

MEMBROS MANITA-INDOL-NEGATIVOS DO GÊNERO *SHIGELLA* (*)

BRUNO RANGEL PESTANA

Chefe de Subdivisão do Instituto Adolfo Lutz

LÚCIA DE QUEIRÓS TELLES

Biologista do Instituto Adolfo Lutz

E' a presente publicação resultado de investigações iniciadas em fevereiro de 1937 e, por razões diversas, independentes de nossa vontade, freqüentemente interrompidas, mesmo por anos, até esta data.

Verificávamos as amostras de *S. dysenteriae* existentes no Instituto Bacteriológico posteriormente reunido ao Laboratório Bromatológico do Estado e constituindo o atual Instituto Adolfo Lutz. Algumas de isolamento relativamente recente, outras muito antigas. Despertou-nos a atenção seu comportamento em caldo com nitrato e em rafinose, adonita e arabinose ensaiadas em meio semi-sólido de Hiss preparado com infusão de carne isenta de açúcar. E' que o já então muito conhecido e consultado manual de Bergey estabelecia, em suas últimas edições (1930, 1934), que *S. dysenteriae* ataca rafinose e adonita, com produção de ácido, não reduz nitrato e não altera arabinose. Obtínhamos resultados exatamente inversos em rafinose, adonita e nitrato, êste pesquisado segundo o manual da Society of American Bacteriologists (1936), e irregulares em arabinose, sendo nos casos positivos geralmente tardia a acidificação.

Ocorreu-nos reverificar essas 23 amostras; salvo uma, procedente de Paris, haviam sido isoladas e, dada a urgência de diagnóstico, sujeitas, na Secção de Disenteria, apenas às provas diferenciais básicas e indispensáveis segundo o critério então prevalecente para identificação. Algumas anotadas como inaglutináveis em sôro anti-Shiga. Reisolando-as, em junho de 1937, procedemos ao seu estudo quanto a caracteres morfológicos e tintoriais, motilidade, crescimento em gelose e em caldo, redução de nitrato, reações de Voges-Pro-

(*) Recebido para publicação em abril de 1947.

kauer e de vermelho metila, produção de indol, comportamento em gelatina, leite tornassolado e nos seguintes carboidratos, poliálcoois e glicósides verificados no meio de Hiss já citado: adonita, arabinose, dextrose, dulcita, galactose, glicerina, inosita, inulina, isodulcita, lactose, levulose, maltose, manita, manose, rafinose, sacarose, salicina, sorbita e xilose. Nova surpresa: os exemplares que atacavam arabinose e que eram os mesmos da 1.^a observação também atacavam sorbita, em geral tardiamente. Bergey não fazia referência a sorbita e não se incluíam este poliálcool e arabinose nas provas de fermentação habitualmente usadas nos laboratórios para identificação do gênero *Shigella*. Nitrato, rafinose e adonita confirmaram nosso resultado anterior. Em caldo uniforme turvação, ou limpidez e considerável sedimento, diferenças certamente condicionadas à variação S-R. Sacarose, dada como negativa por Bergey, revelava fermentação, por algumas amostras, em 5-10 dias. Maltose idem; esta positiva na 2.^a edição de Bergey (1925) e negativa nas duas posteriores (1930, 1934). As demais provas concordes com o seu manual. Inosita, inulina, galactose, manose e reação do vermelho metila, não citadas ali, foram negativas as duas primeiras e positivas as restantes.

Em setembro de 1937 repetimos somente as provas de fermentação substituindo o ácido rosólico usado rotineiramente no meio de Hiss pelo vermelho de fenol, indicador que nos parecia fornecer mais precisos resultados. Confirmação das anteriores observações, com fermentações mais nítidas, conforme prevíamos.

Afastada a hipótese, a princípio aceita, de ocasional fermentação de arabinose e de sorbita, interessou-nos a investigação sorológica. Procuramos obter amostras de *S. dysenteriae* bem recentemente isoladas na expectativa de encontro de fermentadoras de arabinose e de sorbita, o que eliminaria a suspeita de correr tal comportamento por conta de cultivo artificial; também algumas de estabelecimentos de renome, embora antigas, para estudo comparativo. Conseguimos oito, das quais: três, recentes, da Secção de Disenteria, sendo uma inaglutinável; uma também recentemente isolada por Luís de Sales Gomes e inaglutinável; uma do Instituto Osvaldo Cruz, Manguinhos; uma da Faculdade de Medicina; uma do Instituto Butantã; uma da National Collection of Type Cultures, recebida dos Laboratórios Raul Leite por gentileza de Henrique Figueiredo de Vasconcelos. As quatro últimas já antigas em laboratório.

Entretanto, só em novembro de 1939 nos foi possível reencetar o trabalho e, então, as quatro primeiras amostras há pouco citadas como recentes contavam meses de cultivo artificial. Nessa verificação das novas amostras incluímos as antigas por havermos substituído, para provas fermentativas, os produtos pelos de Pfansstiehl salvo, por não disponível, glicerina (era de Wyman); acrescentado meio de Simmons, recente solução peptonada de Myers com papel impregnado de acetato de chumbo e empregado as duas variedades óticas de arabinose: *l* e *d* já notadas, por Russo (1939), comportarem-se diversamente com espécies do gênero *Pasteurella*; o restante como de início. Resultados: H₂S praticamente ausente; utilização de citrato negativa; *d*-arabinose negativa e *l*-arabinose concorde com as verificações anteriores; os demais não divergiram dos já obtidos.

Já existia, no momento, a 5.^a edição do manual de Bergey (1939), ainda hoje a mais recente. Consigna redução de nitrato pela *S. dysenteriae*, coincidindo com o que observáramos. Mantém rafinose e adonita positivas, arabinose negativa.

Separamos, bioquimicamente, em dois grupos nossas amostras que, convém frisar, jamais produziram bôlhas de gás quer em dextrose, quer em dulcita:

Grupo I — *l*-arabinose e sorbita negativas (24 amostras).

Grupo II — *l*-arabinose e sorbita positivas (7 amostras).

Designamos Grupo I e Grupo II unicamente para facilidade de exposição; esta deve ser a interpretação no decorrer dêste trabalho.

Para preliminares provas de aglutinação e de absorção cruzadas imunizamos coelhos com duas amostras de cada grupo que nos pareceram, em rápido exame, formas S. A diferenciação bioquímica foi confirmada sorològicamente.

Estaríamos em presença de entidades biológicas distintas, correspondendo as novas formas a tipo diferente e certamente incluído, na literatura, entre os "Shigas inaglutináveis" assim conhecidos por se comportarem como *S. dysenteriae* nas provas bioquímicas rotineiramente usadas para identificação desta espécie? Ou seria a variação S-R responsável pela inaglutinabilidade recíproca entre os nossos dois grupos? Propensos a admitir a primeira hipótese em razão da coincidência entre diferenças fermentativas e sorològicas e porque a literatura sempre afirmou não

divergirem as formas S e R em propriedades fermentativas, impressionava-nos, entretanto, a reserva com que se recebiam publicações registrando o isolamento de germes disentéricos culturalmente idênticos ao de Shiga mas inaglutináveis por sôro anti-Shiga, embora as endossassem, muitas vêzes, assinaturas, por tôdas as razões, respeitáveis e fortemente sugestivas fôssem as circunstâncias relatadas.

Thomson e Mackie (1917) citam casos de disenteria no Egito. Isolaram bacilos Shiga, Flexner e alguns atípicos dos quais um não fermentador de manita, com caracteres culturais de bacilo Shiga e considerado provável variante inaglutinável do tipo clássico.

Dudgeon (1929) faz referência ao "B. para-Shiga —" descrito por Dudgeon e Urquhart (1919). Isolado de 11 pacientes das Fôrças Britânicas, na Macedônia, durante a primeira guerra mundial. Casos de disenteria. Germe culturalmente idêntico ao de Shiga, sem comunidade antigênica com êle e muito menos tóxico. Assim denominado por não dar indol, em oposição ao "B. para-Shiga +", indol-positivo e não objeto de nosso trabalho.

Riding (1931) relata casos de infecção que considera interessante divulgar em vista da divergência de opiniões, no momento, quanto ao papel desempenhado pelos "B. para-Shiga" na etiologia da disenteria humana. Isolou de 4 soldados britânicos chegados a Karthoum "B. para-Shiga (indol —)" e de 2 nativos sudaneses "B. para-Shiga (indol +)". Casos de disenteria aguda. Não conseguiu germes disentéricos além dêsses. Provas de aglutinação revelaram serem as amostras de "B. para-Shiga (indol —)" sorolôgicamente distintas das de "B. para-Shiga (indol +)" e de bacilo Shiga e constituírem grupo homólogo.

Hazen (1938) descreve germe isolado de 9 amostras de fezes de crianças atacadas de disenteria em colônia de férias mantida para crianças de New York City supondo-o, por culturalmente semelhante ao bacilo Shiga e sorolôgicamente diverso, idêntico ao "B. para-Shiga —" de Dudgeon e Urquhart.

Grichener (1938) cita doentes seus de cujas fezes se isolaram germes disentéricos, no Instituto Bacteriológico de Buenos-Aires; de um, caso grave de disenteria, "bacilo para-Shiga negativo" conforme resultado assinado por Uriarte-Sosa.

Hormaeche e Surraco (1938), referindo-se aos tipos e frequência de *Shigella* no Uruguai, mencionam o encontro de amostra com caracteres bioquímicos de bacilo Shiga e inaglutinável por

soros antidisentéricos. Julga-a corresponder ao "para-Shiga" de Dudgeon e Urquhart mas não lhe garante a identidade por não dispor de amostra dêste tipo. Diz dar aglutinação cruzada com a amostra Andrada, isolada por Sosa, em Buenos-Aires, bioquimicamente igual e, portanto, parecer do mesmo tipo; que ambas procedem de casos disentéricos e que a sua não revela, para coelho, a toxicidade do bacilo Shiga razão porque crê não serem essas amostras variantes não aglutináveis do tipo Shiga, mas espécie distinta.

Desconhecíamos, na ocasião, outras publicações sôbre germes que se assemelhassem aos nossos. Nenhuma das citadas acima fazia referência a arabinose e sorbita.

Novamente interrompidas nossas investigações em janeiro de 1940, pudemos prosseguí-las em dezembro do mesmo ano. Já então dispúnhamos da amostra Andrada, de Sosa. Suspeitando serem ao menos alguns dos "Shigas inaglutináveis" registrados idênticos e também aos nossos havíamos recorrido a Hormaeché no sentido de obter, além de outras amostras que no momento nos interessavam, o provável "para-Shiga" por êle e Surraco isolado e que, com o de Sosa, eram os primeiros sul-americanos de que tínhamos conhecimento. Na impossibilidade de nos enviar o seu cedeu-nos, gentileza que muito agradecemos, o de Sosa que considerava idêntico.

Nessa época soubemos, por Coleman (1940), da aglutinação do germe de Hazen por sôro anti-Newcastle. Logo após lemos, em Mayfield e Gober (1941), o isolamento, em Mississipi, de 13 amostras de *Shigella* "sorbita-positiva", tipo não classificado, negativo em manita e atacando sorbita em 3-8 dias. Tôdas aglutinavam-se por sôro imune preparado com uma delas isolada de doente com sintomas clínicos de disenteria. Ausência de aglutinação com soros anti-Shiga e anti-Newcastle.

Estabelecida a identidade morfológica e bioquímica entre Andrada e as amostras componentes do Grupo II e verificado serem tôdas inaglutináveis por sôro anti-Newcastle, tínhamos, entretanto, a atenção voltada para a rugosidade de algumas. Propusemo-nos a selecionar, quanto possível, formas S e com elas preparar soros imunes para provas mais amplas de aglutinação e de absorção. Trabalho de reconhecida lentidão aumentada por novas interrupções de nossas pesquisas; suspensas em janeiro de 1941 só as retomamos em novembro de 1943. Nesse intervalo recorreremos a Carvalho Lima no sentido de obter de Sordelli, então diretor do Instituto Bacteriológico do Departamento Nacional de Higiene, em Buenos-

Aires, onde trabalhava Sosa, informações sôbre a publicação do isolamento de Andrada a que se referem Hormaeche e Surraco e da qual por êstes nos fôra cedida subcultura. Respondendo à carta de Carvalho Lima, de 29-1-1942, muito gentilmente Sordelli anexou a atenciosa informação de Sosa. Diz ter isolado a amostra em 1933, de caso de disenteria; designou-a Andrada e a considerou "Para-Shiga —" por seus caracteres bioquímicos. Esperando obter a amostra tipo para completar, com o estudo sorológico, a classificação da sua, atrasou a publicação; convencido, entretanto, de que não fôra conservada, achava que a faria sem êsse requisito. Informa, também, haver cedido sua amostra a Hormaeche para confrontá-la com a posteriormente encontrada, por êste, em Montevidéu e que se mostrou idêntica.

Parece-nos Andrada outra amostra isolada por Sosa além da registrada por Grichener pois êste cita como data de isolamento 1936 e não 1933 como informa Sosa. Além disso, não mostram relação com a designação Andrada as iniciais do doente de Grichener: F. S., nem seu domicílio: Palacios, Santa Fé.

Em fins de 1943 obtivemos de Carvalho Lima exemplar isolado de caso de disenteria e que comparado com os do Grupo II dêles não se afastava. Pouco depois, ainda no mesmo ano, sabendo de caso disentérico típico na família de uma de nossas auxiliares e que o germe isolado na subsecção competente dêste Instituto se comportava como bacilo Shiga inaglutinável interessou-nos conseguí-lo, tanto mais que se tratava de isolamento recentíssimo. Recorremos a Taunay, responsável pela subsecção; somos gratos à sua amabilidade cedendo-nos não só essa amostra, M. E. F., mas, ainda, uma outra, D. J. R., também bacilo Shiga inaglutinável, isolada quase ao mesmo tempo. Ambas, conforme esperávamos, se localizaram, por seu comportamento, no Grupo II.

Já em fase adiantada de nossas investigações, em abril de 1944, víamos, de um lado, a influência da rugosidade de culturas nas provas sorológicas refletindo, talvez, no registro de alguns "Shigas inaglutináveis"; de outro, germes disentéricos de interesse em patologia humana, manita-indol-negativos, semelhantes à *S. dysenteriae* nas provas bioquímicas rotineiras e completamente diferentes dela sorologicamente e também de *Shigella sp.* (tipo Newcastle) e que, considerados membros atípicos da 1.^a espécie e, então, figurando nos resultados como *S. dysenteriae* ocasionavam

falhas da soroterapia específica e conclusões indevidas de sua ineficácia porque levavam à aplicação de sôro anti-Shiga. Esta a face a que atribuíamos maior importância em nossas pesquisas.

Insistíamos, ainda, na obtenção de formas S de algumas amostras então R do Grupo II, inclusive Andrada, para término de nossas observações quando necessidades de serviço nos impuseram, novamente, suspendê-las até maio de 1946. Assim se justifica, por uma série de interrupções, a morosidade desta publicação.

Começavam a surgir mais alusões a germes semelhantes.

Coleman (1943) registra a ocorrência, nos Estados- Unidos, de germes bioquimicamente idênticos ao bacilo Shiga e a algumas amostras de bacilo Newcastle, aglutináveis por sôro imune preparado com amostra idêntica recebida de Mississipi (deve ser do tipo descrito por Mayfield e Gober a que já nos referimos) e não por soros anti-Shiga e anti-Newcastle.

Silva (1943) tenta, em Portugal, a classificação sorológica de bacilos disentéricos isolados em 1941, em Lisboa, durante surto epidêmico, conforme publicação de Fonseca *et al.* (1941) que não conseguimos consultar. Figuram 1 DA e 17 DB distintos do bacilo Shiga por atacarem sorbita; Silva verifica serem inaglutináveis por soros antidisentéricos e aglutinarem-se reciprocamente.

Parece-nos, assim, que a primeira referência a sorbita se faz, independentemente, por Mayfield e Gober, em Mississipi, e por Fonseca *et al.*, em Lisboa.

Gober, Stacy e Woodrow (1944) descrevem, como tipo provavelmente novo de *Shigella* não fermentadora de manita e indol-negativa, 47 amostras sorbita-positivas em 4-6 dias. Inaglutináveis por soros antidisentéricos. Antigênicamente homogêneas: sôro imune preparado com uma delas, 8524, aglutinava tôdas. Dizem não as haverem comparado com os tipos de Sachs e que Mayfield e Gober as incluíram no gênero *Shigella*, em 1941, como espécie não classificada, fermentando sorbita. São os exemplares registrados em Mississipi.

Christensen e Gowen (1944) apresentam como *S. arabinotarda nov. spec.* 15 amostras isoladas em Tunísia, África do Norte. Casos de disenteria. Caracteres morfológicos e bioquímicos indistinguíveis dos de *S. dysenteriae* salvo lenta fermentação de arabinose pela nova espécie dividida, antigênicamente, em dois tipos, A e B, correlatos com o prazo de fermentação: A, 2-5 dias; B, 7-25. Ambos

negativos em provas de aglutinação e de absorção com soros anti *dysenteriae*, *ambigua*, *paradysenteriae* e *sonnei*. De passagem citam fermentação de sorbita, em 3-5 dias, embora não a incluam quer no quadro das reações culturais, quer no sumário.

No 1.º Congresso da Confederação de Sociedades Sul-americanas de Pediatria reunido, em 1944, em Santiago, Chile, Canessa e Garces (1945) analisam a distribuição de germes dos gêneros *Shigella* e *Salmonella*, segundo exames praticados no Instituto Bacteriológico do Chile, citando 2 casos de "*Shigella parashiga* (-)". Na mesma ocasião Schwarzenberg *et al.* (1945), estudando as diarréias agudas do lactente, registram 1 caso de "*Shigella Andrada*" ocorrido no ano de 1944.

Avoluma-se a literatura.

Weil e Wieder (1945) referindo-se ao grupo Sachs advertem que a motilidade e capacidade de produção de gás de muitas amostras nêle incluídas indicam não poderem, provávelmente, ser tôdas classificadas como *Shigella*.

MacLennan (1945) afirma haver identificado entre amostras isoladas de casos de disenteria e de diarréia, na área do Mediterrâneo, todos os tipos sorológicos descritos por Sachs salvo um, indol-positivo, e obtido P25, novo, também indol-positivo. Discorda de Sachs quanto à arabinose: encontrou muitas raças Q1167 atacando-a e diversas pertencentes aos tipos arabinose-positivos de Sachs, especialmente Q454, negativas; acha que a fermentação irregular e morosa de arabinose, por muitas amostras, prova ser de valor muito duvidoso seu emprêgo em diagnóstico.

Aos poucos tínhamos, por citações, conhecimento da comunicação de Sachs. Não conseguimos consultá-la. Dada a relação que nos parecia existir entre alguns dos tipos ali descritos e os nossos novamente recorremos a Carvalho Lima; como diretor dêste Instituto talvez obtivesse de Sachs a separata que desejávamos. Em resposta à sua carta, de 30-1-46, mais um obséquo pelo que lhe consignamos o nosso reconhecimento, recebeu de Sachs, com presteza merecedora de admiração e agradecimentos, o exemplar solicitado. Foi, sobretudo, êste trabalho (1943) que alertou os pesquisadores e incentivou estudos sôbre o assunto. Nêle relata Sachs o resultado de suas investigações, durante 5 anos, sôbre novos tipos de germes manita-negativos procedentes de casos de disenteria na Índia e no Egito. Todos inaglutináveis por soros anti-Shiga, anti-Schmitz e anti-Newcastle. No grupo indol-nega-

tivo, o que focalizamos, figuram cinco novos tipos sorològicamente distintos entre si e assim agrupados, bioquìmicamente, ao lado do bacilo Shiga, pela constância de suas reações de fermentação:

ARABINOSE

	+
B. Shiga	Q771 (27 amostras)
Q1167 (12 amostras)	Q454 (3 amostras)
	Q1030 (16 amostras)
	A12 (10 amostras)

Portanto, só Q1167 bioquìmicamente idêntico ao bacilo Shiga. Os demais diferindo por atacarem arabinose; dêstes, Q1030 fermentava, também, dulcita e A12 caracterizava-se pela produção de gás em pequena quantidade.

Pertence, assim, a Sachs a primeira referência a arabinose.

As amostras Q são de Quetta, na Índia; A de Abbotabad, também na Índia.

São mencionados, nessa publicação, anterior isolamento registrado em Quetta, por Large, 1934, de bacilos semelhantes aos de Shiga e Schmitz, mas inaglutináveis; de 3 raças indol-negativas citadas, em 1935, por Boyd, como inaglutináveis por sôro anti-Shiga; de 1, descrita por Archer, em 1933, diferindo do bacilo de Shiga por ser dulcita-positiva.

Consultando a comunicação de Large (1934) verificamos que, em colaboração com Sankaran, descreve, entre os germes não fermentadores de manita isolados durante epidemia de disenteria, em Quetta, grande número bioquìmicamente semelhantes alguns ao bacilo Shiga e outros ao bacilo Schmitz mas sem relação sorològica com êles. Assim subdividem, bioquìmicamente, os novos germes indol-negativos (também diferentes sorològicamente do bacilo Newcastle) ao lado dos bacilos Shiga e Newcastle:

DULCITA

	+
B. Shiga	B. Newcastle
771 (11 amostras)	1030 (16 amostras)
1167 (10 amostras)	

Os algarismos correspondem à numeração das amostras com que se prepararam soros-tipos.

Vê-se que os três tipos novos, todos descritos como sorològicamente distintos e associados com casos graves de disenteria, foram incluídos entre os cinco indol-negativos de Sachs ainda hoje designados pelo número da descrição original precedido da inicial que lhes acrescentou êste autor relativa à localidade.

Large e Sankaran também se referem, como Sachs, à publicação de Archer (1933) que, trabalhando em Wellington, sul da Índia, encontrou, em 2 casos, o tipo dulcita-positivo. Supõem corresponder ao 1030. Não nos foi possível consultar êste trabalho.

No de Boyd (1935) é, igualmente, mencionada a ocorrência, na Índia, de germes manita e indol-negativos divergindo antigênicamente do bacilo Shiga: 3 amostras, associadas a casos clinicamente disentéricos, das quais duas são ditas coincidirem, morfológica e bioquimicamente com o B. para-Shiga de Dudgeon e Urquhart e uma com o tipo dulcita-positivo descrito por Archer. Informa o autor não haver aglutinação cruzada entre as duas primeiras amostras.

Wheeler e Stuart (1946) conseguem os tipos de Sachs, *S. arabinotarda* e *Shigella* 8524 para trabalho comparativo incluindo culturas por êles isoladas. Mostram a identidade sorològica de Q771, *S. arabinotarda* tipo A e *Shigella* 8524 de um lado e, de outro, de Q1167 e *S. arabinotarda* tipo B. Confirmam a existência de 5 tipos sorològicos entre as espécies manita-indol-negativas, patogênicas para o homem, do gênero *Shigella*: *S. dysenteriae* e quatro dos tipos Sachs (Q771, Q1167, Q454, Q1030). Excluem, conforme a previsão de Weil e Wieder, A12 por ser produtor de gás; comentando o comportamento das raças Newcastle, também produtoras de gás mas relacionadas sorològicamente com *S. paradysenteriae*, admitem a possibilidade de se incluir a raça A12 no gênero *Shigella* no caso de se mostrar relação sorològica entre ela e outras espécies dêsse gênero. Entre os indol-positivos também fazem exclusões baseadas em motilidade e produção de gás; acrescentam 1831, novo, indol-positivo. Ao contrário dos resultados de Sachs, os seus revelam ser Q1167 arabinose-positiva e algumas amostras Q1030 dulcita-negativas. Dizem que Christensen e Gowen deram como lentos fermentadores de arabinose seus tipos correspondentes a Q771 e Q1167 ao passo que, para êles, mais ou menos 20% dessas amostras produziram reação ácida em caldo-bromocresol púrpura em 24 horas e repetidas provas não foram

constantes quanto ao prazo de fermentação. Verificam que o tipo Q771 é, como Q1030, serbita-positivo tardio; Q454 e bacilo Shiga, negativos; do tipo Q1167 há raças positivas e raças negativas.

Quase na mesma ocasião Fulton e Curtis (1946) registram exemplar procedente de Texas correspondendo ao tipo 8524. Comparando-o com amostras dêste tipo cedidas por Gober e com 7 de bacilo Shiga concluem serem as de Gober e a sua arabinose-serbita-positivas e as de bacilo Shiga negativas.

Finalmente Ewing (1946) diz, de passagem, ter sido verificada a identidade entre 2 raças por êle isoladas perto de Oran, na Algéria, em 1943 e, respectivamente, os tipos A e B de Christensen e Gowen e Q771 e Q1167 de Sachs. Mais tarde (1947), em colaboração com Gravatti, registrando germes do gênero *Shigella* encontrados na área do Mediterrâneo, menciona 47 amostras de Q771, 9 de Q1167 e 8 de Q1030.

Vê-se grande a atenção dada, nos últimos anos, a bactérias de interêsse em patologia humana pertencentes ao grupo manita-negativo do gênero *Shigella*. A medida que surgiam as publicações se evidenciava que descrições independentes do mesmo germe se faziam. Coube a Wheeler e Stuart, como vimos, confirmá-lo.

Por nossa vez reiniciamos, em maio de 1946, as investigações. Obtidas as formas S desejadas fizemos revisão geral de nossas amostras, com acréscimo de algumas provas; terminada em novembro, estabelecendo identidade morfológica, tintorial, cultural, bioquímica e sorológica entre os nossos 10 exemplares *l*-arabinose-sorbita-positivos e Andrade, distintos de *S. dysenteriae*, começávamos a redigir esta comunicação avançando corresponderem, talvez, a algum dos tipos Sachs dos quais, infelizmente, não dispúnhamos para confronto quando Taunay, a quem novamente agradecemos, nos ofereceu subculturas de Q771 e Q1167 recebidas de Wheeler, Connecticut State Department of Health e sôro imune preparado com a primeira. Pudemos verificar corresponderem nossos exemplares *l*-arabinose-sorbita-positivos, Andrade e Q771; embora bioquimicamente idêntico, Q1167 diferia sorologicamente.

Passamos a descrever nossas observações. 37 amostras estudadas:

27 procedentes de casos clínicos de disenteria e isoladas neste Instituto;

C., também de caso de disenteria, isolada por Carvalho Lima;

MEMBROS MANITA-INDOL-NEGATIVOS DO GÊNERO *SHIGELLA* 19

- M. C. isolada por Luís de Sales Gomes, de paciente com passadão disentérico;
Andrada isolada por Sosa, Buenos-Aires, caso disentérico;
S. dysenteriae Parker, National Collection of Type Cultures;
S. dysenteriae Berger, Paris;
S. dysenteriae 94, Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos;
S. dysenteriae 1216, Instituto Butantã;
S. dysenteriae Ortiz, Faculdade de Medicina;
Shigella sp. Sachs Q771, amostra 1909 e *Shigella* sp. Sachs Q1167, amostra 1913, Connecticut State Department of Health.

CARACTERES MORFOLÓGICOS, TINTORIAIS, CULTURAIIS E BIOQUÍMICOS

Verificados, como dissemos, repetidas vèzes e com longos intervalos salvo os padrões Q771 e Q1167; recebidos no encerramento dêste trabalho foram ensaiados apenas uma vez.

Bastonetes curtos, Gram-negativos, de extremidades arredondadas e de acentuado pleomorfismo em culturas antigas em laboratório e, sobretudo, nas rugosas; são freqüentes, nestes casos, longos filamentos. Não produtores de endósporos; imóveis em caldo quer a 37°C, quer a 18-20°C; de crescimento fácil em meios de cultura comuns; incapazes de liquefazer gelatina, utilizar citrato e produzir indol; H₂S praticamente ausente pelo processo descrito; uréia (método de Stuart *et al.*, 1945), catalase e reação de Voges-Proskauer negativas; reação do vermelho metila e redução de nitrato a nitrito positivas. Coagulação de leite tornassolado, ausente; apenas leve acidez seguida ou não de ligeira alcalinidade.

Em meio semi-sólido de Hiss preparado com infusão de carne isenta de açúcar, indicador vermelho de fenol e carboidratos, políalcoois e glicósides Pfanstiehl, observação durante 21 dias a 37°C, inalterados: adonita, *d*-arabinose, dulcita, inosita, inulina, isodulcita, lactose, manita, rafinose, salicina e xilose; acidez, sem gás, em 24 horas: dextrose, galactose, levulose e manose; acidez, sem gás, entre 48 horas e 10 dias: glicerina (Wyman).

Sorbita e *l*-arabinose dividiram, distintamente, em dois grupos os exemplares:

- Grupo I — *l*-arabinose e sorbita negativas (24 amostras, figurando entre elas as de *S. dysenteriae*: Parker, Berger, Ortiz, 94, 1216).

Grupo II — *l*-arabinose e sorbita positivas (13 amostras: Q771, Q1167, Andrada e 10 nossas entre as quais C., M.C., M.E.F., D.J.R.).

Repetimos o que dissemos em o início desta publicação: as designações Grupo I e Grupo II são empregadas apenas para facilidade de exposição.

ARABINOSE E SORBITA — Ressaltam, no tocante às propriedades fermentativas dos novos tipos manita-indol-negativos, as divergências entre autores em relação a arabinose e sorbita, sobretudo quanto ao prazo de fermentação. *S. dysenteriae*, concorda-se: é negativa em ambas.

Reunimos, no Quadro I, os resultados que, a respeito dessas fermentações, se publicaram sobre os tipos acima. Nêles conservamos, atendendo às conclusões de Wheeler e Stuart, reunidas *Shigella* 8524, *S. arabinotarda* A e *Shigella* Q771; por sua vez reunidas *S. arabinotarda* B e *Shigella* Q1167.

Correspondentes que são o padrão Q771, Andrada e nossas 10 amostras do Grupo II organizamos, sobre seu comportamento em *l*-arabinose e sorbita, o Quadro II em que figura, também, o padrão Q1167 incluído, bioquimicamente, naquele grupo e afastado, depois, em provas sorológicas. Não trabalhamos com Q1030 e Q454.

Observação sempre durante 21 dias, meio semi-sólido de Hiss preparado com infusão de carne isenta de açúcar; *l*-arabinose e sorbita Pfanstiehl, indicador vermelho de fenol salvo nas duas primeiras verificações (ácido rosólico).

Destaca-se o seguinte:

1 — Em repetidas provas em épocas bem diversas, como se vê no Quadro II, nossas 10 amostras do Grupo II e Andrada, isto é, correspondentes ao tipo Q771 nunca deixaram de fermentar *l*-arabinose e sorbita. Também positivos para êste tipo são os resultados dos demais autores, no Quadro I, excluído o de Mac Lennan que não esclarece o comportamento de Q771. As amostras do Grupo I: *S. dysenteriae*, já o dissemos, sempre negativas, também concordando com as comunicações dos outros autores. O padrão Q771 positivo em prova única.

Concedem, assim, tais resultados valor diferencial à prova de fermentação de *l*-arabinose e sorbita entre *S. dysenteriae* e o tipo Q771. Entretanto, o padrão Q1167 também foi positivo em

MEMBROS MANITA-INDOL-NEGATIVOS DO GÊNERO *SHIGELLA* 21

QUADRO I

	AMOSTRAS								
	<i>Shigella</i> 8524 <i>Shigella</i> Q 771 <i>S. arabino-</i> <i>tarda</i> A		<i>Shigella</i> Q 1167 <i>S. arabino-</i> <i>tarda</i> B		<i>Shigella</i> Q 1030		<i>Shigella</i> Q 454		
	Arabinose	Sorbita	Arabinose	Sorbita	Arabinose	Sorbita	Arabinose	Sorbita	
Mayfield e Gober, 1941 (<i>Shigella</i> "sorbita-positiva". Conclui-se, por Gober <i>et al.</i> , 1944, ser <i>Shigella</i> 8524.) Gelose semi-sólida. Prazo não citado.		+							
Sachs, 1943 (<i>Shigella</i> Q 771, <i>Shigella</i> Q 1167, <i>Shigella</i> Q 1030, <i>Shigella</i> Q 454). Meio de cultura não citado. 14 dias de observação.	+	1	—	1	+	1	+	1	
Gober, Stacy e Woodrow, 1944 (<i>Shigella</i> 8524). Meio de cultura não citado. 21 dias de observação.									
Christensen e Gowen, 1944 (<i>S. arabinotarda</i> A e B). Caldo, vermelho de fenol; uma série, autoclave; uma, vela Seitz. 15-40 dias de observação.	+	2-5	+	3-5	+	7-25	+	3-5	
MacLennan, 1945 (<i>Shigella</i> Q 771, <i>Shigella</i> Q 1167, <i>Shigella</i> Q 1030, <i>Shigella</i> Q 454). Meio de cultura não citado. 21 dias de observação.	Considera de valor duvidoso a arabinose por serem muitas amostras Q 1167 positivas, diversas dos tipos "arabinose-positivos" de Sachs negativas (principalmente Q 454) e morosa e irregular a fermentação de outras. Não empregou sorbita.								
Fulton e Curtis, 1946 (<i>Shigella</i> 8524). Melo com triptose, bromocresol púrpura. 7 dias de observação.	+	lenta	+	lenta					
Wheeler e Stuart, 1946 (<i>Shigella</i> Q 771, <i>S. arabinotarda</i> A, <i>Shigella</i> 8524, <i>Shigella</i> Q 1167, <i>Shigella arabinotarda</i> B, <i>Shigella</i> Q 1030, <i>Shigella</i> Q 454). Caldo, bromocresol púrpura. 28 dias de observação.	+	1-28	+	1-28	—	+	+	+	—
					ou	1-28	1	1	
					+	1	1	1	

* Os algarismos representam o número de dias.

** No quadro de Fulton e Curtis só consta acidez; na enumeração dos característicos das espécies, acidez lenta.

*** Wheeler e Stuart esclarecem que, neste caso, a fermentação se dá entre 24 horas e 28 dias; nos demais em 24 horas a 28 dias.

QUADRO II

	AMOSTRAS														Shig. Q. 771	Shig. Q. 1167	
	1	M.P.	N.T.	A.M.	R.R.	J.O.	M.C.	Andr.	C.	M.E.F.	D.J.R.	Arabinose Sorbita	Arabinose Sorbita	Arabinose Sorbita			
Fevereiro de 1937 . . .	+	+	+	+	+	+											
Junho de 1937 . . .	+	+	+	+	+	+											
Setembro de 1937 . . .	+	+	+	+	+	+											
Dezembro de 1939 . . .	+	+	+	+	+	+											
Dezembro de 1940 . . .																	
Dezembro de 1943 . . .																	
Fevereiro de 1944 . . .																	
Maio de 1946	+	+	+	+	+	+											
Novembro de 1946 . . .	+	+	+	+	+	+											
Janeiro de 1947																	

* Os algarismos representam o número de dias. Resultados dentro do prazo citado; ex.: 1 indica fermentação dentro de 24 horas (talvez 8, 10, 18 horas, etc.).

l-arabinose e sorbita, idêntico, pois, aos exemplares tipo Q771 inclusive o respectivo padrão e Andrada, embora sorolôgicamente distintos como veremos sob o subtítulo REAÇÕES SOROLÓGICAS. Imprescindível se faz, então, a tipagem com sôro padrões.

Como dissemos, não estudamos os tipos Q1030 e Q454 que se sabe serem sorolôgicamente distintos entre si e também de Q771 e Q1167. Entretanto, o trabalho de Wheeler e Stuart, dos mais completos e abrangendo todos os tipos Sachs, revela a variabilidade de comportamento dos tipos indol-negativos em sorbita ao passo que arabinose é fermentada por todos. Assim, os nossos resultados comparados com os dos autores acima, a não ser que os contrariem investigações futuras, permitem atribuir a *l*-arabinose valor diferencial na identificação de *S. dysenteriae* e tipos indol-negativos de Sachs; êstes a fermentam e aquela espécie não.

Distinção entre os tipos só a sorologia estabelece, conclusão a que chegam, também, Wheeler e Stuart.

Insistimos em ser *d*-arabinose imprópria porque não a atacam os germes quer do Grupo I, quer do Grupo II. Embora não façam os autores citados menção à variedade ótica empregada, seus resultados positivos indicam *l*.

2 — E' patente, no Quadro II, a variabilidade do prazo de fermentação de *l*-arabinose e de sorbita por amostras tipo Q771.

Wheeler e Stuart também evidenciam essa irregularidade pelo longo prazo citado: 1 a 28 dias. Vê-se, ainda, concordarem os nossos resultados com os seus quanto à ocorrência de fermentação de *l*-arabinose por Q771 mesmo em 24 horas (embora mais raramente) e não sempre tardia como estabelecem Christensen e Gowen.

Verificando Q1167 em prova única e com amostra única registramos lenta fermentação de sorbita contrastando com o prazo de 24 horas de Wheeler e Stuart para as amostras positivas desse tipo.

Atribuímos à diversidade de condições experimentais as discordâncias em fermentação, principalmente quanto ao prazo: diferentes meios de cultura e processos de esterilização, indicadores de maior ou menor sensibilidade, talvez carboidratos, poliálcoois e glicósides de procedências diversas (não são citadas), prazos vários de observação (é possível que Q1167 fôsse arabinose-positiva para Sachs se observada em mais longo período).

LACTOSE — Nossa opinião acima expendida sôbre diferenças em reações de fermentação ainda mais se aplica à *S. dysenteriae* em razão de ser a constância de propriedades bioquímicas reconhecida um de seus mais distintivos característicos.

Gardner (1929) diz de leve ataque à lactose, pelo bacilo Shiga, segundo Winter (1912), sendo, aliás, a acidez produzida geralmente muito fraca para ser revelada. Acrescenta que se pode, às vezes, ver transitória acidez em meios com lactose inoculados com bacilo Shiga, mas inconfundível com a intensa embora tardia reação ácida causada pelo tipo Sonne.

Em lactose Wheeler e Stuart obtiveram com 70% de suas amostras de *S. dysenteriae* fraca reação ácida, entre 14 e 28 dias, empregando caldo-bromocresol púrpura quer esterilizado por aquecimento, quer por filtração em vela Berkefeld.

Em nossas condições experimentais nunca se revelou essa reação, seja com *S. dysenteriae*, seja com as amostras tipo Q771.

RAFINOSE — Só Christensen e Gowen se referem a alguns exemplares de *S. arabinotarda* fermentando, tardiamente, rafinose esterilizada por aquecimento e negativos quando a esterilização se fazia por passagem em vela Seitz.

Nunca obtivemos fermentação de rafinose por quaisquer amostras de nossos dois grupos embora sempre empregando, conforme a rotina do Instituto, esterilização por aquecimento.

MALTOSE E SACAROSE — Por seus resultados inconstantes já perderam o prestígio que chegaram a gozar até como diferenciais nos primórdios das investigações sobre germes disentéricos. Embora assim, damos, abaixo, os resultados positivos divulgados pelos que investigaram os tipos Sachs indol-negativos, conjuntamente com os positivos de *S. dysenteriae*:

AUTORES	AMOSTRAS	MALTOSE	SACAROSE
Large e Sankaran	<i>S. dysenteriae</i> (88 amostras)		+ leve 25 dias
Fulton e Curtis	<i>Shigella</i> 8524 (3 amostras)	+ lenta	
Wheeler e Stuart	<i>Shigella</i> Q771 (26 amostras)	— ou + 1-28 dias	
	<i>Shigella</i> Q1167 (5 amostras)	+ 1-28 dias	

Tôdas as amostras de ambos os nossos grupos variaram em maltose: negativas ou tardiamente positivas, de maneira inconstante.

Em sacarose idem quanto ao Grupo I, isto é, *S. dysenteriae*; negativo o Grupo II: padrões Q771 e Q1167, amostra Andrada e as 10 nossas de tipo Q771.

Sabemos da possibilidade de falsas reações positivas em maltose e sacarose, quando esterilizadas em autoclave, pois êste processo pode causar parcial degradação de tais carboidratos, e germes não fermentadores das substâncias originais são capazes de atuar sobre os produtos resultantes, com formação de ácido. Large e Sankaran não mencionam o processo de esterilização empregado. Fulton e Curtis, aquecimento; registrando, porém, resultados de

observação de apenas 7 dias dizem, a respeito de maltose, que talvez a fermentassem todos os germes estudados (estão incluídas 7 amostras de bacilo Shiga) se observada por mais tempo. Wheeler e Stuart empregaram, para lactose, esterilização em vela Berkefeld e esterilização por aquecimento, como vimos; nada esclarecem sobre os demais carboidratos, poliálcoois e glicósides.

Dado, assim, o devido valor à fermentação de maltose e sacarose, devemos, contudo, salientar a ausência de fermentação da última pelos tipos indol-negativos de Sachs registrada, unânimeamente, pelos que com eles trabalhamos, a despeito da não uniformidade de processos empregados.

REAÇÕES SOROLÓGICAS

No preparo de soros aglutinantes obedecemos às diretrizes do Standard Methods, N. Y. State Dept. of Health, Wadsworth (1939).

Para as reações empregamos antígenos vivos, culturas de 18 horas; soros monovalentes, diluições dobradas a partir de 1:80; método macroscópico, em tubos; incubação em banho-maria a 50-52°C, 18-20 horas.

As provas diretas e cruzadas de aglutinação e de absorção de aglutininas revelaram identidade sorológica das amostras do Grupo I e existência de dois tipos entre as do Grupo II: um representado, apenas, pelo padrão Q1167 e o outro pelo padrão Q771, Andrada e os 10 exemplares nossos.

E' essencial o emprêgo de culturas na fase S, forma normal dos germes em questão, dada a conhecida interferência da variação S-R em resultados sorológicos. Julgamos de interêsse o relato de nossas observações a respeito.

VARIAÇÃO S-R — Empregamos sempre, nas provas de soro-aglutinação, solução a 0,85% de NaCl. Algumas vêzes a auto-aglutinação das suspensões R de ambos os grupos impediu a realização das reações; conseguimos, entretanto, outras estáveis e a estas se referem os resultados que daremos sobre a forma R, seja do Grupo I, seja do Grupo II.

Arkwright (1921), ao divulgar suas importantes observações sobre o fenômeno de dissociação bacteriana, revelou a estabilidade de formas S de bacilo Shiga em solução a 0,85% de NaCl e a aglutinação espontânea de formas R. Estabelece, então, a necessi-

dade de soluções mais fracas para provas de aglutinação com estas raças auto-aglutinantes. Recomenda, como limites, 0,42% — 0,1% por ter verificado que "a porcentagem de sal que leva à aglutinação no caso de diferentes raças varia consideravelmente". Mais tarde (1924), em colaboração com Goyle, conclui que suspensões contendo ambos os antígenos: S e R em geral não se aglutinam espontaneamente em solução a 0,85% de NaCl; que suspensões estáveis em solução de NaCl mais fraca do que a 0,85% se mantêm por aquecimento a 100°C, 10-60 minutos, quando S mas geralmente se aglutinam e mesmo em soluções ainda mais diluídas quando R; que aquecimento prévio de suspensões S em solução fraca de NaCl não prejudica a sôro-aglutinação e, às vezes, até a intensifica.

Discordam os resultados dêstes autores dos nossos em haver-mos obtido, na maioria das vezes, suspensões R estáveis em solução a 0,85% de NaCl não aquecida.

No seguinte coincidem, embora empregássemos solução a 0,85% de NaCl e não mais fraca como êles:

1 — Aquecimento a 100°C mantinha a estabilidade de suspensões S e não a de R; com esta fase ocorria precipitação.

2 — Em provas de sôro-aglutinação o aquecimento prévio de suspensões S não prejudicava e, ao contrário, muitas vezes aumentava seu título. Nada podemos dizer sôbre suspensões R porquanto o aquecimento precipitava as nossas, como dissemos, não nos permitindo proceder às reações; não empregamos concentrações mais baixas como o fizeram Arkwright e Goyle.

Pampana (1931) atribuindo, após trabalho experimental, à dissociação bacteriana os resultados de Alessandrini e Sabatucci (1931) sôbre a reação da tripaflavina, registra 5 amostras de bacilo Shiga fortemente aglutináveis pela tripaflavina e apresentando em caldo crescimento flocoso em meio límpido, ao passo que 1 negativa pela tripaflavina turvava uniformemente o caldo. Eram formas R e S, respectivamente. Nenhuma, entretanto, revelou aglutinabilidade por solução a 0,85% de NaCl não aquecida.

Waler (1935), em estudo minucioso sôbre dissociação de bacilos disentéricos, estabelece realizar-se gradativa ou abruptamente e, além das fases S e R de Arkwright, reconhece outras registrando os seguintes estádios:

S — Sr — Rs — R — Rn

Rn representa degradação de R e bactérias nessa fase são antígenos extremamente pobres; em ambas há sedimentação em caldo; R é de baixa estabilidade em solução salina e Rn de muito baixa estabilidade. Sr e Rs são estádios intermediários; as bactérias então apresentam propriedades intermediárias entre as das fases S e R.

Assim, algumas hipóteses nos ocorrem: 1 — As suspensões instáveis que registramos em solução a 0,85% de NaCl não aquecida seriam Rn; as estáveis porém sofrendo precipitação pelo aquecimento (o que não se dá com S) seriam R, correspondendo estas às de Pampana e as instáveis às de Arkwright e Goyle; neste caso, Pampana teria trabalhado com formas R e Arkwright e Goyle com Rn. 2 — Não seriam de fase pura nossas suspensões R estáveis quando não aquecidas; talvez contivessem fração S, fôsem Rs, já que Arkwright e Goyle concluem pela não aglutinação espontânea em solução a 0,85% de NaCl não aquecida, em geral, de suspensões contendo ambos antígenos: S e R. 3 — Talvez nem sempre haja precipitação em solução a 0,85% de NaCl não aquecida da fase R de *S. dysenteriae* e assim se justifiquem os resultados positivos de Arkwright e Goyle, negativos de Pampana e variáveis nossos. Aceita a 1.^a hipótese surgiria uma interrogação: como Arkwright e Goyle conseguiram soros imunes de elevado título se Waaler (1936) afirma que as formas Rn não produzem anticorpos quando inoculadas em coelho? A 2.^a hipótese levantaria, também, dúvidas. Waaler observa que bactérias nos estádios Rs e Sr apresentam propriedades intermediárias entre as de R e S. Fôsem as nossas Rs, como se explicaria a absoluta ausência de aglutinação cruzada entre elas e as formas S demonstrada em quadros a seguir? E, também, se fôsem Rs, qual a explicação para sua irreversibilidade, adiante citada, coincidindo com os característicos da fase R e não com os de Rs estabelecidos por Waaler e citados a seguir? Mais provável, então, nos parece a 3.^a hipótese. Em qualquer dos casos os resultados que daremos sobre as suspensões supostas R dirão da necessidade de se empregar, nas provas de sôro-aglutinação, culturas na fase S, normal dos germes de que tratamos. Já Neter (1942) preveniu que a falta de relacionar dissociação bacteriana e alterações na estrutura antigênica do bacilo Shiga é causa de muitos registros, na literatura, de raças inaglutináveis.

Julgamos convenientes as considerações acima para interpretação da designação R em nossas reações.

Grupo I — Compreendia 10 amostras S e 14 R. Para o preparo de soros específicos escolhemos como representantes: *S. dysenteriae* Parker (S), *S. dysenteriae* Berger (R) e *S. dysenteriae* 94 (R). Seguem-se, no Quadro III, os resultados das reações de aglutinação.

QUADRO III

N.º DE AMOSTRAS	FASE	SORO IMUNE MONOVALENTE		
		<i>S. dysenteriae</i> Parker (S) Título 1:2560	<i>S. dysenteriae</i> Berger (R) Título 1:640	<i>S. dysenteriae</i> 94 (R) Título 1:640
10 (inclusive <i>S. dysenteriae</i> Parker)	S	1:1280 ou 1:2560	—	—
14 (inclusive <i>S. dysenteriae</i> Berger e <i>S. dysenteriae</i> 94)	R	—	1:160, 1:320 ou 1:640.	1:160, 1:320 ou 1:640.

Vê-se que as formas S e R só são aglutinadas pelos respectivos soros imunes e que R têm propriedades aglutinogênicas mais reduzidas. Este comportamento de *S. dysenteriae* confirma as observações de Calalb e Crivat (1936): soro de coelho imunizado com bacilo Shiga S aglutina fortemente amostras Shiga S e não as de fase R; soro anti-Shiga R aglutina amostras de bacilo Shiga R em título mais baixo que o do soro anti-S para formas homólogas e não aglutina bacilos Shiga S.

Arkwright registra muito leve aglutinação cruzada entre as formas S e R de bacilo Shiga.

Afastam-se os resultados de Thibault e Braunberger (1935 a, b): nunca soros anti-Shiga R aglutinam a forma S, mas soros anti-Shiga S aglutinam francamente R embora bem menos que S. Também divergem seus resultados dos de Calalb e Crivat e dos nossos registrando soros anti-Shiga R de título tão elevado quanto os de anti-Shiga S.

É provável, atendendo às conclusões de Waaler, serem fases não puras as das culturas de Thibault e Braunberger. Reforça esta hipótese o fato de haverem estes autores, logo depois (1936), registrado igual toxicidade para as fases S e R de uma amostra de *S. dysenteriae*, o que contraria a opinião prevalecte a respeito e provoca, de Neter, esta advertência: "A observação de Thibault e Braunberger, que registraram que colônias lisas e rugosas de uma raça Shiga eram igualmente tóxicas, requer confirmação".

Waalder afirma ser possível reversão de R a S enquanto não é completa a variação a R; estabelecido êste estágio não mais há reversão. Mostra que variantes R podem apresentar colônias lisas e a isto atribui muita controvérsia sôbre reversibilidade R-S.

Prova de irreversibilidade do estágio R de *S. dysenteriae* parece oferecer, também, o trabalho de Meyer e Goldenberg (1933). Obtiveram reversão de R a S por cultura em presença de vacina S mas não conseguiram reproduzir a experiência, o que faz crer haver sido o primeiro resultado obtido com variante não absolutamente R.

Nós em vão tentamos obter formas S das amostras *S. dysenteriae* Berger e *S. dysenteriae* 94. Conservaram-se persistentemente R. Idem com algumas outras da mesma espécie.

Por absorção de aglutininas confirmou-se a distinta estrutura antigênica das duas fases de nossas culturas do Grupo I. Vê-se pelo Quadro IV.

QUADRO IV

SÔRO IMUNE MONOVALENTE	ABSORVIDO COM	AGLUTINAÇÃO COM CULTURA			
		<i>S. dysenteriae</i> Parker (S)	Amostras <i>S. dysenteriae</i> (S)	<i>S. dysenteriae</i> Berger (R)	Amostras <i>S. dysenteriae</i> (R)
<i>S. dysenteriae</i> Parker (S) Título 1:2560	Amostras <i>S. dysenteriae</i> (S) isoladamente <i>S. dysenteriae</i> Parker (S) Amostras <i>S. dysenteriae</i> (R) isoladamente	— 1:2560	—		
<i>S. dysenteriae</i> Berger (R) Título 1:640	Amostras <i>S. dysenteriae</i> (R) isoladamente <i>S. dysenteriae</i> Berger (R) Amostras <i>S. dysenteriae</i> (S) isoladamente			— 1:640	—

Grupo II — Era constituído por 13 exemplares dos quais conseguimos selecionar formas absolutamente S e, para confronto, também formas R das amostras Andrada e M.E.F. Preparamos soros monovalentes com as formas S de A.M., C., D.J.R. e com as formas S e R de M.E.F. e Andrada. No Quadro V se vêem os resultados das reações de aglutinação incluindo o sôro imune Q771 (S) obtido de Taunay.

QUADRO V

AMOSTRAS	SÔRO IMUNE MONOVALENTE								
	FASE	A. M.	C.	D. J. R.	Shig.	M. E. F.		Andrada	
		(S) Título 1:5120	(S) Título 1:2560	(S) Título 1:1280	(S) Título 1:1280	(S) Título 1:1280	(S) Título 1:1280	(R) Título 1:160	(S) Título 1:1280
<i>Shigella</i> Q 1167.	S	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Shigella</i> Q 771 e 9 exemplares dos A. A.	S	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	—	1:1280	—
		1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560	—	1:2560	—
		ou 1:5120	ou 1:5120	ou 1:5120	ou 1:5120	ou 1:5120	ou 1:5120	—	ou 1:5120
M. E. F.	S	1:1280	1:5120	1:2560	1:2560	1:1280	—	1:5120	—
	R	—	—	—	—	—	1:160	—	1:320
Andrada.	S	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280	—	1:1280	—
	R	—	—	—	—	—	1:320	—	1:320

M.E.F. e Andrada estão destacadas de *Shigella* Q771 e 9 exemplares dos AA. para demonstração dos resultados de suas fases S e R.

É evidente no quadro acima:

1 — A diferença antigênica entre *Shigella* Q1167 e todos os exemplares tipo Q771, inclusive M.E.F. e Andrada. Não preparamos sôro com o padrão Q1167 não só para evitar que esta comunicação, já em sua fase final quando o recebemos, se protelasse ainda mais, como porque o dispensavam os resultados perfeitamente distintos do Quadro V e, a seguir, os do Quadro VI.

2 — A diferença antigênica entre as formas S e R de M.E.F. e também de Andrada, isto é, de amostras tipo Q771, a exemplo do que se deu com *S. dysenteriae*.

3 — Serem mais reduzidas as propriedades aglutinogênicas das formas R também como se viu com *S. dysenteriae*.

O quadro acima revela, ainda, fato freqüente em reações de aglutinação: variam a aglutinabilidade e a capacidade aglutinogênica de amostras da mesma espécie e, muitas vèzes, o título de aglutinação é mais baixo para a amostra antigênica do que para as outras.

Damos, no Quadro VI, as reações de absorção confirmando a existência de 2 tipos sorológicos entre as amostras S de nosso

Grupo II. Para poupança de trabalho e tempo não realizamos, por dispensáveis, absorções cruzadas entre formas S e R idênticas às efetuadas com *S. dysenteriae*.

QUADRO VI

SÓRO IMUNE MONOVALENTE	ABSORVIDO COM	AGLUTINAÇÃO COM CULTURA				
		<i>Shigella</i> Q 771 (S)	Andrada (S)	M. E. F. (S)	A. M. (S)	Restantes tipo Q 771 (S)
<i>Shigella</i> Q 771 (S) Título 1:1280	<i>Shigella</i> Q 1167 (S) <i>Shigella</i> Q 771 (S) Andrada, M. E. F., A. M. e restantes tipo Q 771, isolada- mente (tôdas S)	1:1280 —	—	—	—	—
Andrada (S) Título 1:1280	<i>Shigella</i> Q 1167 (S) Andrada (S) <i>Shigella</i> Q 771, M. E. F., A. M. e restan- tes tipo Q 771, isola- damente (tôdas S)	—	1:1280 —	—	—	—
M. E. F. (S) Título 1:1280	<i>Shigella</i> Q 1167 (S) M. E. F. (S) <i>Shigella</i> Q 771, An- drada, A. M. e res- tantes tipo Q 771, isoladamente (tôdas S)	—	—	1:1280 —	—	—
A. M. (S) Título 1:5120	<i>Shigella</i> Q 1167 (S) A. M. (S) <i>Shigella</i> Q 771, An- drada, M. E. F. e restantes tipo Q 771, isoladamente (tôdas S)	—	—	—	1:5120 —	—

Finalmente, o Quadro VII, de recíprocas reações de aglutinação e de absorção entre formas S de nossos Grupos I e II, confirma a diferença de composição antigênica entre *S. dysenteriae* e os tipos Q771 e Q1167 por sua vez distintos entre si.

Dada a prática corrente de se repetirem com antígenos aquecidos as reações de aglutinação de certas espécies do gênero *Shigella* que não reagem com os soros adequados, procedemos a algumas provas de aglutinação cruzada, nessas condições, com suspensões S de amostras de ambos os grupos. Confirmou-se a diferença entre *S. dysenteriae*, tipo Q771 e tipo Q1167.

QUADRO VII

SORO IMUNE MONOVALENTE	ABSORVIDO COM	AGLUTINAÇÃO COM CULTURA					
		<i>S. dysen- teriae</i> Parker (S)	<i>Shigella</i> Q 1167 (S)	<i>Shigella</i> Q 771 (S)	Andrada (S)	M. E. F. (S)	A. M. (S)
GRUPO I: <i>S. dysenteriae</i> Parker (S)		1:2560	—	—	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 1167 (S)	1:2560	—	—	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 771 (S)	1:2560	—	—	—	—	—
	Andrada, M. E. F., A. M., isoladamente (tôdas S)	1:2560	—	—	—	—	—
GRUPO II: <i>Shigella</i> Q 771 (S)		—	—	1:1280	1:1280	1:2560	1:2560
	<i>S. dysenteriae</i> Par- ker (S)	—	—	1:1280	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 1167 (S)	—	—	1:1280	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 771 (S)	—	—	—	—	—	—
	Andrada, M. E. F., A. M., isoladamente (tôdas S)	—	—	—	—	—	—
Andrada (S)		—	—	1:2560	1:1280	1:5120	1:2560
	<i>S. dysenteriae</i> Par- ker (S)	—	—	—	1:1280	—	—
	<i>Shigella</i> Q 1167 (S)	—	—	—	1:1280	—	—
	Andrada (S)	—	—	—	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 771, M. E. F., A. M., iso- ladamente (tôdas S)	—	—	—	—	—	—
M. E. F. (S)		—	—	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
	<i>S. dysenteriae</i> Par- ker (S)	—	—	—	—	1:1280	—
	<i>Shigella</i> Q 1167 (S)	—	—	—	—	1:1280	—
	M. E. F. (S)	—	—	—	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 771, Andrada, A. M., iso- ladamente (tôdas S)	—	—	—	—	—	—
A. M. (S)		—	—	1:1280	1:1280	1:1280	1:5120
	<i>S. dysenteriae</i> Par- ker (S)	—	—	—	—	—	1:5120
	<i>Shigella</i> Q 1167 (S)	—	—	—	—	—	1:5120
	A. M. (S.)	—	—	—	—	—	—
	<i>Shigella</i> Q 771, Andrada, M. E. F., isoladamente (tôdas S)	—	—	—	—	—	—

PATOGENIA

Nossos 10 exemplares manita-indol-negativos do Grupo II são associados a casos clínicos de disenteria. Alguns sabemos terem sido isolados nos primeiros dias de moléstia, de fezes apresentando muco e sangue e das quais não se conseguiram outros germes disentéricos; sôbre os restantes faltam-nos estas informações. Andrada, conforme esclarece Sosa, procede, também, de caso de disenteria.

No preparo de soros imunes verificamos não revelarem essas amostras, para coelho, a toxicidade da *S. dysenteriae*, como passamos a descrever.

Imunizamos coelhos de 2000-2400 g com as seguintes amostras do Grupo II: fase S de A.M., C. e D.J.R., fases S e R de M.E.F. e Andrada. Intravenosamente, processo II, Standard Methods. 3 para cada amostra. Todos sobreviveram.

Pelo mesmo processo procedemos à imunização de coelhos, de pesos idênticos aos citados, com as amostras *S. dysenteriae* Parker (S), *S. dysenteriae* Berger (R) e *S. dysenteriae* 94 (R) do Grupo I. Resultados:

S. dysenteriae Parker (S) — 3 coelhos. Sobreviveu 1.

S. dysenteriae Berger (R) — 3 coelhos. Sobreviveu 1.

2 coelhos (dose inicial diluída ao dôbro). Sobreviveu 1.

S. dysenteriae 94 (R) — 3 coelhos. Sobreviveram 2.

2 coelhos (dose inicial diluída ao dôbro). Ambos sobreviveram.

Todos os coelhos que morreram, sempre em 2-6 dias, manifestaram paralisia dos membros, sobretudo dos posteriores.

Não repetimos a imunização com *S. dysenteriae* Parker (S) porque o único coelho sobrevivente forneceu sôro de título satisfatório — 1:2560. Com *S. dysenteriae* Berger (R) e *S. dysenteriae* 94 (R) obtivemos na 1.^a série 1:160; na 2.^a, 1:640.

A amostra *S. dysenteriae* Berger, procedente de Paris e recebida do Instituto Butantã há 22 anos, embora R tem revelado sempre alta toxicidade notada por diversos pesquisadores, no Instituto A. Lutz.

A despeito de opiniões contrárias é de aceitação quase geral, principalmente após os trabalhos de Boivin e Mesrobeanu (1937 a, b, c), a toxicidade de *S. dysenteriae* em ambas as fases: S e R.

Também prevalece admitir-se mais alta a de *S. Fugia* à nossa finalidade tal observação, motivo pelo qual não realizamos provas adequadas; apenas salientamos o que o preparo de soros imunes nos permitiu notar: serem as fases S e R de *S. dysenteriae* dotadas de toxicidade e, em igualdade de condições, não haverem as amostras tipo Q771 quer S, quer R, revelado toxicidade.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

S. dysenteriae, ao contrário do estabelecido no manual de Bergey, não fermenta rafinose e adonita.

Estudo comparativo de amostras de *S. dysenteriae* e de germes manita-indol-negativos procedentes de casos clínicos de disenteria, antigênicamente homogêneos e muito semelhantes àquela espécie morfológica, tintorial, cultural e bioquimicamente mas distintos em provas sorológicas e absolutamente idênticos a padrão tipo Q771 recebido de Connecticut State Dept. of Health revela a ocorrência, em São Paulo, de *Shigella sp.* Sachs Q771.

É observação valiosa considerando-se que, se julgado este tipo, como muitas vezes até há pouco o foi, em diversos países inclusive o nosso, *S. dysenteriae* inaglutinável porque como esta espécie se comporta nas provas bioquímicas rotineiras de identificação de *Shigella*, leva ao emprêgo de sôro anti-Shiga, acarretando falhas e conclusões indevidas de ineficácia da soroterapia específica.

"Shigella Andrada", isolada por Sosa, em Buenos-Aires, corresponde, também, ao tipo Q771 de Sachs.

Fala em favor da ocorrência dêste tipo no Uruguai a publicação de Hormaeche e Surraco em que se estabelece identidade entre "Shigella Andrada" e amostra por eles isolada.

Sorbita e *l*-arabinose distinguem *S. dysenteriae* do tipo Q771 de Sachs, o que não o fazem caracteres morfológicos, tintoriais e culturais e rotineiras provas bioquímicas; são fermentadas, em geral tardiamente, pelo tipo Q771 e não por *S. dysenteriae*. Entretanto, a amostra padrão *Shigella sp.* Sachs Q1167 estudada pelos AA. e procedente, também, de Connecticut State Dept. of Health, é de comportamento bioquímico idêntico ao de *Shigella sp.* Sachs Q771 mas sorologicamente distinta, revelando, assim, a necessidade de tipagem com soros padrões.

Os AA. não trabalharam com os tipos Q1030 e Q454; contudo, Wheeler e Stuart, cujas investigações são das mais completas e

abrangem todos os tipos Sachs, concluem exigirem, também aquêles, emprêgo de soros padrões para diferenciação.

As observações dos AA., repetidas vêzes e com longos intervalos, sôbre *S. dysenteriae* e exemplares tipo Q771 comparadas com as de Wheeler e Stuart incluídas no Quadro I desta publicação, a não ser que as contrariem investigações futuras, permitem estabelecer diferenciação, por *l*-arabinose, entre *S. dysenteriae* e os tipos indol-negativos de Sachs já que êstes a fermentam e aquela espécie não. Distinção entre os tipos se fará em base sorológica.

Os tipos Sachs trarão modificações nos atuais sistemas taxionômicos. Borman, Stuart e Wheeler (1944), em cuidadoso estudo sôbre a taxionomia da família *Enterobacteriaceae*, à qual pertence o gênero *Shigella*, dizem da provável necessidade de logo se designarem variedades no grupo não fermentador de manita mas ser ainda cedo para determinar o lugar de germes recentemente descritos como os de Sachs. Porém o trabalho posterior e há pouco citado de dois daqueles autores, Wheeler e Stuart, exclui do gênero *Shigella* alguns tipos Sachs e confirma a inclusão dos demais definindo, assim, a posição taxionômica dos mesmos.

Não fermentam *d*-arabinose *S. dysenteriae*, *Shigella sp.* Sachs Q771 e a única amostra *Shigella sp.* Sachs Q1167 estudada pelos AA.; provávelmente, também os tipos Q1030 e Q454. É essencial que, em publicações sôbre fermentação de arabinose, se mencione a variedade ótica estudada.

Insistem os signatários desta comunicação, por observações próprias, na necessidade do emprêgo, em provas de sôro-aglutinação, de culturas na fase S e soros imunes preparados com amostras S. Ao lado de muitos "Shigas inaglutináveis" registrados e que, na realidade, não são a clássica *S. dysenteriae* e sim tipos indol-negativos de Sachs, outros certamente devem sua inaglutinabilidade ao emprêgo de formas R.

Verificam os AA. serem as formas S e R de *S. dysenteriae* dotadas de toxicidade, embora não hajam observado qual a de mais alto poder, e que, em igualdade de condições, amostras de *Shigella sp.* Sachs Q771 quer S, quer R, não revelam toxicidade.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

S. dysenteriae, on the contrary of what is established in Bergey's manual, does not ferment raffinose and adonitol.

A comparative study was made of *S. dysenteriae* strains and other mannitol-indole-negative organisms here isolated from clinical cases of dysentery, and having morphological, staining, cultural and biochemical characteristics very similar to those of *S. dysenteriae*. Serological tests evidenced that these organisms are homogeneous, but failed to show any relationship between the *S. dysenteriae* strains and the others, which, on the other hand, were found to be exactly identical with one representative strain of type Q771 from the Connecticut State Dept. of Health. Thus the occurrence of *Shigella sp.* Sachs Q771 in S. Paulo is here reported.

The practical value of this observation is obvious when considered that if this type is regarded, as it was often until recently in several countries including Brazil, as "inagglutinable Shiga" because in routine biochemical tests used in the identification of *Shigella* species it is identical with *S. dysenteriae*, the use of Shiga antiserum, which would be recommended in this case as the specific treatment, would prove of no result.

"Shigella Andrada", isolated by Sosa, in Buenos-Ayres, and Sachs type Q771 were found to be identical.

As is concluded from a report presented by Hormaeche and Surraco in which these authors show an identity between one strain they have isolated and the "Shigella Andrada", type Q771 must occur also in Uruguay.

Sorbitol and *l*-arabinose differentiate *S. dysenteriae* from the type Q771 of Sachs; this differentiation is not possible by morphological, staining and cultural characteristics, as well as by routine biochemical tests. *S. dysenteriae* fails to ferment any of them, while cultures of type Q771 produce, generally slowly, an acid reaction. However, the only representative strain of *Shigella sp.* Sachs Q1167 examined by the AA., which was also received from the Connecticut State Dept. of Health, presents the same biochemical behaviour as *Shigella sp.* Sachs Q771, although serologically distinct, proving thus the necessity of typing by means of specific sera.

The AA. have not worked with types Q1030 and Q454; but, Wheeler and Stuart, whose investigations about the subject are very complete and include all the Sachs types state that also these two types require to be differentiated specific type determination.

The observations made repeatedly by the AA. during many years about *S. dysenteriae* and strains type Q771 compared with those of Wheeler and Stuart presented in table I of this paper permit unless the contrary can be shown by future investigations, to differentiate by means of *l*-arabinose *S. dysenteriae* from the Sachs indole-negative types, since these produce acid from the carbohydrate above whereas with *S. dysenteriae* the contrary occurs. The distinction among these types is based on serological tests.

The Sachs types will introduce modifications in the present taxonomic systems. Borman, Stuart and Wheeler (1944), in a detailed study on the taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*, to which the *Shigella* genus belongs, state that probably soon the necessity for designating varieties will arise in the non-mannitol-fermenting group, but that it is still early to determine the place of the recently described organisms such as Sachs types. Notwithstanding, through the report presented by Wheeler and Stuart, previously mentioned in this paper, some types of Sachs are excluded from the *Shigella* genus, while the inclusion of the others is confirmed, determining thus their taxonomic position.

Strains of *S. dysenteriae*, *Shigella sp.* Sachs Q771 and the only one of *Shigella sp.* Sachs Q1167 examined do not ferment *d*-arabinose; probably the same occurs with types Q1030 and Q454. It is absolutely necessary that in publications about arabinose fermentation the optical variety be always mentioned.

Based on their experimental findings, the AA. insist on the necessity of employing always cultures and antisera S in agglutination tests. Beside many of the so-called "inagglutinable Shiga" reported, which are, in fact, not *S. dysenteriae* but Sachs indole-negative types, a great number exists which is a result of the use by the investigators of R forms instead of S.

Finally the AA. conclude that the S and R forms of *S. dysenteriae* are toxic; however no conclusion is made about which is the more toxic. Regarding the strains of *Shigella sp.* Sachs Q771 tested in identical conditions, neither the S nor the R forms reveal any toxicity.

AGRADECIMENTOS

Além de nossos agradecimentos já externados em o início desta publicação não podemos silenciar sôbre quanto nos auxilia-

ram nos trabalhos experimentais, com grande dedicação, Angelina Franco Faraco, Gelva Ribeiro, Cremilde G. de Matos Oliveira, Lízete Petinatti Pires, Lucília Fonseca Barbosa e Teresinha de Jesus Calazans, técnicas de laboratório. A tôdas nosso reconhecimento.

REFERÊNCIAS

- ALESSANDRINI, A. e SABATUCCI, M. — 1931 — La tripaflavina quale mezzo di differenzazione dei microbi del genere *Brucella* — *Ann. d'ig.*, 41:29-34.
- ARCHER, G. T. L. — 1933 — Note on non-nannite-fermenting organism recovered from 2 cases of dysentery — *J. Roy. Army M. Corps.*, 61:55-56.
- ARKWRIGHT, J. A. — 1921 — Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum — *J. Path. & Bact.*, 24:36-60.
- ARKWRIGHT, J. A., and GOYLE, A. N. — 1924 — The relation of the "smooth and "rough" forms of intestinal bacteria to the "O" and "H" forms of Weil and Felix — *Brit. J. Exper. Path.*, 5:104-114.
- BERGEY, D. H. *et al.* — 1925 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 2nd ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BERGEY, D. H. *et al.* — 1930 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 3rd ed., Baillière, Tindall & Cox, London.
- BERGEY, D. H. *et al.* — 1934 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 4th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BERGEY, D. H. *et al.* — 1939 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 5th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BOIVIN, A. et MESROBEANU, L. — 1937 a — Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur l'existence d'un principe toxique thermolabile et neurotrope dans les corps bactériens du bacille de Shiga — *Compt. rend. Soc. de biol.*, 126:222-225.
- BOIVIN, A. et MESROBEANU, L. — 1937 b — Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques; sur l'identité entre la toxine thermolabile et neurotrope des corps bactériens du bacille de Shiga et l'exotoxine présente dans les filtrats des cultures sur bouillon de la même bactérie — *Compt. rend. Soc. de biol.*, 126:323-325.
- BOIVIN, A. et MESROBEANU, L. — 1937 c — Recherches sur les toxines du bacille dysentérique. Sur la signification des toxines produites par le bacille de Shiga et par le bacille de Flexner. *Compt. rend. Soc. de biol.*, 126:652-655.
- BORMAN, E. K., STUART, C. A., and WHEELER, K. M. — 1944 — Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae* — *J. Bact.*, 48:351-367.
- BOYD, J. S. K. — 1935 — *Bacillus dysenteriae* Schmitz (with brief note on certain other non-nannite-fermenting bacilli) — *J. Roy. Army M. Corps.*, 64:289-299.
- CALALE, G. et CRIVAT, D. — 1936 — Les variantes S et R du bacille de Shiga et leurs propriétés antigéniques — *Compt. rend. Soc. de biol.*, 123:59-61.

- CANESSA, E. y GARCES, C. — 1945 — Distribucion por especies de Shigellas y Salmonellas classificadas en la seccion de germen entericos — *Rev. chilena de pediat.*, 16:697-700.
- CHRISTENSEN, W. B., and GOWEN, G. H. — 1944 — An arabinose-fermenting bacterium of the lactose-negative, mannitol-negative *Shigella* group — *J. Bact.*, 47:171-176.
- COLEMAN, M. B. — 1940 — The differentiation and identification of bacillary incitants of dysentery — *Am. J. Pub. Health*, 30:39-42.
- COLEMAN, M. B. — 1943 — Serologic and bacteriologic procedures in the diagnosis of enteric fevers in Annual Report of the Division of Laboratories and Research, N. Y. State Dept. of Health, Albany.
- DUDGEON, L. S. — 1929 — Schmitz's bacillus in A System of Bacteriology in Relation to Medicine, Medical Research Council, London, vol. 4.
- DUDGEON, L. S., and URQUHART, A. L. — 1919 — Spec. Rep Serv. Med. Res. Comm., N.º 40.
- EWING, W. H. — 1946 — An additional *Shigella paradysenteriae* serotype — *J. Bact.*, 433-445.
- EWING, W. H., and GRAVATTI, J. L. — 1947 — *Shigella* types encountered in the Mediterranean area — *J. Bact.*, 53:191-195.
- FONSECA, F. et al. — 1941 — Disenteria bacilar — *Med. Cont.*, 59:
- FULTON, M., and CURTIS, S. F. — 1946 — Bacteriology of a collection of *Shigella* strains typed by Weil's method — *J. Infect. Dis.*, 78:198-203.
- GARDNER, A. D. — 1929 — The dysentery group of bacilli in A System of Bacteriology in Relation to Medicine, Medical Research Council, London, vol. 4.
- GOBER, M., STACY, V., and WOODROW, M. — 1944 — A probably new type of nonmannitol-fermenting *Shigella* — *Am. J. Hyg.*, 40:209-211.
- GRICHENER, E. — 1938 — Disenteria bacilar — Un caso producido por un tipo de bacilo atípico: el "para-Shiga negativo" — *Semana méd.*, 1.º semestre: 888-890.
- HAZEN, E. L. — 1938 — Isolation of *B. dysenteriae* (Dudgeon-Urquhart) in an outbreak of diarrhea — *J. Infect. Dis.*, 63:330-331.
- HORMAECHE, E. y SURRACO, N. — 1938 — Un nuevo capítulo de nuestra patologia — La disenteria "bacilar" — *An. Fac. de med. de Montevideo*, 23:171-227.
- LARGE, D. T. M., and SANKARAN, O. K. — 1934 — Dysentery among troops in Quetta. Part II D. The non-mannite-fermenting group of organisms — *J. Roy. Army M. Corps.*, 63:231-237.
- MACLENNAN, J. D. — 1945 — The non-mannitol-fermenting dysentery bacilli — *J. Path. & Bact.*, 57:307-315.
- MAYFIELD, C. R., and GOBER, M. — 1941 — Comparative efficiency of plating media for the isolation of *Shigella dysenteriae* — *Am. J. Pub. Health*, 31:363-368.
- MEYER, K., und GOLDENBERG, B. — 1933 — Umwandlungsversuche und pathogenen Darmbakterien; die Rückbildung von R-in S-Formen — *Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap.*, 80:121-134.

- NETER, E. — 1942 — The genus *Shigella* (Dysentery bacilli and allied species) — *Bact. Rev.*, 6:1-36.
- PAMPANA, E. J. — 1931 — La dissociazione microbica e la tripaflavina come sue reattive — *Ann. Dig.*, 41:537-553.
- RIDING, D. — 1931 — Acute bacillary dysentery due to *Bacillus para-Shigae*. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 24:613-616.
- RUSSO, E. — 1939 — Contribuição ao estudo fermentativo das bactérias do gênero "Pasteurella" — *O Hospital*, 16:57-66.
- SACHS, A. — 1943 — A report of an investigation into the characteristics of new types of non-mannitol-fermenting bacilli isolated from cases of bacillary dysentery in India and Egypt — *J. Roy. Army M. Corps.*, 80:92-99.
- SCHWARZENBERG, J., ZENTENO, T., PIERA, A. et al. — 1945 — Diarreas agudas en el lactante — *Rev. chilena de pediat.*, 16:841-901.
- SILVA, M. M. — 1943 — Classification sérologique de quelques souches de bacilles de la dysenterie, isolés au cours d'une poussée épidémique — *Arg. Inst. bact. Cámara Pestana*, 9:19-42.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS — 1936 — Routine tests for the descriptive chart in Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria, Society of American Bacteriologists, Geneva, N. Y.
- STUART, C. A., VAN STRATUM, E., and RUSTIGIAN, R. — 1945 — Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms — *J. Bact.*, 49:437-444.
- THIBAUT, P. et BRAUNBERGER, J. — 1935 a — Les variantes R et S du bacille dysentérique Shiga — *Compt. rend. Soc. de biol.*, 120:434-436.
- THIBAUT, P. et BRAUNBERGER, J. — 1935 b — Variation antigénique S et R du bacille de Shiga — *Compt. rend. Soc. de biol.*, 120:617-618.
- THIBAUT, P. et BRAUNBERGER, J. — 1936 — Toxicité comparée des variantes S et R du bacille de Shiga — *Compt. rend. Soc. de biol.*, 123:1118-1120.
- THOMSON, D., and MACKIE, T. J. — 1917 — Clinical and laboratory researches on dysentery in Egypt, with some remarks on sanitation — *J. Roy. Army M. Corps.*, 28:403-427.
- WAALER, E. — 1935 — Studies on the dissociation of the dysentery bacilli, Oslo, Jacob Dybwad.
- WAALER, E. — 1936 — Studies on the toxin production of the Shiga bacilli — *J. Exper. Med.*, 63:1-15.
- WADSWORTH, A. B. — 1939 — Production and standardization of sera and other preparations for diagnostic use in Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health, 2nd ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- WEIL, A. J. e WIEDER, S. — 1945 — Recentes progressos na disenteria bacilar — *Arg. de biol.*, 29:33-44.
- WHEELER, K. M., and STUART, C. A. — 1946 — The mannitol-negative *Shigella* group — *J. Bact.*, 51:317-325.
- WINTER — 1912 — Vergleichende Untersuchungen über die chemischen und biologischen Eigenschaften von Ruhrbazillen — *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr.*, 70:273-305.