

INSTITUTO DE HIGIENE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE HIGIENE E SAUDE PÚBLICA DO ESTADO
DIRETOR: PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

BOLETIM N. 76

**Estudo de uma SALMONELLA DERBY (isolada em S. Paulo),
pelo esquema de classificação sorológica de Kauffmann-White**

PELO
DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO
CHEFE DE SERVIÇO DO INSTITUTO DE HIGIENE DE S. PAULO

1942
IMPrensa OFICIAL DO ESTADO
SÃO PAULO

ESTUDO DE UMA "SALMONELLA DERBY" (ISOLADA EM S. PAULO), PELO ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE KAUFFMANN-WHITE *

Pelo

DR. LUCAS DE ASSUMPTÃO

Chefe de serviço do Instituto de Higiene de S. Paulo

— I —

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ANTÍGENOS SOMÁTICOS E FLAGELARES DAS SALMONELAS

a) Os antígenos somáticos das salmonelas — No estudo do antígeno somático ("O") das salmonelas é indispensável o conhecimento dos trabalhos de ARKWRIGHT (1) (1921) com germes do grupo coli-tífico-disentéricos, aos quais seguiram-se outros de diversos autores, feitos em quase todos os germes patogênicos, trabalhos que mostram que um mesmo germe pode apresentar-se sob duas variantes, perfeitamente distintas pelo aspecto de suas colônias sobre gelose, como também pelo aspecto de sua cultura em caldo e pelo seu comportamento em presença dos eletrólitos.

Uma variante dá colônias lisas, cultura homogênea em caldo e não se aglutina espontaneamente em soro fisiológico. Outra dá colônias rugosas, cultura com depósito em caldo e aglutinação esponânea no soro fisiológico. Convencionou-se denominar, abreviadamente, as colônias lisas pela letra S (Smooth), e as rugosas R (rough).

(*) Trabalho apresentado à Associação Paulista de Medicina (Secção de Higiene, Moléstias Tropicais e Infecciosas) em 4 de dezembro de 1941.

Estas alterações morfológicas que apresentam as variações S e R têm grande importância porque são seguidas de mudanças na atividade bioquímica e também imunológica das bactérias. De fato, essas duas variantes são diferentes pela sua estrutura antigênica.

Os trabalhos de WHITE (2) (1926) mostraram que a forma rugosa (R) contem um antígeno somático estável em relação ao calor e ao álcool, mas que difere, por sua especificidade, do antígeno somático (O) característico da forma lisa (S). Os anticorpos de cada um não aglutinam senão a variante que lhe corresponde (SMITH e REAGH (3) — 1903, BEYER e REAGH (4) — 1904).

Em um grupo de bactérias aparentadas como, por exemplo, as salmonelas, encontram-se entre as formas lisas tipos perfeitamente distintos pela especificidade de seu antígeno somático (O) como, por exemplo, **E. typhosa**, **S. schottmuelleri**, **S. paratyphi**, **S. enteritidis**, etc., ao passo que as suas formas rugosas são indistinguíveis pela aglutinação, como o demonstrou SCHÜTZ (1921) pela primeira vez.

Portanto, no estudo do antígeno "O" das **Salmonella** é indispensável partir de colônia lisa.

Na constituição do antígeno somático podem as salmonelas (1) apresentar um, dois ou mesmo três fatores antigênicos e ainda alguns fatores menores.

Os estudos sorológicos que orientaram os pesquisadores no sentido de se classificarem as salmonelas em tipos de acordo com a sua constituição antigênica, foram iniciados por SCHÜTZ (5-6) (1920-1921), no Instituto Lister e continuados por outros autores ingleses, sobresaindo-se BRUCE WHITE (7) (1925-1929).

Para a identificação dos fatores antigênicos encontrados nas salmonelas WHITE propôs diversos símbolos. Mas acontece que KAUFFMANN (8-11) (1929-1930), na Alemanha, após notáveis estudos sobre o assunto, usou símbolos diferentes. Sendo assim, os esquemas apresentados por ambos só poderiam ser consultados por meio de uma chave dando a equivalência desses símbolos.

Graças a um acordo havido entre ambos, a Sub-comissão da Sociedade Internacional de Microbiologia (12) (1934) publicou um esquema da composição antigênica das salmonelas, conhecido por esquema de KAUFFMANN-WHITE.

Neste esquema foi adotada a terminologia de KAUFFMANN.

KAUFFMANN no início ainda atribuía algum valor às provas culturais, juntamente com as sorológicas, no estudo das salmonelas, abandonando-as completamente nos seus últimos trabalhos para pôr toda a sua confiança exclusivamente na análise sorológica.

KAUFFMANN divide as espécies do género **Saimonella** em diversos grupos baseados na semelhança do antígeno somático, que é o mais importante sob o ponto-de-vista imunológico na opinião da maioria de autores (ARWRIGHT, SCHUTZE, GREENWOOD, etc.).

No esquema de KAUFFMANN-WHITE as divisões em grupos são indicadas pelas letras maiúsculas A-B-C-D-E, etc. Cada um destes grupos é constituído por salmonelas com antígenos somáticos comuns, sendo estes, por sua vez, designados pelos números romanos I-II-III-IV, etc. A sub-divisão em tipos é feita depois de acordo com a constituição antigênica flagelar.

O princípio do método para o conhecimento dos antígenos somáticos é o seguinte, podendo-se fazer de diversos modos. Partindo de colônia lisa a suspensão deverá ser aquecida a 100° (antígeno flagelar e termolábil) ou tratada pelo álcool, processos que destroem o antígeno flagelar, permanecendo apenas os somáticos que são termo-resistentes e que não são destruídos quando tratados pelo álcool. Injetando-se esta suspensão em coelhos obtém-se um soro imune somático de ação sobre o antígeno somático, mas não sobre o ciliar. Este soro agindo sobre a mesma salmonela na aglutinação feita em tubo, macroscópica, forma grumos finos que se depositam no fundo do tubo e que só se desagregam pela agitação com certa dificuldade — é a **aglutinação granular** ou somática.

Em geral preparam-se soros somáticos (anticorpos "O") correspondendo aos diversos tipos de salmonelas. Praticam-se em seguida aglutinações com estes soros não absorvidos ou absorvidos por um tipo dado, ou ainda absorvidos por diversos tipos. No fim, aglutinações e absorções cruzadas.

As aglutinações com soros somáticos são lidas após 24 horas na estufa a 37°C e podem ser feitas com as suspensões aquecidas, ou tratadas pelo álcool ou ainda vivas, visto não terem esses soros anticorpos "H" para os antígenos flagelares.

b) **Os antígenos flagelares das salmonelas** — A existência nas bactérias ciliadas de um antígeno especial, denominado antígeno "H", pode ser demonstrada de diversas maneiras. Preparando-se um soro injetando uma bactéria ciliada em um animal e dele eliminando-se os anticorpos somáticos pela absorção

por corpos bacterianos aquecidos a 100°, este soro assim absorvido conservará um forte poder aglutinante devido à permanência de anticorpos “H”.

Orcutt (13) (1924) fez experiências muito interessantes para demonstrar a presença do antígeno “H” nas bactérias móveis. Submetendo as bactérias a uma prolongada agitação mecânica e em seguida fazendo centrifugações fracionadas, conseguiu suspensões de flagelos sem os corpos bacterianos. Esta suspensão de flagelos, injetada em animais, fez aparecer anticorpos “H”, mostrando-se o soro sem ação sobre a parte somática da bactéria devido a não existência do anticorpo “O”.

Contrariamente aos antígenos somáticos, os antígenos ciliares são labéis.

Uma bactéria móvel aquecida a 100°, ou tratada pelo álcool perde o seu antígeno “H”; e, sendo assim, não será aglutinada por um soro ciliar homólogo, nem produzirá no animal anticorpos “H”.

As suspensões de antígeno “H” para imunizações, servindo também para as aglutinações, podem ser preparadas em água fisiológica ou cultura em caldo, sempre mortas pelo formol a 3%.

As aglutinações flagelares devem ser feitas a 50°-55°, em banho-maria, e a leitura após 2 horas. Macroscopicamente essas aglutinações nos mostram grandes flocos que se desagregam muito facilmente, caracterizando a **aglutinação flocular** ou ciliar.

In vitro, quando se põe em contacto bactérias flageladas vivas com anticorpos ciliares correspondentes, observa-se o seguinte: a) imobilização quasi imediata, b) aglutinação rápida em grandes flocos, c) estabelece-se a coerência das bactérias apenas pelos flagelos; se colocados sobre a ação de anticorpos somáticos: a) as bactérias não se imobilizam, b) aglutinam-se lentamente, formando pequenos grânulos, c) dá-se a coerência das bactérias pelos corpos bacilares e, d) estes granulos permanecem móveis, o que vem demonstrar que os anticorpos somáticos mostram-se sem ação sobre os flagelos.

Uma pesquisa interessante, feita por ANDREWS (1922) (14), sobre fases antigênicas, se de um lado complicou o estudo da constituição do antígeno flagelar das salmonelas, de outro, veio dar grande precisão na determinação dos seus tipos sorológicos. Estes estudos foram em seguida desenvolvidos por WHITE e por KAUFFMANN.

Esses trabalhos demonstraram que uma salmonela pode apresentar o antígeno “H” sob duas formas nitidamente distintas pela sua especificidade: **uma específica** e outra **não específica**.

A não específica tem uma equivalência de grupo; ao passo que a específica é própria de um reduzido grupo de bactérias. Um^as podem apresentar uma só dessas fases e se denominam **monofásicas**, outras apresentam a um tempo só as duas fases — são as **difásicas**. SIC A S.

Praticamente, dá-se o seguinte: semeando-se, por exemplo, **E. sendai** (*) (difásica) em placas de gelose de maneira a se obter colônias bem isoladas e, submetendo-se cada colônia à aglutinação com soro flagelar **S. paratyphi** (**) (monofásica) observa-se que umas serão aglutinadas e outras não (ambas apresentam na fase específica o mesmo antígeno ciliar). Preparando-se soro flagelar com as colônias que foram aglutinadas (colônias positivas) este soro além de aglutinar as colônias positivas da **E. sendai**, também o fará com o antígeno flagelar de **S. paratyphi**; pelo contrário, se prepararmos soro flagelar com as colônias que não aglutinaram (colônias negativas), este só aglutinará as colônias negativas, mas não o antígeno flagelar de **S. paratyphi**, nem o fará com as colônias de **E. sendai** que deram reação positiva com o soro flagelar de **S. paratyphi**. Donde se infere que **E. sendai** pode apresentar na constituição do seu antígeno “H” (flagelar), dois tipos distintos de antígenos: um, comum com **S. paratyphi** (“a”), outro, que se não encontra nesta (1, 4, 5). Se passarmos uma colônia positiva em placas, ela apresentará colônias dissociadas positivas e negativas, podendo-se observar o mesmo com as negativas.

Existem salmonelas que só apresentam antígenos ciliares na fase específica, não os contendo na fase não específica, como, por exemplo, **S. paratyphi** (a : —), **S. enteritidis** (gom : —); ou o inverso, isto é, fatores antigênicos só na fase de grupo, como a **S. choleraesuis** var. de **Kunzendorf** (— : 1, 3, 4, 5) e a **S. newport** var. **puerto-rico** (— : 1, 2, 3), existindo ainda as que apresentam fatores antigênicos nas duas fases — **S. schottmueleri** (b : 1, 2), **S. typhimurium** (i : 1, 2, 3).

A fase específica do antígeno flagelar de algumas salmonelas monofásicas, como observaram KAUFFMANN e MITSUI (1930), pode apresentar-se em duas fases, mas todas as duas específicas, e que são assinaladas com as letras α e β . Representa α os fatores antigênicos usuais e β os excepcionais. E’ o que se pode ver com **E. typhoide** que apresenta o fator antigênico “d” nas colônias α e o fator “j” nas colônias excepcionais β .

(*) Antígeno “H” = (a : 1.4.5)

(**) Antígeno “H” = (a : —)

No esquema de KAUFFMANN-WHITE os antígenos flagelares são assinalados da seguinte maneira: os da fase específica, com as letras maiúsculas a-b-c-d-e-f, etc.; e os da fase de grupo, com os números arábicos 1, 2, 3, 4, 5, etc.

TÉCNICA PARA A IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

Diferem um pouco as técnicas apresentadas pelos diversos pesquisadores nos seus trabalhos de classificação sorológica de salmonelas.

HORMAECHE, PELUFFO e ALEPPO (15) (1936) que muito têm estudado o assunto, seguem a técnica que passamos a resumir. Preparam soros "O" (somáticos) e soros "H" (flagelares), sendo que, dos primeiros, são necessários pelo menos um de cada grupo, preparados com culturas em caldo de 24 horas, aquecidas 2 horas a 100° e injetadas na veia de coelhos nas doses de 0,5 — 1 e 1,5 c. c. As culturas para o preparo destes soros devem ser lisas (S), comprovadas com a reação de PAMPANA (16), pela tripaflavina. Os soros flagelares são preparados com suspensões em água fisiológica, mortas pelo formol a 3%. Quando possível, recomendam usar tipos monofásicos, e os tipos difásicos apenas quando os antígenos desejados só aí se encontram, sendo preciso, neste caso, selecionar colônias da fase que interessa. Se isto não for possível, poderá ser usado o soro quando a diferença no título de uma fase para outra não for grande, ou ainda fazendo-se a absorção. Com soros assim obtidos HORMAECHE, PELUFFO e ALEPPO determinam em primeiro lugar, por uma reação de aglutinação rápida, a que grupo somático pertence a salmonela em estudo, para em seguida submetê-la a aglutinações flagelares com os soros preparados com os antígenos flagelares desse grupo.

Como acabamos de ver, HORMAECHE, PELUFFO e ALEPPO determinam primeiro a estrutura do antígeno "O" — processo preferido por KAUFFMANN — que tem a vantagem de situar a salmonela em estudo nos subgrupos indicados no esquema de KAUFFMANN-WHITE, facilitando, em seguida, a pesquisa do antígeno "H".

Entre muitas outras técnicas empregadas na identificação sorológica das salmonelas, podemos descrever a de SMITH (17) (1934).

SMITH submete a salmonela em estudo a uma aglutinação preliminar, com os seguintes soros: 1) *S. schottmuelleri* "H"

(específico); 2) **S. cholera suis** — variedade de **kunzendorf** “H” (grupo); 3) soro polivalente para todas as raças monofásicas 4) soro polivalente para todas as difásicas, e 5) soro polivalente para todos os antígenos “O” que caracterizam os subgrupos. Essas aglutinações preliminares poderão determinar se o organismo está na fase específica, se é um verdadeiro paratífico B, e ainda se monofásico ou difásico. Em seguida é que é feita a determinação exata do tipo.

Para isto faz aglutinações com os soros “O”. Quando a aglutinação é positiva, próxima ao título de um soro, são feitas absorções. Se o organismo em exame absorver as aglutininas “O” desse soro, fica identificado o grupo “O” a que ele pertence. Sendo o organismo aparentemente monofásico o antígeno “H” é preparado pelo processo comum; se difásico, e na fase de grupo, muitas colônias deverão ser submetidas à ação do soro **S. cholera-suis** var. **kunzendorf**. No caso de falhar este processo para a obtenção da fase específica, emprega o método descrito por SCOTT (18). Obtido o antígeno “H” específico, são feitas aglutinações com os soros “H” dos organismos pertencentes ao grupo “O” no qual a bactéria em estudo foi anteriormente colocada. Esta determinação ainda deverá ser confirmada por absorções. É seguindo essa técnica que SMITH identifica os antígenos “H” e “O” de uma salmonela para obter a sua classificação.

Há também pesquisadores que preparam os soros diagnósticos injetando em coelhos cultura lisa, viva, obtendo soro com as aglutininas “O” e “H”. Com estes soros procedem à identificação desses antígenos fazendo aglutinações com os antígenos “O” preparados pelo álcool e “H” em cultura formolada do organismo em estudo. No fim, sempre as absorções indispensáveis.

Sabe-se que um soro preparado com uma cultura “stock” pode conter principalmente aglutininas de grupo, ou principalmente aglutininas específicas, de acordo com a predominância de um ou outro antígeno na cultura que, como acima vimos, nos estudos de ANDREWES, apresenta fases misturadas. Soros assim preparados podem, portanto, não servir para a pesquisa dos antígenos “O” e “H”. É preciso, antes, verificar se tais soros de fato apresentam esses anticorpos “O” e “H” e preferivelmente usá-los após absorções do anticorpo que não estiver sendo pesquisado. De outro lado, também, convém lembrar que mesmo soros aglutinantes preparados pela técnica aconselhada, com cultura em pura fase específica, podem apresentar fracas aglutininas de grupo; assim como os preparados com pura fase de grupo, também podem revelar baixas aglutininas específicas.

Damos a seguir dois quadros, um do esquema das salmonelas publicado no “Manual of Determinative Bacteriology” de BERGEY (10) (1939) e outro, do mesmo Manual, dos caracteres sorológicos de espécies adicionais estudadas por KAUFFMANN.

CARACTERES SOROLÓGICOS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE SALMONELAS

Grupo	N. na chave	ESPÉCIES	Antígeno O	Antígeno H		
				Fase específica		Fase não específica
				α-Fase	β-Fase	
A	36	<i>Salmonella paratyphi</i>	I,II	a	—	—
	34	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Senftenberg)	I,III,XIX	gst	—	—
	3	<i>Salmonella</i> sp. (var. de Newcastle) (tipo Senftenberg)	I,III	gs	—	—
B	4	<i>Salmonella schottmuelleri</i>	IV,V,XII	b	—	1,2
	5	<i>Salmonella typhimurium</i>	IV,V,XII	i	—	1,2,3
	5a	<i>Salmonella typhimurium</i> (variedade Binns)	IV,XII	i	—	1,2,3
	6	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Heidelberg)	IV,V,XII	r	—	1,2,3
	29	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Stanley)	IV,V,XII	d	—	1,2
	7	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Reading)	IV,XII	eh	—	1,4,5
	8	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Derby)	IV,XII	fg	—	—
	30	<i>Salmonella abortusovis</i>	IV,XII	—	enx	—
	31	<i>Salmonella abortusovis</i>	IV,XII	c	—	1,4,6
	35	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Brandenburg)	IV,XII	lv	en	—
18	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Bispebjerg)	IV,XII	a	enx	—	
C	9	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Thompson)	VI,VII	k	—	1,3,4,5
	9a	<i>Salmonella</i> sp. (var. de Berlim) (tipo Thompson)	VI,VII	—	—	1,3,4,5
	10	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Virchow)	VI,VII	r	—	1,2,3
	11	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Potsdam)	VI,VII	lv	en	—
	12	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Bareilly)	VI,VII	y	—	1,3,4,5
	21	<i>Salmonella hirschfeldii</i>	VI,VII	c	—	1,4,5
	1	<i>Salmonella choleraesuis</i>	VI,VII	c	—	1,3,4,5
	1a	<i>Salmonella choleraesuis</i> (var. de Kunzendorf)	VI,VII	—	—	1,3,4,5
	2	<i>Salmonella typhisuis</i>	VI,VII	c	—	1,3,4,5
	2a	<i>Salmonella typhisuis</i> (variedade Voldagsen)	VI,VII	—	—	1,3,4,5
	19	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Oslo)	VI,VII	a	enx	—
	32	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Oranienburg)	VI,VII	mt	—	—
	14	<i>Salmonella morbificans</i>	VI,VIII	r	—	1,3,4,5
	15	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Muenchen)	VI,VIII	d	—	1,2
	33	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Newport)	VI,VIII	eh	—	1,2,3
13	<i>Salmonella</i> sp. (variedade de Kottbus) (tipo Newport)	VI,VIII	eh	—	1,3,4,5	
33a	<i>Salmonella</i> sp. (var. de Porto Rico) (tipo Newport) ..	VI,VIII	—	—	1,2,3	
D	22	<i>Eberthella typhosa</i>	IX,XII	d	j	—
	22a	<i>Salmonella enteritidis</i>	IX,XII	gom	—	—
	22a	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade Danysz)	IX,XII	gom	—	—
	22b	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade do Chaco)	IX,XII	gom	—	—
	22c	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade de Essen)	IX,XII	gom	—	—
	22d	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade de Dublin)	IX,XII	gp	—	—
	22e	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade de Moscow)	IX,XII	goq	—	—
	22f	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade de Blegdam)	IX,XII	gomq	—	—
	22g	<i>Salmonella enteritidis</i> (variedade de Rostock)	IX,XII	gpu	—	—
	23	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Dar-es-salaam)	IX,XII	lw	en	—
	24	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Eastbourne)	IX,XII	eh	—	1,3,4,5
	25	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Panamá)	IX,XII	lv	—	1,3,4,5
	37	<i>Salmonella pullorum</i>	IX,XII	—	—	—
	<i>Shigella gallinarum</i>	IX,XII	—	—	—	
	<i>Shigella gallinarum</i> (variedade de Duisburg)	IX,XII	—	—	—	
	<i>Eberthella</i> sp. (tipo Sendai)	IX,XII	a	—	1,4,5	
E	16	<i>Salmonella</i> sp. (tipo London)	III,X	lv	—	1,4,6
	26	<i>Salmonella anatis</i>	III,X	eh	—	1,4,6
	17	<i>Salmonella anatis</i> (variedade de Muenster)	III,X	eh	—	1,4,6
F	27	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Aberdeen)	XI	i	—	1,2,3
G	28	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Poona)	XIII	z	—	1,4,6
I	20	<i>Salmonella</i> sp. (tipo Hvitvingfoss)	XVI	b	enx	—

CARACTERES SOROLÓGICOS DE ESPÉCIES ADICIONAIS E VARIEDADES DE SALMONELAS
 DISCUTIDAS POR KAUFFMANN
 (ZTSCHR. F. HYG., 120, 1937, 194)

ESPÉCIES	Antígeno O	Antígeno H		
		Fase específica		Fase não específica
		α-Fase	β-Fase	
<i>Salmonella</i> sp. (Chester type)	IV. (V)	e, h	e, n, x	—
<i>Salmonella abortusovis</i>	I. IV +	b	e, n, x	—
<i>Salmonella</i> sp. (Bredeney type)	I. IV +	l, v	—	1,7 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Schleissheim type)	IV +	b	z5....	—
<i>Salmonella</i> sp. (Montevideo type)	VI. VII	g, m, s...	—	—
<i>Salmonella</i> sp. (Amersfoort type)	VI. VII	d	e, n, x	—
<i>Salmonella</i> sp. (Berta type)	IX	f, g, t...	—	—
<i>Salmonella</i> sp. (Give type)	III. X	l, v	—	1,7 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Neyborg type)	III. X	e, h	—	1,7 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Newington type)	III. XV	e, h	—	1,6 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Selandia type)	III. XV	e, h	—	1,7 ...
<i>Salmonella</i> sp. (New Brunswick type)	III. XV	l, v	—	1,7 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Onderstepoort type)	XIV	e...	—	1,5 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Gaminara type)	XVI	d	—	1,7 ...
<i>Salmonella</i> sp. (Kirkee type)	XVII	b	—	1,2 ...

ESTUDO DA RAÇA ISOLADA

A raça que estudamos foi isolada das fezes de um adulto (V. F.) que apresentava ligeiros vômitos, diarréia sem sangue, febre, cefaléia e dores abdominais.

1.º — **Caracteres morfológicos e colorabilidade** — Bacilos semelhantes aos do gênero **Salmonella**, Gram-negativos e moveis.

2.º — **Propriedades bioquímicas**:

a) — **Ação sobre os hidratos de carbono**:

Fermenta produzindo gás: glicose, manita, maltose, xilose, dulcita, inosita, arabinose, sorbita. Não fermenta: lactose e sacarose.

b) **Reações especiais**:

Ação sobre a gelatina — Não liquefaz.

Produção de hidrogênio sulfurado — Positiva.

Produção de indol — Negativa.

Produção de H₂S — Positiva.

Leite tornasolado — Acidez inicial seguida de alcalinidade.

3.º — **Estudo sorológico**:

a) **Determinação do antígeno somático**.

Da raça em estudo, que passaremos a denominar V. F., foram obtidas colônias lisas e submetidas à reação de PAMPANA pela tripaflavina a 0,2%.

Em seguida, essa raça, tratada pelo álcool, foi submetida à aglutinação de diversos soros representando os grupos de A a H e de outros soros de salmonelas mais recentemente classificadas por KAUFFMANN.

QUADRO I

Grupos	Soros imunes "O"	Preparados com:	Resultado das aglutinações (*) com a raça V. F. tratada pelo álcool
A	I — II	Salmonella paratyphi	0
	I — III — XIX	Salmonella senftenberg	0
B	IV — V — VII	Salmonella schottmuelleri	2.000
C	VI — VIII	Salmonella newport	0
D	IX — XII	Eberthelia typhosa	1.000
E	III — X	Salmonella anatis	0
F	IX X I	Salmonella aberdeen	0
G	XIII	Salmonella poona	0
H	XIV	Salmonella onderstepoort	100

No quadro I vemos o resultado da primeira experiência para classificação, tendo sido submetida a raça V. F. à aglutinação somática com 8 sôros somáticos representando os diversos grupos. Não dispunhamos, no momento, de sôro do grupo I (*) (fator somático XVI).

(*) As aglutinações dos quadros 1, 2, 3, 5 e 6 foram sempre feitas nos seguintes títulos: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.000, 1:1.500, 1:2.000, 1:3.000 e 1:4.000.

(*) A pesquisa do fator somático XVI foi feita no quadro 2.

Infere-se do quadro I que a raça V. F. apresenta antígenos somáticos para os grupos B e D, desprezando-se a baixa aglutinação para o grupo H.

Repetimos a experiência com maior número de soros, mas estes preparados com culturas vivas. Verificamos antes de usá-los que tinham os anticorpos "O" e "H" das raças com que foram preparados.

A raça V. F. foi submetida à aglutinação com esses séros, mas tratada pelo álcool (para a pesquisa do seu antígeno somático). Séros assim preparados não são muito recomendados nestas pesquisas, mas, como vemos no quadro 2, eles confirmaram a aglutinação feita com soros somáticos; houve aglutinação somática com os soros do grupo B — *S. schottmuelleri* representando os fatores antigênicos IV, V, VII, e *S. derby* representando os fatores IV, XII; e também com o soro somático do grupo D preparado com *E. typhosa*, com os fatores somáticos IX, XII. Com todos os outros soros o resultado foi negativo. Pode-se concluir destes dois quadros que a raça V. F. tem, no mínimo, um desses antígenos "O" que correspondem aos soros experimentados e que deram resultado positivo, devendo, portanto, classificar-se em um desses grupos B. ou D.

QUADRO 2

Grupos	Soros imunes preparados com	Antígenos "O" correspondentes	Resultado das aglutinações com a raça V. F. tratada pelo álcool
A	<i>Salmonella paratyphi</i>	I — II	0
	<i>Salmonella senftenberg</i>	I — III — XIX	0
B	<i>Salmonella schottmuelleri</i>	IV — V — XII	1.000
	<i>Salmonella derby</i>	IV — XII	2.000
C	<i>Salmonella thompson</i>	VI — VII	0
	<i>Salmonella newport</i>	VI — VIII	0
D	<i>Eberthella typhosa</i>	IX — XII	1.000
E	<i>Salmonella london</i>	III — X	0
F	<i>Salmonella aberdeen</i>	XI	0
G	<i>Salmonella poona</i>	XIII	0
H	<i>Salmonella onderstepoort</i>	XIV	0
	<i>Salmonella newington</i>	III — XV	0
	<i>Salmonella gaminara</i>	XVI	0
	<i>Salmonella kirkee</i>	XVII	0

Com a nossa raça V. F. preparámos um soro e fizemos novas pesquisas de antígenos somáticos, submetendo à aglutinação com este soro diversas salmonelas típicas representando os grupos somáticos, sendo esas tratadas pelo alcohol com o fim de serem revelados os anticorpos somáticos do soro **F. V.F.**

QUADRO 3

Grupos	Raças tratadas pelo alcohol	Antígeno "O" correspondente	Resultado das aglutinações com soro imune preparado com a raça V. F.
A	<i>Salmonella paratyphi</i>	I — II	0
B	<i>Salmonella schottmuelleri</i>	IV — V XII	1.000
	<i>Salmonella derby</i>	IV — XII	2.000
C	<i>Salmonella thompson</i>	VI — VII	0
	<i>Salmonella newport</i>	VI — VIII	0
D	<i>Eberthella typhosa</i>	IX — XII	1.000
E	<i>Salmonella london</i>	III — X	0
F	<i>Salmonella aberdeen</i>	XI	0
G	<i>Salmonella poona</i>	XIII	0
	<i>Salmonella newington</i>	III — XV	0
	<i>Salmonella gaminara</i>	XVI	0
	<i>Salmonella kirkee</i>	XVII	0
	<i>Salmonella berta</i>	IX	0

No quadro 3 vemos o resultado da aglutinação de um soro preparado com a raça V. F. sobre diversas salmonelas típicas tratadas pelo alcohol. O resultado desse quadro confirma o dos anteriores, deixando demonstrado que a raça V. F. apresenta uma constituição antigénica — com respeito ao antígeno "O" — a ser discutida entre as dos grupos B e D. Dos dois antígenos somáticos "IX" e "XII" que caracterizam e são apresentados por todas as salmonelas do grupo D, é de supor que a raça V. F. tenha o antígeno "XII", presente também nas duas salmonelas típicas do grupo B, experimentadas, mas que não tenha o antígeno somático "IX", do grupo D., porque, como vemos no quadro 3, o soro V. F. não aglutinou o antígeno de **S. berta** juntada propo-

sitalmente a este quadro por conter unicamente esse antígeno somático. Também, em outra prova que fizemos, V. F. não absorveu o fator "IX" de **S. berta**.

Portanto, a raça V. F. não pode ser incluída no grupo D, onde, como vemos no quadro do Manual de Bergey, do esquema das salmonelas de KAUFFMANN-WHITE, todas as espécies desse grupo apresentam o antígeno somático "IX". A aglutinação do antígeno "O" de **E. typhosa** correu por conta do seu antígeno "XII", também existente em todas as espécies do grupo **B**, sendo a este grupo que deve pertencer a raça em estudo.

Das espécies do grupo B, como se vê no quadro dos "Caracteres sorológicos das Salmonella", umas apresentam os antígenos somáticos "IV" e "XII", outras IV, V, XII, e a nossa raça em estudo foi aglutinada pelos soros somáticos representando essas duas constituições antigênicas.

Para se verificar se a raça V. F. tem o fator somático "V" fizemos absorção do soro imune V. F. pelo antígeno "O" de **S. derby** (IV, XII). Como vimos no quadro 2, esse soro, não absorvido, aglutinou o antígeno "O" de **S. schottmuelleri**, cuja constituição é IV, V, XII. Esta absorção retirará a esse soro os anticorpos para os antígenos IV, XII, e, se existir nele anticorpos para o antígeno "V", deverá ainda aglutinar **S. schottmuelleri** após essa absorção, o que se não dará no caso contrário. O resultado da aglutinação após essa absorção foi completamente negativo, o que demonstra a provável não existência do fator somático "V" na raça V. F. Ainda mais, esse soro que no quadro 3 vemos aglutinar o antígeno somático IV, XII, de **S. derby**, não mais o aglutinou após essa absorção, vindo confirmar a existência dos fatores somáticos "IV" e "XII". A existência do fator somático "IV", isoladamente, também ficou demonstrada pela experiência seguinte: o soro V. F. (IV, XII) foi absorvido por **E. typhosa** (IX, XII) devendo ficar apenas com anticorpos para o antígeno "IV", e devendo aglutinar as raças com antígeno "IX" e não aglutinar as que tiverem o fator "XII" e não tiverem o "IV". Como este soro assim absorvido foram feitas aglutinações somáticas com **S. schottmuelleri** (IV, V, XII), **S. derby** (IV, XII) e **E. typhosa** (IX, XII). Como vemos no quadro 4 as aglutinações de **S. schottmuelleri** e **S. derby** correm por conta da permanência no soro V. F. de anticorpos para o antígeno somático "IV", e a não aglutinação de **S. typhosa** por ter sido absorvido o antígeno "XII".

QUADRO 4

Soro V. F. (anticorpos somáticos prováveis IV, XII)		Soro V. F. (anticorpos somáticos prováveis IV, XII), absorvido por E. typhosa (antígenos somáticos IX, XII) permanecendo ativo anti-corpo IV	
Raças tratadas pelo álcool	Antígenos correspondentes	Raças tratadas pelo álcool	Antígenos somáticos correspondentes
	Resultado da aglutinação a 1:800		Resultado da aglutinação a 1:400
S. schottmuelleri	IV, V, XII	S. schottmuelleri	IV, V, XII
S. derby	IV, XII	S. derby	IV, XII
E. typhosa	IX, XII	E. typhosa	IX, XII
	+		+
	+		+
	+		—

Verificada a existência na nossa raça V. F. dos fatores “IV” e “XII” procuramos confirmar essa constituição antigênica somática pela absorção mútua entre essa raça e outra de constituição somática igual, e constatamos que ela absorveu completamente os anticorpos de um soro **S. derby** (IV, XII); e que, inversa-

mente, o antígeno somático de **S. derby** (IV, XII) absorveu os anticorpos somáticos do soro da raça V. F. (IV, XII), como se vê no quadro 5, donde se poderá deduzir que a composição anti-gênica somática da raça V. F. é idêntica à de **S. derby** (IV, XII), sendo classificada no grupo B com os antígenos somáticos IV, XI.

QUADRO 5

S O R O S	Antígenos somáticos ativos	Resultado da aglutinação com as seguintes raças tratadas pelo alcool	
		Salmonella derby	V. F.
Soro S. derby não absorvido	IV — XII	2.000	1.500
Soro S. derby absorvido por V. F.	(—)	0	0
Soro V. F. não absorvido	IV — XII	2.000	2.000
Soro V. F. absorvido por S. derby	(—)	0	0

b) Determinação do antígeno “H”.

A pesquisa do antígeno “H” já está limitada entre os das espécies do grupo B e, destas, entre as que apresentam o antígeno somático IV, XII: **S. typhimurium** var. **binns**, **S. reading**, **S. derby**, **S. abortivoequina**, **S. abortusovis**, **S. brandenburg** e **S. bispebjerg**. Além disso, a raça V. F. é monofásica, não tendo sido aglutinada por nenhuma das muitas colônias isoladas e submetidas ao soro “H” da **S. choleraesuis** var. de **kunzendorf**, raça monofásica, que só apresenta antígenos ciliares na fase não específica. Temos que procurar o antígeno “H” da nossa raça V. F. entre os das raças monofásicas do grupo B, que são as seguintes: **S. derby** (fg), **S. abortivoequina** (enx), **S. brandenburg** (lven) e (**S. bispebjerg** (aenx).

Nas experiências feitas com cultura formolada da raça V. F. com soros flagelares dessas raças monofásicas do grupo B, a aglutinação flagelar mostrou-se positiva até o título limite com o soro **S. derby** que apresenta os antígenos flagelar “fg”, não sendo aglutinada pelos outros.

Inversamente o mesmo resultado foi obtido na aglutinação com o soro flagelar da raça F. V. e essas salmonelas monofásicas formoladas, só aglutinando o antígeno “H” de **S. derby** (fg).

Na prova de absorção mútua, o antígeno flagelar da raça V. F. absorveu os anticorpos idênticos da **S. derby**; e o antígeno flagelar da **S. derby** também absorveu os anticorpos flagelares do soro V. F., como podemos ver no quadro 6.

QUADRO 6

Raças formoladas	Antígenos "H" correspondentes	Aglutinações com soro "H" de S. derby , não absorvido	Aglutinações com soro "H" de S. derby , absorvido por soro V. F.	Aglutinações com soro "H" de V. F., não absorvido	Aglutinações com soro "H" de V. F., absorvido por S. derby
S. derby	f g	3.000	0	3.000	0
V. F.	f g	3.000	0	3.000	0

Portanto, a raça V. F. apresentando a fórmula antigênica IV, XII: fg: —, pode ser identificada como **S. derby** que apresenta os mesmos antígenos "O" e "H".

A identificação da nossa raça V. F. foi muito facilitada pelo fato de se tratar de uma salmonela monofásica e com fatores antigênicos na fase específica.

DISCUSSÃO

Quando se estuda uma salmonela difásica, as pesquisas são muito mais complicadas. Temos que pegar colônias nas duas fases e com elas preparar suspensões, que serão submetidas à aglutinação com soros na fase não específica. As colônias que não aglutinarem ou aglutinarem fracamente estão na fase específica. Mas há casos em que todas as colônias são positivas com esse soro e, nesta circunstância, a) pode tratar-se de uma salmonela monofásica, na fase de grupo, como também, b) pode-se dar o caso de se não revelarem as colônias negativas onde se iria procurar o antígeno específico (fase específica), e neste caso, ter-se-ia que lançar mão de um artifício de técnica, como o fez SCOTT, no trabalho acima citado. SCOTT, nesse trabalho, chegou a examinar 200 colônias, apresentando-se todas na fase de grupo, parecendo tratar-se aparentemente de uma salmonela sem antígeno específico, monofásica. Mas as provas de aglutinação e de absorção revelavam à salmonela em estudo uma composição antigênica própria; e as salmonelas dos soros que a aglutinavam não absorviam completamente as aglutinações de um soro prepa-

rado com essa raça. Como não apareciam as colônias “específicas”, ocorreu a SCOTT que o desenvolvimento em excesso do antígeno de grupo em que se apresentava obstinadamente esta raça, poderia ser suprimido se ela fosse cultivada em presença de forte soro de grupo; e verificou que, após 3 passagens, 5 de 6 colônias pertenciam a uma nova fase, da qual já obtinha cultura pura na 5.^a passagem. Poude, então, demonstrar ser esta a fase específica da nova espécie que apresentou (*S. sp-tipo thompson*) e as primeiras colônias isoladas em fase não específica, a fase de grupo dessa salmonela.

Não poderemos dar aqui todos os percalços que surgem na identificação sorológica de uma salmonela.

O método sorológico de determinação de KAUFFMANN é, de fato, muito trabalhoso e exige o preparo prévio de um grande número de soros com os diversos anticorpos “O” e “H” indicados no esquema de KAUFFMANN-WHITE, sendo que, com referência à determinação do antígeno “H” são precisos soros nas fases específica e não específica. São ainda indispensáveis as provas de absorção ou saturação e de absorção cruzada (*mirror-test*), que exigem o preparo de soros com a raça em estudo.

Na verdade a classificação sorológica de uma espécie não requer o emprego de todos os soros, mas indiscutivelmente há que possuí-los todos porque só assim estaremos em condições de fazer uma identificação.

Acresce, ainda, que estão sendo sempre descobertos novos antígenos “O” e “H”, já existindo perto de 30 antígenos “O” e aproximando-se de 40 os “H”.

PACHECO e COSTA, (29), em recente comentário ao esquema de classificação das salmonelas de KAUFFMANN-WHITE, colocam-se ao lado dos que duvidam da praticabilidade desse método, assim se expressando: “Não queremos desmerecer o esforço de KAUFFMANN e dos que o precederam numa análise percutiente desse interessante grupo bacteriano em que se demonstrou a complexidade antigênica das bacterias; apenas achamos que a organização de um esquema de tão elevada complexidade exigente de elementos técnicos tão numerosos, não comporta uma aplicação prática na determinação de qualquer amostra de salmonela, senão em um serviço organizado como o de KAUFFMANN. Demais, um esquemas permitindo a existência de tantas espécies foge, a bem dizer, das realidades da vida, por se tornar dificilmente praticável”.

PACHECO e COSTA acham que a análise de todos os constituintes antigênicos jogaria com fatores que numa serie de com-

binações (segundo o seu raciocínio) permitiria um número de tipos que dificilmente poderia ser medido.

De fato, a aplicação do esquema de KAUFFMANN-WHITE não se generalizou devido à complexidade de sua técnica.

E' verdade que já estão aparecendo trabalhos de identificação com técnicas muito simplificadas, mas que apenas servem para um serviço de rotina.

Na classificação sorológica da nossa raça V. F. seguimos uma técnica que nos permitiu identificá-la como **S. derby**, com a fórmula antigênica IV, XII: fg: —. Acreditamos que as diversas provas feitas e principalmente as de saturação cruzada, não deixaram dúvida sobre a existência dos fatores antigênicos que lhe atribuímos.

Seria também uma boa técnica recorrer a soros somáticos e flageladores para um só dos fatores antigênicos revelados nas aglutinações preliminares, como muitos preferem. Neste caso, para a confirmação dos fatores somáticos teríamos que submeter o antígeno somático da raça V. F. a soros assim obtidos:

Para o fator IV — Soro **S. derby** (IV, XII) absorvido com **S. enteritidis** (IX, XII).

Para o fator XII — Soro **S. enteritidis** (IX, XII) absorvido com **S. berta** (IX).

Para a verificação do antígeno ciliar, também os soros monovalentes para os fatores "f" e "g" poderiam ser preparados da seguinte maneira:

Para o fator "f" — Soro **S. derby** (fg) absorvido com **S. enteritidis** (gom).

Para o fator "g" — Soro **S. dublin** (gp).

Neste caso precisaria um controle, como indicam HORMAECHE, PELUFFO e SALSAMENDI (25): soro **S. dublin** (gp) absorvido por **S. enteritidis** (gom), isto é, soro aglutinado "p". Sendo positiva a aglutinação com o primeiro soro e negativa com o segundo, pode-se concluir ser devida ao fator "g".

R E S U M O

Na primeira parte foram feitas considerações gerais sobre a estrutura antigênica das salmonelas, acompanhando o desenvolvimento desses estudos até o acordo em que resultou a apresentação do esquema de KAUFFMANN-WHITE.

Na segunda parte foram apresentadas algumas técnicas adotadas em trabalhos de classificação sorológica de salmonelas em que se vê seguir cada autor processos diferentes, mas que praticamente chegam a resultado satisfatório, embora uns mais perfeitos que outros.

Em seguida há o estudo de uma salmonela isolada das fezes de um adulto (V. F.) que apresentava alguns vômitos, diarréia sem sangue, cefaléia, dores abdominais e ligeira febre.

Após um rápido exame dos cartectéres morfológicos e bioquímicos julgados suficientes para situar a bactéria isolada no gênero **Salmonella**, foi feito o seu estudo sorológico, que revelou a presença dos fatores somáticos IV, XII, e dos ciliares fg na fase específica.

Após diversas provas de aglutinação, de absorção e de absorção mútua, ficou confirmado tratar-se de uma salmonela monofásica, com a fórmula antigênica IV, XII: fg: —; sendo esta a constituição antigênica da **Salmonella derby** de acordo com o esquema de KAUFFMANN-WHITE, a raça V. F. fica assim identificada.

Na parte final há uma ligeira discussão sobre a praticabilidade do método sorológico de determinação de KAUFFMANN e alguns comentários sobre a identificação que foi feita neste trabalho.

SUMMARY

The first part presents general considerations on the antigenic structure of the salmonellas, carrying these studies up to the agreement of which resulted the Kauffmann-White scheme.

The second part describes the technique used in certain studies on the serological classification of the Salmonellas. This shows that each author uses its own process but that practically, the results are more or less satisfactory.

There follows a study on a salmonella isolated from an adult's stools (V. F.); the patient had some vomiting, bloodless diarrhoea, headache, abdominal pain and slight fever.

After a short review of the morfologic and biochemical characteristics considered sufficient to place the germ observed in the genus Salmonella, its sorological study revealed the presence of somatic factors "IV" and "XII" and the ciliary "fg" factor in the specific phase. No factors were observed in the non specific phase.

After several agglutination, absorbtion and mutual absorbtion tests it became evident that the organism was a monophasic salmonella with an antigenic formula equal to IV.XII: fg: — which expresses the antigenic constitution of **Salmonella derby** in accordance to the Kauffmann-White scheme, thus identifying race V. F..

The final section covers a brief discussion on the practical application of the Kauffmann determination and some comments on the identification done in this study.

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Arkwright, J. A.** — Variation in Bacteria in relation to Agglutinator both by Salts and by specific Serum. *J. Path. and Bact.* 1921 V 24, pgs. 36-60.
- 2) **White, P. B.** Further Studies of the Salmonella Group. *Med. Res Council. Spec. Rep.* 1926, n. 103, pág. 330.
- 3) **Smith, T. e Reagh, A. L.** — The non-identity of agglutinins acting upon the flagella and upon the body of bacteria. *J. Med. Res.* 1903. V. 10, págs. 89-100.
- 4) **Beyer, H. G. e Reagh, A. L.** — The further differentiation of flagellar and somatic agglutinins. *J. Med. Res.* 1904, V. 12, págs. 313-28.
- 5) **Schütze, H.** — The paratyphoid B group. *The Lancet.* 1920. V. 198, págs. 93-7.
- 6) **Schütze, H.** — The permanence of the serological paratyphoid B types, with observations on the non-specificity of agglutination with "Rough" variants. *The Jour. of Hyg.* 1921. V. 20, págs. 330-341.
- 7) **White, B.** — A System of Bacteriology in Relation to Medicine, 1929, V. IV. Capitulo II sobre "The Salmonella Group".
- 8) **Kauffmann, F.** — Das Vorkommen von Paratyphus Newport-Bacillen in Deutschland. *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.* 1929. V. 110, págs. 161-8.
- 9) **Kauffmann, F.** — Die Serologie des Paratyphus Breslau-Bacillus. *Ibd.* págs. 526-36.
- 10) **Kauffmann, F.** — Der typus "Berlin" der Paratyphus C-Gruppe. *Ibd.* págs. 537-55.
- 11) **Kauffmann, F.** — Die Technik der Typenbestimmung in der Typhus-Paratyphus-Cruppe. *Cent. f. Bakt.* 1930, V. 119, págs. 152-60.
- 12) **Salmonella Subcommittee** — *The Jour. of Hyg.* 1934. V. 34, págs. 333-50.
- 13) **Orcutt, M. L.** — Flagellar agglutinins. *J. Exp. Med.* 1924. V. 40, págs. 43-9.
- 14) **Andrewes, F. W.** — Studies in group agglutination. I — The Salmonella Group and its antigenic structure. *Jour. Path. and Bact.* 1922. V. 25, págs. 505-21.

- 15) **Hormaeche, E., Peluffo, C. A. e Aleppo, P. L.** — Nueva contribution al estudio de las "diarreas infantiles de verano" — Las salmonellas en las enterocolites de la infancia. Archivos Uruguayos de Medicina, Cirurgia y Especialidades. 1936. V. 9, págs. 113-174.
- 16) **Pampana, E. J.** — Microbic dissociation detection of the "R" variant by means of a specific drop agglutination. The Jour. of Hyg. V. 33, pág. 402.
- 17) **Smith, J.** — Sporadic Salmonella infections: a new Salmonella type. The jour. of Hyg. 1934 — V. 34, págs. 357-360.
- 18) **Scott, W. M.** — The "Thompson" type of Salmonella. The Jour. of Hyg. 1926 V. 25, págs. 398-405.
- 19) **Bergey, D. H.** — Manual of Determinative Bacteriology — Fifth Edition — 1939.
- 20) **Pacheco, G. e Costa, G. A.** — Comentários ao esquema de classificação das Salmonellas de Kauffmann-White. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1940 — T. 35, págs. 365-374.
- 21) **Hormaeche, E., Peluffo, C. A. e Salamendi, R.** — Un nuevo tipo de género Salmonella: "S. Berta". Archivos Uruguayos de Med., Cir. y Especialidades. 1938. T. XII. N. 4., págs. 377-388.