respectively agglutinins O and H able of reacting with all types of Salmonella.

For the typing the Authors used a small number of somatic and flagellated sera, duly purified by saturation or dilution.

Thus the Authors typed 216 strains, obtaining 17 different types. They verified that the most common species among us are the following, named in the order of frequency: *S. newport*, *S. anatum*, *S. typhimurium*, *S. butantan*, *S. give* and *S. paratyphi*.

BIBLIOGRAFIA

- BARNES, L. A. — 1947 — O gênero *Salmonella* e salmoneloses. *São Paulo Médico* 2: 271-292.
- BORMAN, E. K. e K. M. Wheeler — 1943 — *Salmonella* typing in a Public Health Laboratory. *Am. J. Pub. Health* 33: 127-134.
- BORNSTEIN, S. — 1943 — The state of the *Salmonella* problem. *J. Immunol.* 46: 439-496.
- EDWARDS, P. R. e D. W. Bruner — 1942 — Serological identification of *Salmonella* cultures. *Ky. Agr. Exp. Station Circular* 54: 1-35.
- EDWARDS, P. R. e D. W. Bruner — 1943 — The occurrence and distribution of *Salmonella* types in the United States. *J. Infect. Dis.* 72: 58-67.
- FELSENFELD, O. e V. M. Young — 1945 — A polyvalent serum for the diagnosis of *Salmonella*. *J. Lab. & Clin. Med.* 30: 550-551.
- HAJNA, A. A. e S. R. Damon — 1950 — Polyvalent *Salmonella* "H" agglutination as a rapid screening test for *Salmonella* organisms. *Pub. Health Rep.* 65: 116-118.
- HORMAECHE, E., C. A. Peluffo e P. L. Aleppo — 1936 — Nueva contribucion al estudio etiologico de las diarreas infantiles de verano. *Arch. Urug. de Med., Cir. y Especialidades* 9: 113-162.
- HORMAECHE, E. et al. — 1947 — Nuevos estudios sobre las diarreas infantiles de origem infeccioso. *An. Inst. Higiene de Montevideo* 1: 33-45.
- KAUFFMANN, F. e P. R. Edwards — 1947 — A simplification of the sorologic diagnosis of *Salmonella* cultures. *J. Lab. & Clin. Med.* 32: 548-553.
- PELUFFO, C. A., P. R. Edwards e D. W. Bruner — 1942 — A group of coliform bacilli serologically related to the genus *Salmonella*. *J. Infect. Dis.* 70: 185-192.