

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DAS SALMONELAS DE ORIGEM ANIMAL, SUA IMPORTÂNCIA E FREQUÊNCIA NO MUNICÍPIO DE S. PAULO (1)

BACTERIAL DIAGNOSIS OF SALMONELLA OF ANIMAL ORIGIN. ITS IMPORTANCE AND FREQUENCY IN SÃO PAULO, BRAZIL

AUGUSTO DE ESCRAGNOLLE TAUNAY (2)

SUMMARY

The confrontation of several different bacteriologic methods made possible the establishment of a routine procedure which permits the isolation and accurate typing of bacteria of the Salmonella group most frequently responsible for human infections.

The results are comparable to those obtained by other authors who studied the subject in this same region or in other areas of Brazil. It was established that Salmonella of animal origin accounted for 9.8% of acute gastro-intestinal infections observed in 712 children, aged 1 month to 5 years. We could verify that for other age groups (newborns) or in the benign forms of the disease these occur in a very low percentage.

This does not imply that the newborn is less susceptible, as it was found that, if conditions are favourable, transmission occurs easily, and often under severe septicemic forms.

The finding of a considerable high number of human carriers showed that this area must present favourable conditions for the spreading of the disease. Some of the carriers were eliminating the germ in the urine, a fact which we could not account for.

Dogs, flies and cockroaches were not important focus of infection in this regions. The study was carried through a period of 17 years, during which faeces of 35.705 individuals were examined, most of them adults with or without intestinal symptoms, and 720 members of the Salmonella group of 19 different serotypes were isolated. From these, the most frequent were *S. newport* (19.88%), *S. anatum* (17.70%), *S. typhimurium* (11.12%) e *S. derby* (10.01%).

I — INTRODUÇÃO

O crescimento exagerado da população no município de São Paulo nos últimos 20 anos, a expensas da intensa migração da zona rural do Estado bem como de outras unidades da Federação, trouxe como conseqüência o agravamento das condições sanitárias, dadas as dificuldades em manter nas proporções satisfatórias os elementos básicos de saneamento da cidade, em face das deficiências do sistema de abastecimento de água e, principalmente, da rede de esgotos. Acrescido a esses problemas, o aumento exagerado do custo de vida levou os menos favorecidos a se aglo-

merarem em favelas que se ressentem de um mínimo de conforto, obrigando-os a uma vida em ambiente de absoluta falta de higiene.

Diante dessa situação, é fácil compreender que estejam presentes tôdas as condições favoráveis para as doenças cuja transmissão se faz através dos excretos.

Não sendo entre nós as moléstias produzidas por enterobactérias de notificação compulsória, e visto que na maioria das vezes o diagnóstico etiológico de uma infecção entérica deixa de ser feito, os coeficientes de mortalidade e morbidade não revelam a ver-

(1) Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz e da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

dadeira situação epidemiológica peculiar a essas infecções, que representam provavelmente ainda um dos mais sérios problemas de saúde pública no município de São Paulo, constituindo ademais uma das causas mais importantes da mortalidade infantil.

A metodologia necessária para se chegar à identificação correta de uma salmonela tem prejudicado em países como o nosso a avaliação de sua importância na patologia humana e animal. Tendo trabalhado com bactérias desse gênero, num período de mais de duas dezenas de anos, nosso escopo será o de demonstrar o que pode ser feito para esclarecimento do problema, desde que técnicas bacteriológicas simples, acessíveis a qualquer laboratório medianamente equipado, sejam usadas.

Após ligeiro esboço histórico, discutiremos a técnica bacteriológica que foi usada, mostrando as razões de nossa preferência, para depois tratar das salmoneloses em nosso meio onde são conhecidos quadros típicos e paratípicos desde fins do século passado, sem que tenham sido esclarecidos aí com precisão a incidência e a importância das salmoneloses de origem animal.

ESBOÇO HISTÓRICO

Antes da criação do gênero *Salmonella* por LIGNIÈRES³⁵ (1900), os membros desse grupo de microrganismos eram incluídos entre *Bacterium* ou *Bacillus*, a que se justapunha o nome da infecção que determinavam ou o local onde fôra isolada a bactéria pela primeira vez. Determinando quadros mórbidos idênticos, possuindo características bioquímicas e antigênicas semelhantes, era difícil estabelecer diferenciação entre êles.

SCHOTTMÜLLER⁴⁹ em 1903, fazendo a revisão do grupo, chegou a admitir não ser possível separá-los em espécies distintas, tôdas devendo ser denominadas *Bacillus paratyphicus* patogênico para o homem assim como para os animais, nos quais podia produzir desde quadros de intoxicação alimentar até quadros típicos severos.

No entanto, fatos de observação clínica bem como dados epidemiológicos demonstravam desde logo diferenças nítidas entre a patogenicidade do *Bacillus paratyphicus*, descrito por ACHARD & BENSUADE¹, em 1896, e do *Bacillus typhimurium*, descrito por LOEFFLER³⁶ em 1892.

A introdução de provas de patogenicidade para animais, principalmente para o rato, permitiu aos pesquisadores do Instituto de Higiene da Universidade de Kiel¹⁹ (1908-1911) dividir as salmonelas em dois grupos: I — espécies adaptadas ao parasitismo humano; II — espécies de origem animal. A patogenicidade e a epidemiologia de cada grupo são distintas; no primeiro as salmonelas adaptadas ao homem produzem quadros típicos, manifestando-se em geral em casos isolados e sendo a fonte de infecção o próprio homem o qual com frequência não pequena se torna portador do germe. As de origem animal, quando infectam o homem, provocam quadro clínico que se caracteriza por intoxicação intestinal de curso rápido, com mortalidade baixa, sem que o doente se torne portador, e estando a infecção quase sempre ligada à ingestão de alimentos de origem animal.

Para os animais, principalmente os jovens, o que se observa é o inverso: processo infeccioso muito semelhante às formas típicas com invasão geral do organismo, com ou sem localização intestinal, alta mortalidade, ficando portadores de germes muitos dos que sobrevivem.

Êsses são, resumidamente, os pontos defendidos pelos pesquisadores do Instituto de Higiene de Kiel. Entretanto, muitos fatos observados mostravam que, também no homem, as chamadas salmonelas de origem animal podiam provocar quadro septicêmico ou infecções supurativas várias além do quadro clínico da intoxicação alimentar (WHITE⁶⁵, 1929).

Por muitos anos, o conhecimento da patogenicidade das várias espécies de salmonelas foi impedido pela dificuldade na sua perfeita identificação e separação em tipos. A tentativa de agrupamento através de meios bioquímicos era de pouca valia, uma vez que tais enterobactérias possuem muitas propriedades comuns entre si e com outros microrganismos que nada têm a ver com elas. Por outro lado, a bioquímica afastava do gênero a *Salmonella typhi*, e espécie mais bem adaptada ao homem.

Foram os trabalhos pioneiros de SCHUTZE⁵⁰ (1920) depois prosseguidos por White (1929) que mostraram serem êsses germes possuidores de antígenos comuns e passíveis de identificação desde que fôssem feitas absorções apropriadas nos soros por êles produzidos, quando injetados em animal. Por outro la-

do, KAUFFMANN²⁷ (1930), seguindo a mesma orientação, chegou a resultados semelhantes.

Com o objetivo de alcançar um método que permitisse a individualização das bactérias pertencentes ao grupo, a comissão designada pela Seção de Taxonomia do Congresso Internacional de Microbiologia de 1930 publicou suas conclusões em 1934, assim terminando: "A convicção na sorologia como último critério na taxonomia do grupo resulta da experiência dos grandes serviços que a sorologia tem prestado, transformando um campo cheio de incertezas e de armadilhas, num setor no qual a identificação se tornou fácil, certa e intimamente relacionada com a patologia e a epidemiologia. Não se sugere que a classificação da bactéria deva ser baseada exclusivamente em critérios sorológicos. O verdadeiro campo da sorologia se baseia na diferenciação entre bactérias que estão intimamente relacionadas sob outros aspectos (morfologia ou bioquímica). Dentro de um tal grupo as diferenças sorológicas são tão definidas que podem ser válidas para a criação de espécies". Ao mesmo tempo, foi dada publicidade a um esquema da composição antigênica que é conhecido como "Esquema de Kauffmann-White", no qual foi adotada a terminologia usada por Kauffmann e aceita pela Associação Internacional dos Microbiologistas.

O esquema de Kauffmann-White parte do princípio de que quase todas as salmonelas são germes móveis, possuindo antígenos de corpo ou somáticos, designados pela letra "O", e de flagelos ou "H" segundo a terminologia proposta por WEIL & FELIX⁶⁴ (1917). Sendo os antígenos de corpo mais característicos da bactéria do que o flagelares, as salmonelas foram divididas em grupos conforme os antígenos somáticos que possuem. Havendo mais de um antígeno somático na mesma bactéria, aquele que não se repete em outras foi escolhido para determinar o grupo ao qual a bactéria deve pertencer. Cada grupo foi identificado por uma letra maiúscula do alfabeto e os antígenos de que se compõe a bactéria foram representados por algarismos romanos.

Como toda bactéria flagelada, as salmonelas possuem antígenos flagelares específicos. No entanto, ANDREWES² (1922) descreveu uma curiosa variação de fase dos antígenos flagelares de certas espécies que, em determi-

nadas circunstâncias, podem apresentar variantes nas quais aparece um segundo antígeno, que é comum a numerosas outras salmonelas. Assim, as salmonelas podem ser monofásicas possuindo somente antígenos flagelares específicos ou bifásicas nas quais podem estar presentes os antígenos da fase específica e o de grupo. Os antígenos da fase específica foram representados por letras minúsculas e os da fase não específica, por números.

Em vista disso, o esquema da Kauffmann-White foi planejado de forma a tornar possível acrescentar aos grupos somáticos conhecidos qualquer salmonela que apresentasse uma combinação diferente de antígenos flagelares. Ao mesmo tempo, havendo necessidade, novos grupos somáticos poderiam ser criados, desde que os seus componentes apresentassem relações antigênicas que possibilitassem encaixá-los dentro da espécie.

A primeira tabela publicada era composta de 5 grupos, com apenas 44 salmonelas. Atualmente existem mais de 1000 espécies antigênicas, daí a necessidade de atualização da mesma. Assim, alguns grupos somáticos foram divididos em sub-grupos e novos grupos foram criados, passando a anotação dos seus antígenos a ser feita por algarismos arábicos. As variações de fase anotadas como específicas e não específicas perderam a razão de ser uma vez que, conhecendo melhor a constituição antigênica das salmonelas, verificou-se que os antígenos flagelares específicos e não específicos se repetem pelos vários grupos somáticos. Assim, não havia mais razão para chamá-los específicos e não específicos e, em substituição à antiga denominação, hoje se prefere a de fase 1 e fase 2, conservando-se o mesmo sistema de anotação por letras e números. A cada combinação antigênica foi dado um nome, que em geral provém do local onde a bactéria foi encontrada pela primeira vez.

Essa maneira de proceder, permitindo elevar à categoria de espécie cada combinação antigênica diferente, tem sofrido diversas críticas e foi mesmo proposto que, à semelhança do que se faz com a *E. coli*, as salmonelas, sejam identificadas pela sua fórmula antigênica, atribuindo-se nomes específicos somente para as espécies patogênicas mais importantes. Esse ponto de vista entretanto não foi aceito e o método usado até hoje é o mesmo descrito em 1934 (KAUFFMANN³⁰ 1966).

Foi justamente utilizando esse critério de classificação que HORMAECHE, PELUFFO & ALEPPO²⁴ (1936) demonstraram de maneira precisa que o homem na primeira infância é extremamente sujeito a infecção por essas bactérias, para isso bastando que entre em contacto com pequena quantidade de germes. No caso particular das crianças, a patogenia da doença é semelhante à dos animais jovens, de acordo com a Doutrina de Montevideu: "A criança, sobretudo no seu primeiro ano de vida, tem uma sensibilidade muito maior que os adultos para as salmonelas dos animais, comportando-se a espécie humana de maneira semelhante a quase todos os animais, isto é, os jovens são muito mais sensíveis, podendo apresentar com maior frequência localizações extra-intestinais, sem quadro entérico".

Por outro lado, a constatação de componentes antigênicos idênticos aos das salmonelas em outras bactérias fez com que se procurasse delimitar o gênero por métodos bioquímicos, reservando as provas sorológicas para identificação de espécies, ou melhor, dos soro tipos.

Assim, no 8.º Congresso Internacional de Montreal, em 1962, foram as enterobactérias divididas em 4 grupos conforme suas afinidades bioquímicas (LE MINOR³⁴, 1962).

No primeiro grupo, juntamente com *Arizona* e *Citrobacter*, estão as salmonelas, que são assim definidas: vasto grupo composto de perto de mil diferentes soro-tipos relacionados pelos seus característicos bioquímicos. Em geral, móveis, fermentando, com gás no mais das vezes, glicose, manitol e sorbitol; não fermentando nunca adonitol e salicina. Raramente fermentam a lactose. Não produzem indol. Não possuem urease e no meio de Clark-Lubs são VM + e VP —. Não se cultivam no meio de cianeto. Não possuem deaminase para fenilalanina e triptofano. Têm lisina-decarboxilase, exceptuando-se *S. paratyphi* A e *S. paratyphi-suis*. Bons produtores de gás sulfídrico com exceção de *S. paratyphi* A, *S. cholerae suis*, *S. senftenberg*, *S. sendai* e *S. abortus equi*. As patogênicas para o homem não liquefazem a gelatina.

Exceptuando-se as salmonelas adaptadas ao homem, sua importância médica era pouco conhecida em nosso meio.

Ao assumirmos em 1940 o encargo do laboratório de copro-bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, influenciados pelas pesquisas realizadas no Uruguai por HORMAECHE,

PELUFFO & ALEPPO²⁴ (1936), procuramos desde logo estabelecer um plano de trabalho que nos permitisse identificar com maior precisão os vários agentes etiológicos das síndromes diarreicas, tão frequentes entre nós. Os dados da literatura médica nacional, assim como os arquivos de nosso laboratório não indicavam serem importantes as salmonelas como agentes etiológicos de infecção intestinal, seja de adultos seja de crianças, em inteira contradição com aquilo que vinha sendo observado no Uruguai. A conselho do Prof. E. Hormaeche, quando de sua visita a nosso laboratório, modificamos técnicas que até então usávamos visando principalmente ao problema da infecção intestinal da criança. Quando, por iniciativa do Prof. Otto Bier, veio a São Paulo o Prof. Cyro A. Peluffo para demonstrar os métodos por ele empregados no despistamento das bactérias desse grupo, já tínhamos ciência de que em São Paulo o problema era semelhante ao do Uruguai e, graças a seu auxílio, muitas das nossas dúvidas foram esclarecidas e novo impulso foi dado ao trabalho.

II — TÉCNICA BACTERIOLÓGICA

A introdução de novos meios de cultura assim como o emprego de técnicas de colheita local têm permitido melhorar muito a seleção de bactérias a serem isoladas das fezes de doentes portadores de infecções entéricas. Também com relação à diferenciação bioquímica dos vários grupos de enterobactérias, várias provas vêm sendo usadas e que são de grande utilidade ao diagnóstico diferencial, principalmente em se tratando de salmonelas que facilmente se confundem bioquimicamente com enterobactérias de patogenicidade duvidosa.

Não é nossa intenção fazer revisão do assunto mas sim demonstrar as razões que justificam o método bacteriológico por nós seguido desde a colheita das fezes até a identificação sorológica final.

1. COLHEITA DAS FEZES

A pesquisa bacteriológica pode ser feita nas fezes passadas normalmente ou obtidas mediante colheita direta no intestino. Deve ser feita logo após o aparecimento dos primeiros sintomas e antes do emprego de qualquer medicamento. No primeiro caso, é de grande vantagem o exame de fezes re-

centes, sendo de toda conveniência escolher as partes que mais interessam, em geral constituídas de muco ou muco e sangue. Escolhido o material a ser examinado, este será completamente desfeito num tubo contendo glicerina a 30% em solução de cloreto de sódio (aproximadamente 2 g de fezes para 20 cm³ da solução de glicerina). Ao mesmo tempo, coloca-se a mesma quantidade de fezes num tubo com meio de enriquecimento. A semeadura em meio conservador (glicerina) é optativa; as fezes podem ser semeadas diretamente em meios seletivos desde que não haja um intervalo muito grande entre a emissão e o início do exame. O uso de meios de enriquecimento é obrigatório pelas razões que passamos a expor.

HARDY & WATT²¹ (1944) descreveram um método de colheita retal que, pela facilidade de execução, seria o ideal para o exame de comunidades assim como de crianças por permitir colher material a qualquer tempo e em condições ótimas. Apesar de ter sido preconizado para a pesquisa de bacilos disentéricos, resolvemos experimentá-lo em vista das vantagens que oferece.

Inicialmente num grupo de 307 crianças portadoras de enterites agudas ou de simples diarreia, comparamos a colheita pelo *swab* e a semeadura das fezes emitidas naturalmente. Tal método se revelou excelente para isolamento de bacilos disentéricos (TAUNAY⁵⁷, 1951) mas, quanto às salmonelas, os resultados não foram satisfatórios, porquanto ficou patente a obrigatoriedade do enriquecimento das fezes, conforme o demonstra a análise do quadro I.

QUADRO I

Comparação entre semeadura direta de fezes, "swab" e fezes enriquecidas

N.º exames	Método usado	N.º salmonelas isoladas
307	Semeadura direta do <i>swab</i>	1
307	Semeadura direta das fezes	1
307	Enriquecimento das fezes	6

Repetindo a mesma verificação (TAUNAY *et alii*⁵⁸, 1956), desta vez em 124 adultos com história de enterocolite crônica, e fazendo exames repetidos com vários métodos em quatro dias diferentes, em um único caso conseguimos isolar uma salmonela pela colheita direta no reto, notando-se que a semeadura das fezes enriquecidas permitiu isolar mais 9 salmonelas, conforme se demonstra no quadro II.

QUADRO II

Colheita direta no reto pelo "swab" em adultos, em comparação ao enriquecimento

Método usado	N.º exames	N.º salmonelas isoladas
Semeadura direta do <i>swab</i>	124	1
Semeadura direta das fezes	124	0
Enriquecimento das fezes	124	10

Em 46 crianças da Clínica Pediátrica do Hospital das Clínicas da U.S.P., todas padecendo de enterites agudas, de quem semeamos fezes colhidas naturalmente e pelo método do *swab*, ficou comprovada novamente a deficiência do método do *swab* (TAUNAY *et alii*⁶⁰ 1958), conforme o quadro III:

QUADRO III

Colheita direta no reto pelo "swab" em crianças, em comparação ao enriquecimento

Método usado	N.º casos	N.º salmonelas isoladas
Semeadura direta do <i>swab</i>	46	1
Semeadura direta das fezes	46	1
Enriquecimento das fezes	46	7

Nos estudos comparativos que fizemos (TAUNAY⁵⁷ 1951, TAUNAY *et alii*⁵⁸ 1956, TAUNAY *et alii*⁶⁰ 1958), a colheita retal se mostrou vantajosa ou equivalente ao exame das fezes passadas normalmente quando pesquisamos bacilos disentéricos ou *E. coli* G.E.I.

Ao contrário, sempre foi muito inferior para o isolamento de salmonelas, em confronto aos métodos de enriquecimento.

Falhas da colheita retal foram apontadas por THOMAS⁶² (1954) e mesmo por um dos seus preconizadores (HARDY & GALTON²³ 1955) mostrando que a colheita pelo *swab* retal do porco, feita logo após a morte do animal com o esfíncter relaxado, permite o dobro de isolamentos com relação ao animal vivo. Apesar de não persistirem dúvidas quanto à desvantagem do método, em 1959 HORMAECHÉ & PELUFFO²⁶ ainda o preconizam pelas facilidades que oferece.

Entretanto, a introdução da sonda de borraça para passagem do estilete de algodão, principalmente em crianças com processos entéricos agudos, provoca o reflexo da defecação. Nada mais fácil do que recolher as fezes que saem pela sonda num tubo contendo meio de enriquecimento.

2. MEIOS DE ENRIQUECIMENTO

Interessa na rotina do exame a escolha de um esquema econômico capaz de isolar simultaneamente vários tipos de bactérias intestinais empregando o menor número possível de meios que, combinados, permitem resultados satisfatórios.

Nas salmoneloses intestinais, o número de salmonelas presentes no bôlo fecal pode ser muito pequeno em confronto com o dos germes habitualmente presentes no intestino, o

que pode dificultar o isolamento das primeiras. Promover a sua multiplicação sem que a flora associada se desenvolva é a finalidade dos métodos enriquecedores, o que se consegue pela junção ao meio de cultura de elementos bacteriostáticos para a flora saprófita mas que não sejam prejudiciais para as bactérias que se pretende enriquecer. Vários meios desse tipo podem ser usados, havendo vantagens e desvantagens conforme a finalidade que se deseja atingir.

Inicialmente (TAUNAY, CORRÊA & FLEURY⁵⁶, 1944) comparamos em condições idênticas a semeadura direta das fezes com a semeadura de fezes previamente enriquecidas em dois meios diferentes: meio de tetracionato de KAUFFMANN²⁸ e meio de RUYSS⁴⁵, utilizando material proveniente de crianças portadoras de síndrome diarreica aguda. No quadro IV estão transcritos os resultados que obtivemos.

Dos meios enriquecedores experimentados, o de tetracionato de Kauffmann se mostrou mais eficiente e as diferenças de 2 a 5 vezes a favor dos meios enriquecedores dispensam outra avaliação.

Repetimos a mesma verificação, usando fezes de adultos e crianças, na maioria adultos sem infecção intestinal aguda, empregando desta vez somente o tetracionato de Kauffmann, uma vez que o meio de Ruys se mostrara inferior. Os resultados estão expressos no quadro V.

QUADRO IV

Comparação entre semeadura direta e dois meios de enriquecimento

	Semeadura direta	Enriquecimento em tetracionato de Kauffmann	Enriquecimento em meio de Ruys
N.º de casos	190	190	190
Positivos para salmonelas	6 (3,1%)	31 (16,3%)	11 (5,7%)

QUADRO V

Comparação entre semeadura direta e enriquecimento pelo meio de Kauffmann

	Semeadura direta	Enriquecimento em tetracionato de Kauffmann
N.º de casos	1230	1230
Positivos para salmonelas	8 (0,6%)	25 (2,0%)

Vê-se que há uma diferença de três vezes mais a favor do método de enriquecimento. Como o fim visado não era somente o enriquecimento das salmonelas de origem animal e sim de todas e, se possível, de outras bactérias patogênicas, resolvemos experimentar outro meio que não fosse prejudicial à *S. typhi* e que também fosse útil para o isolamento de certos bacilos disentéricos.

Para esse fim, o meio escolhido foi o de Selenito F (KAUFFMANN²⁹, 1954). No quadro VI estão reproduzidos os resultados de 820 exames realizados com material de procedência semelhante ao do ensaio anterior, concluindo-se que os dois meios são equivalentes.

Assim, dos três meios experimentados, dois foram mais eficientes e equivalentes e, pelas razões antes expostas, passamos a usar em nossas investigações o meio de Selenito F.

3. MEIOS SELETIVOS

São aqueles que permitem o crescimento dos germes que se procura isolar inibindo a flora associada. Além de seletivos, são diferenciais porque nêles as colônias a serem estudadas apresentam caracteres que permitem diferenciá-las das dos saprófitos.

Não existe nenhum meio seletivo inteiramente satisfatório e nenhum deles chega à perfeição ou ao ideal de eliminar todos os saprófitos permitindo só o crescimento dos patogênicos.

Alguns podem até ser prejudiciais aos desenvolvimentos de certas bactérias patogênicas.

No caso particular das infecções intestinais, a multiplicidade dos agentes infecciosos obriga a utilizar mais de um meio seletivo e os resultados variarão segundo a combinação usada, conforme demonstraram HORMAECHE & SURRACO²⁵ (1941).

Ao assumirmos a direção do Laboratório de Coprobacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, os meios seletivos usados eram os de HOLT-HARRIS & TEAGUE (H.H.T.) e de ágar ácido rosólico⁹, ambos de fraco poder inibidor para a flora saprófita, razão porque resolvemos incluir no esquema do exame um meio altamente seletivo para o isolamento das salmonelas, o de Kristensen-Lester-Jürgens, juntamente com um meio exclusivamente diferencial: ágar-lactose-tormassol. No quadro VII estão expressos os resultados obtidos em ensaio comparativo (TAUNAY, CORRÊA & FLEURY⁵⁶ 1944).

Grandes diferenças podem ser obtidas por influência também dos meios seletivos que,

QUADRO VI

Comparação entre meios de enriquecimento

	Enriquecimento em tetrionato de Kauffmann	Enriquecimento em meio de Selenito F
N.º de casos	820	820
Positivos para salmonelas	16(1,9%)	14(1,8%)

QUADRO VII

Comparação entre meios seletivos e diferenciais após enriquecimento

	Agás-ácido rosólico	Meio de Holt-Harris-Teague	Meio de Kristensen	Agar-lactose-tornassol
N.º de exames	190	190	190	190
Positivos para salmonelas	20(10,5%)	21(11%)	31(16,3%)	13(6,8%)

em virtude de seu poder inibidor para a flora saprófita, facilitam o isolamento das bactérias patogênicas que aí crescem em pontos isolados de fácil reconhecimento. Entretanto, o meio seletivo que melhor resultado apresentou, o de Kristensen-Lester-Jürgens, não se presta para o isolamento de bacilos disenterícos, sendo também desfavorável para *S. typhi* em virtude de entrar em sua composição o verde brilhante. Outro meio seletivo, o ágar SS que não apresenta essa desvantagem pois que tem como inibidor, sais biliares foi experimentado. No quadro VIII estão os resultados da comparação feita com o mesmo material utilizado no ensaio reproduzido no quadro VI.

Em fezes enriquecidas não houve diferença entre os meios seletivos, mas o meio de ágar SS se mostrou superior ao de Kristensen-Lester-Jürgens quando semeados diretamente.

Tomando por base os resultados acima referidos, foram escolhidos para semeadura direta os meios de ágar SS e de Holt-Harris-Teague (H.M.T.) e após enriquecimento, os meios de Kristensen-Lester-Jürgens e de H.H.T. que foram as combinações que deram os melhores resultados para isolamento dos vários tipos de enterobactérias patogênicas. O meio de H.H.T. foi escolhido em virtude de seu fraco poder inibidor, permitindo o crescimento de tôdas as enterobactérias, ao contrário dos dois primeiros, que algumas vêzes são impedientes para certas enterobactérias patogênicas.

Semeadura — No caso de semeadura direta das fezes, espanham-se com alça, pelo método de estrias sucessivas, pequenos fragmentos de muco ou de fezes sôbre a superfície de uma placa de ágar SS e uma de ágar de H.H.T..

Se a semeadura é feita a partir da emulsão de fezes na solução de glicerina, com uma alça grande colocam-se 4 gôtas da emulsão em pontos separados de uma placa de ágar SS, passando um bastão de vidro em L sôbre superfície para espalhar o material e, a seguir, o mesmo bastão é passado sôbre uma placa de H.H.T.

A partir dos meios de enriquecimento, a semeadura é feita colocando 4 gôtas do meio numa placa de Kristensen-Lester-Jürgens (K.L.J.), espalhando o material com um bastão em L, o qual será também passado em placa de H.H.T. Desenhando-se a letra "M" na superfície da placa, o material ficará bem espalhado; não se deve fazer pressão com o bastão sôbre o meio; seu simples pêso será suficiente para disseminar o material.

Quando as fezes são colhidas pelo *swab* retal, não é de boa prática usá-lo para semeadura direta porque dificilmente se obtêm colônias bem isoladas. É preferível suspender em solução salina o material contido no tampão de algodão para daí fazer as semeaduras.

Tôdas as placas, tanto as de semeadura direta como as semeadas a partir dos meios de conservação ou de enriquecimento, já previamente incubadas a 37°C por 24 horas, são colocadas em estufa até o dia seguinte.

Inspeção e isolamento das colônias — Examinam-se as placas sempre que possível com luz natural, de frente para uma janela. Nem sempre aparecem colônias com as características que adiante veremos (quadro IX) mas a experiência ensinará qual a colônia que deve ser considerada suspeita. Isolam-se de cada placa as colônias com os caracteres descritos no quadro IX. Procura-se atingir com a agulha (depois de fria) a colônia em seu centro, evitando, no máximo possível, iso-

QUADRO VIII

Comparação entre meios seletivos com semeadura direta e após enriquecimento

	Ágar SS	Meio de Kristensen-Lester-Jürgens
N.º de exames	820	820
N.º de salmonelas isoladas em semeadura direta	7(0,85%)	4(0,48%)
N.º de salmonelas isoladas após enriquecimento	14(1,8%)	16(1,9%)

QUADRO IX

Aspecto das colônias nos diferentes meios seletivos

Enterobactéria	Meio		
	Ágar K.L.J.	Ágar H.H.T.	Ágar SS
<i>Salmonella typhi</i>	Colônias vermelhas (crescimento escasso)	Colônias convexas brilhantes, em geral cor azul mais claro que o meio	Colônias sem cor, ou pouco amareladas. Em 48 horas a cor pode acentuar
<i>Salmonella sp.</i>	Colônias vermelhas	Semelhantes às do bacilo tífico	Em geral maiores que as anteriores
<i>Shigella sp.</i>	Crescimento inibido	Semelhante às do bacilo tífico	Semelhantes às do bacilo tífico. <i>Sh. sonnei</i> pode crescer, formando colônias muito grandes com centros amarelados
<i>Coliforme</i>	Colônias amarelo-esverdeadas	Colônias azul-negro ou com centro escuro	Crescimento inibido. Podem crescer colônias opacas, com tonalidade do róseo ao vermelho. Colônias maiores podem ter centro vermelho ou periferia branca ou amarela.
<i>Proteus sp.</i>	Colônias verdes	Colônias cor azul mais claro que o meio, com ou sem	Colônias sem cor, raramente com pseudópodos

lá-la de zonas onde as colônias não estejam bem separadas. Se isto não for possível, replica-se para uma placa de H.H.T., em estrias sucessivas, a colônia que não pôde ser separada da primeira vez.

Isolada a colônia, inocula-se no meio de tríplice açúcar modificado⁴⁴, mergulhando a agulha na base e passando-a depois pela parte inclinada. Após a incubação de 24 horas em estufa, muitas indicações podem ser dadas pelo simples exame do tríplice-açúcar aconselhado neste método.

4. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA

O sucesso do exame está em grande parte na dependência do número de colônias que são investigadas, sendo aconselhável isolar um mínimo de quinze colônias suspeitas. Todavia, a identificação posterior de todas essas colônias representa uma sobrecarga de trabalho muito grande, daí a ne-

cessidade de se introduzir um processo intermediário, econômico e pouco trabalhoso, que permita uma identificação presuntiva.

Diversos meios para esse fim têm sido propostos (KRUMWIEDE & COHN²², 1917; KLIGER³¹, 1918), quase sempre baseados na fermentação de dois ou três açúcares: dextrose, lactose e sacarose. Conforme as alterações do meio, pode-se separar facilmente as enterobactérias patogênicas que não fermentam — lactose e sacarose das saprófitas — que utilizam esses açúcares. Ao mesmo tempo, a inclusão da glicose permite verificar, para os não fermentadores da lactose e sacarose, se a bactéria é aerogênica ou não.

No decorrer de nossas investigações, o meio desse tipo usado foi o de três açúcares de Krumwiede, onde a bactéria investigada é semeada em profundidade na base e em superfície no ápice do meio. Entretanto, esse meio de triagem não diferencia bactérias

do grupo *Proteus* com as quais as salmonelas se confundem em alguns meios seletivos.

Necessário se fazia por isso procurar uma modificação que permitisse afastar também o grupo *Proteus* e em 1942 SURRECO & PEREIRA⁵⁴ descreveram um meio líquido para esse fim. Em nosso laboratório, as tentativas com esse meio não foram satisfatórias, motivo por que resolvemos experimentar uma modificação no tríplice-açúcar proposta por SINGER^{52, 53} (1950), que consiste na adição da uréia a este meio. Com 245 colônias examinadas obtivemos os seguintes resultados expressos no quadro X.

Como demonstra a análise do quadro X, as alterações indicando a necessidade de identificação posterior são em número muito menor quando se usa o meio de SINGER⁵², permitindo a exclusão de 33 colônias que no meio de Krumwiede simulavam salmonelas. Todavia, o indicador de fermentação proposto por SINGER⁵², às vezes tornava difícil a interpretação das viragens do meio. Por proposta do biólogo Ettore Rugai, responsável pela Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, foi substituído o indicador proposto por SINGER⁵² pelo indicador vermelho cresol, assim desaparecendo o

inconveniente apontado. Feita novamente a comparação, desta vez com número maior de colônias, obtivemos os resultados que estão reproduzidos no quadro XI.

A inclusão da uréia no tríplice-açúcar em nada prejudica a fermentação dos açúcares e dá uma importante informação que permite eliminar as bactérias do grupo *Proteus*.

A esse meio SINGER⁵³ (1950) propôs incluir também uma fonte de enxofre e um indicador permitindo também verificar se o germe é ou não produtor de gás sulfídrico, elemento muito importante para a caracterização das salmonelas.

Por mais de uma dezena de anos esse meio vem sendo usado em nosso serviço de rotina como meio intermediário para identificação presuntiva das enterobactérias sem que até hoje tenha mostrado qualquer inconveniente.

Outras versões do tríplice-açúcar modificado já foram divulgadas no Brasil, seja tornando mais fácil o seu preparo (BARACCHINI⁶, 1956) seja permitindo, além das informações acima descritas, verificar se a bactéria é móvel ou não (COSTA & VERNIN¹¹, 1955).

QUADRO X

Comparação entre tríplice-açúcar de Krumwiede e meio de Singer

Meio de cultura	N.º de colônias	Colônias suspeitas	% colônias identificadas
Tríplice-açúcar	245	37	15
Meio de Singer	245	4	1,6

QUADRO XI

Comparação entre o tríplice-açúcar de Krumwiede e o meio modificado

Meio de cultura	N.º de colônias verificadas	Colônias suspeitas	% de colônias identificadas
Tríplice-açúcar Krumwiede	1 200	145	12
Tríplice-açúcar Krumwiede modificado	1 200	7	0,5

QUADRO XII

Alterações do tríplice-açúcar

Enterobacterias	Ápice	Base
<i>Salmonella sp.</i> <i>Arizona</i> <i>Citrobacter</i>	Alcalino (vermelho)	Acidificação com bôlhas de gás e produção de H ₂ S (amarela com fundo prêto)
<i>Shigella sp.</i> <i>Providencia</i> <i>Salmonella typhi</i>	Alcalino (vermelho)	Ácida. Em 48 horas, produção de H ₂ S (amarela)
<i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella</i> — B ₆ <i>Providencia</i>	Alcalino (vermelho)	Acidificação com bôlhas de gás (amarela)
<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Cloaca</i>	Ácido (amarelo)	Acidificação com bôlhas de gás (amarela)
<i>Proteus</i>	Alcalino (vermelho)	Alcalina (vermelha)
Alcaligenes	Alcalino (vermelho)	Inalterada
Reações sem valor	Não altera. Acidificação e gás. Alcalinização sem gás	Não altera. Acidificação e gás. Alcalinização sem gás.

As alterações que ocorrem no tríplice-açúcar modificado ⁴⁴ e que possibilitam a identificação presuntiva estão resumidas no quadro acima.

III — IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

Não havendo características bioquímicas que abranjam tôdas as salmonelas, o critério a ser adotado é o de que nenhuma prova tomada isoladamente é suficiente para excluir ou incluir no gênero uma determinada bactéria, sempre havendo necessidade de comprovação sorológica.

Todavia, como as salmonelas do homem têm quase sempre um comportamento bioquímico bastante uniforme, a experiência tem

demonstrado que, através de um certo número de provas, podem ser identificadas com relativa segurança.

No quadro XIII estão transcritos os resultados relativos ao comportamento bioquímico de 180 sôro-tipos de salmonelas isoladas nestes últimos anos.

Como se pode observar nesse quadro, a utilização da lactose ou sacarose, a produção de indol ou o desdobramento da uréia são características que permitem excluir do gênero salmonella qualquer bactéria que apresente uma dessas propriedades.

Veza por outra, são encontradas enterobactérias que também sem comportam de maneira semelhante à descrita no quadro XIII.

QUADRO XIII
Identificação bioquímica

Substrato	N.º de cepas	Resultado	
		Positivo	Negativo
Glicose	180	100% (c/gás)	0%
Lactose	180	0%	100%
Sacarose	180	0%	100%
Sorbitol	180	98% (c/gás)	2%
H ₂ S	180	90%	10%
Citrato	180	87,2%	12,8%
Uréia	180	0%	100%
Índol	180	0%	100%

Pertencem ao mesmo grupo bioquímico e podem ser diferenciadas desde que outras atividades enzimáticas sejam investigadas, separando-as em três grupos: *Salmonella*, *Arizona* e *Citrobacter*.

No quadro XIV estão representados os resultados obtidos na diferenciação bioquímica dos grupos *Salmonella*, *Arizona* e *Citrobacter*, por meio de provas da nossa rotina de exame: utilização de dulcitol, de malonato e pesquisa da beta-galactosidase (O.N.P.G.) e soro-aglutinação.

A pesquisa da betagalactosidase, usando como substrato o ortonitrofenil-beta-D-galactopirâmido (O.N.P.G.), evidencia toda bactéria potencialmente fermentadora da lactose (LE MINOR³⁴, 1962), o que permite excluir do gênero *Salmonella* qualquer germe que tenha essa enzima, portanto todos os *Citrobacter* e alguns *Arizona*. Através da utilização do dulcitol e do malonato, é possível diferenciar os grupos *Salmonella* e *Arizona*.

No quadro XV estão relacionadas as alterações que ocorrem no triplice-açúcar e o caminho que deve ser seguido na diferenciação bioquímica, relaciona também as provas atualmente em uso em nosso laboratório e que permitem com razoável segurança identificar as várias enterobactérias que podem ser encontradas nas fezes. Nêles estão incluídas provas acessórias necessárias para diferenciação de outras enterobactérias e que também são de utilidade na identificação das salmonelas.

IV — IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

É baseada essencialmente na análise dos antígenos que compõem a bactéria. Como já foi dito, existem aproximadamente mil soro-tipos de salmonelas, o que torna difícil, a não ser para os chamados "Centros de Salmonelas", reconhecer todos os soro-tipos. Por outro lado, inquéritos feitos em vários países mostraram que 98% das infecções por salmonelas são devidas a um reduzido número de soro-tipos, o que torna possível a qualquer laboratório medianamente equipado realizar sua identificação.

A identificação propriamente dita pode ser dividida em duas etapas: 1.^a) em que são usados soros somáticos e flagelares polivalentes, onde estão presentes aglutininas para a maioria dos grupos de salmonelas; 2.^a) em que são empregados soros somáticos e flagelares dos quais foram retiradas, por absorção ou diluição, todas as aglutininas de grupo, tornando-os tipo-específicos.

A identificação é feita mediante provas de aglutinação em placa de vidro, quadriculada, que é colocada sobre uma caixa iluminada, tipo Huddleson, em cuja superfície se deposita uma gota de soro aglutinante e

QUADRO XIV

Enterobactérias	N.º de cepas	Dulcitol		Malonato		O.N.P.G.		Soro-aglutinação	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
<i>Salmonella</i>	40	40	0	0	40	0	40	40	0
<i>Arizona</i>	39	0	39	33	6	8	31	6	33
<i>Citrobacter</i>	45	45	0	0	45	45	0	0	45

QUADRO XV

	Uréia	H ₂ S	Indol	Citrato	V.M.	V.P.	Gela- lina	Manita (movimen- to)	Grupo	Beta-galacto- sidase	Dulcitol	Malonato
Ácido e gás na base. Produção de H ₂ S.	-	+	-	±	+	-	-	+	Salmonella	-	+	-
	-	+	±	±	+	-	+	+	Arizona	±	-	+
	-	+	-	±	+	-	-	+	Citrobacter	+	±	-
Ácido na base. Apice alcalino.	-	-	±	-	+	-	-	-	Shigella			
	-	-	+	-	+	-	-	-	Alkalescens-Dispar			
	-	-	+	+	+	-	-	+	Providencia			
	-	- ou + 48h							Salmonella typhi			
Ácido e gás na base. Apice alcalino.	-	-	-	-	+	-	-	+	Salmonella			
	-	-	-	-	+	-	-	-	Shigella — B ₆			
	-	-	+	+	+	-	-	+	Providencia			
Ácido e gás na base. Ácido no ápice.	-	-	+	-	+	-	-	+	E. coli			
	-	-	-	+	-	+	-	-	Klebsiella			
	-	-	-	+	-	+	(+)	+	Cloaca			
Apice alcalino. Base alcalina	+	±	+	±	+	-	±	+	Proteus			
Apice alcalino. Base não altera				+				+	Alcaligenes			

+ positivo;
- negativo;
(+) positivo tardio;

uma gota de suspensão da bactéria em solução fisiológica. Quando da verificação das aglutininas flagelares, é preferível utilizar bactérias cultivadas em meio líquido; usando-se meios de ágar comum, raspar a cultura junto à água de condensação. A reação em geral se processa dentro de um minuto principalmente se agitarmos a placa para melhor contacto.

PREPARO DOS SOROS

Para o preparo dos soros polivalentes somáticos e flagelares, seleciona-se uma série de salmonelas que abranja a totalidade dos antígenos somáticos e flagelares, o que é fácil, desde que se tenha à mão a tabela de Kauffmann-White (KAUFFMANN²⁰, 1966); EDWARDS & EWING¹⁸, 1955; HORMAECHE & PELEFFO²⁶, 1959.

Em geral são necessários 32 tipos de salmonelas. Transplanta-se cada uma das culturas para tubos de ágar inclinado e de caldo comum, os quais são incubados durante 24 horas a 37°C. É indispensável que as culturas utilizadas estejam lisas.

Antígeno flagelar: Mistura-se em um balão com pérolas de vidro o cultivo obtido em todos os tubos de caldo comum; agita-se por alguns minutos; centrifuga-se até que o sobrenadante fique completamente límpido ou ligeiramente opalescente. Decanta-se esse líquido (que é o antígeno a ser usado na preparação do soro flagelar polivalente) e se adiciona 0,5% de formol, verificando-se a esterilidade no dia imediato.

Antígeno somático: Colocam-se 2 cm³ de solução fisiológica estéril em cada um dos tubos de ágar comum semeados e suspende-se todo o cultivo. Retiram-se as emulsões dos vários tubos e misturam-se num frasco, autoclavando por duas horas em vapor fluente. No momento de usar, dilui-se em solução fisiológica estéril até a opacidade do tubo 6 da escala de MacFarland.

ESQUEMA DAS INOCULAÇÕES

Soro somático: fazer inoculações na veia marginal da orelha de um coelho com pêso mínimo de 2 kg, começando com 0,5 cm³ e aumentando 0,2 cm³ em dias alternados até o total de 5 injeções.

Soro flagelar: inocular na veia marginal do coelho em dias alternados, começando

com 0,6 cm³ e aumentando 0,1 cm³ nas injeções seguintes, até o total de 1,0 cm³.

Depois de 5 dias da última inoculação, fazer sangria de prova e verificar se o soro contém aglutininas para tôdas as amostras utilizadas em sua preparação. Caso não dê reação positiva para algumas delas, estas deverão ser inoculadas novamente no animal; em geral duas inoculações são suficientes. A prática de juntar ao soro polivalente aquêle que falta não é boa, porque algumas vezes provoca uma diluição excessiva. Estarão em condições de serem usados os soros que aglutinarem tôdas as amostras bacterianas que entraram na sua preparação.

Na verificação dos soros flagelares, é preferível usar como antígeno culturas em caldo comum, empregando-se o depósito do fundo do tubo. Os soros flagelares assim preparados reagem também como o antígeno somático, daí ser necessário absorvê-los com culturas autoclavadas ou verificar se diluições maiores são suficientes para não mais produzir aglutinação somática, conservando a aglutinação flagelar.

Para absorver qualquer soro, quase sempre são necessárias grandes quantidades de germes. Estes são semeados em ágar comum distribuído em fôrmas de alumínio com 25 cm de diâmetro. O crescimento é removido da superfície do ágar com espátula e colocado diretamente no soro a ser absorvido, deixando em contacto por 1 hora em banho-maria a 37°C e até o dia seguinte na geladeira, para depois centrifugar. Tal procedimento tem a vantagem de não diluir o soro. É difícil prever a quantidade de germes que vão ser consumidos na absorção e o método ainda é por tentativa e erro.

Quando a cultura reage com os soros polivalentes, a etapa seguinte é determinar sua composição antigênica somática com os soros do grupo "O". De acôrdo com o que foi dito anteriormente sobre a frequência dos soro-tipos nas infecções humanas, é quase sempre suficiente utilizar os grupos somáticos seguintes:

Antígenos somáticos	Grupo somático	Bactéria utilizada
2	Grupo A	<i>S. paratyphi</i> A
4 — 5	Grupo B	<i>S. typhimurium</i>
7	Grupo C ₁	<i>S. oranienburg</i>
8	Grupo C ₂	<i>S. newport</i>
9	Grupo D	<i>S. gallinarum</i>
10	Grupo E ₁	<i>S. anatum</i>
15	Grupo E ₂	<i>S. newington</i>
1 — 3 — 19	Grupo E ₄	<i>S. senftenberg</i>

A preparação dos soros somáticos grupo-específicos, obedece às mesmas regras seguidas para os soros polivalentes somáticos, empregando-se aqui somente uma amostra para cada grupo ou subgrupo.

Prontos os soros, verifica-se em lâmina a diluição máxima que é capaz de aglutinar rapidamente o antígeno correspondente; este será o título do soro. Conhecido o título, verifica-se se aglutina outras cêpas que possuem o mesmo antígeno, assim como as representativas de outros grupos. Não havendo reações cruzadas para outros grupos e aglutinando várias cêpas do seu grupo, está pronto para ser usado.

Havendo reações cruzadas com outros grupos, é necessário promover a retirada dessas aglutininas, o que se consegue absorvendo esse soro com aquela bactéria que aglutina inespecificamente. Isto é feito com a técnica descrita para os soros polivalentes, deixando em contacto o soro e a suspensão bacteriana por 1 hora em banho-maria a 37°C e até o dia seguinte na geladeira. A mistura soro-bactérias é centrifugada em alta rotação até que se obtenha um sobrenadante límpido. Dilui-se ao título anterior e verifica-se se continua aglutinando com as amostras desejadas e sem reações inespecíficas.

É evidente que para se obterem fatores específicos de subgrupos, sempre os soros têm que ser absorvidos. No grupo C, para preparar C₁ é preciso absorver com uma salmonela do subgrupo C₂. Para C₂, o processo é inverso. Para o grupo E com seus três subgrupos, o processo é o mesmo. Como não é fácil preparar um soro 19 característico do grupo E₄ (1 — 3 — 19), é preferível usar um soro 3-19, do qual se retira a fração 1 por absorção pela *S. paratyphi* A. Tendo-se soros dos grupos E₁ e E₂, onde se removeu a fração 3, é fácil identificar o grupo E₄, que dará uma reação positiva com o soro 3-19, mas não com os soros 10 e 15.

Identificado o grupo somático, recorremos à tabela de Kauffmann-White para verificar quais os antígenos flagelares que podem ocorrer em combinação com o grupo somático. Frequentemente é dispensável a pesquisa de todos os antígenos flagelares, porquanto apenas poucos tipos de salmonellas são encontrados comumente. Por exemplo: uma salmonela do grupo somático B será provavelmente *S. typhimurium*: daí verificar-se pri-

meiro os antígenos flagelares próprios desse tipo, antes de recorrer aos soros que indicam tipos mais raros.

As aglutinações flagelares também são verificadas em lâmina. Como antígenos usa-se cultura em caldo (depósito), ou de ágar úmido. Os soros aglutinantes são preparados do mesmo modo que o soro polivalente flogelar, usando-se cultura em que previamente o antígeno flagelar desejado é estimulado por passagens sucessivas em meio semi-sólido.

Sempre que possível, empregam-se raças monofásicas. Quando haja necessidade de usar uma amostra difásica, deve-se bloquear a fase que se deseja suprimir juntando, ao ágar semi-sólido, 0,5 cm³ de um soro aglutinante diluído a 1/5 que contenha o anticorpo flagelar correspondente ao antígeno que se deseja bloquear.

Com uma cêpa difásica semeada por picada na parte superior de um tubo de ágar semi-sólido ao qual se juntou o soro bloqueante, a fase correspondente ao soro será imobilizada, enquanto a outra se difunde pelo ágar semi-sólido. Com a chama do bico de Bunsen, funde-se a parte superior do ágar e se obtém no fundo a fase desejada. Como nem sempre é fácil fundir a parte superior do ágar, resolvemos empregar na indução das fases o método de CRAIGIE¹⁴, (1931) alterando a composição do ágar semi-sólido, ao qual adicionamos 0,5 g por mil de glicose e um indicador de azul de bromotimol e o soro aglutinante desejado. Com essa modificação, a motilidade do germe pode ser acompanhada pela viragem do meio de cultura. Considera-se cultura satisfatória quando capaz de dar a volta completa no tubo de Craigie em 24 horas.

A fase induzida é transplantada para um tubo de caldo comum e incubada 18 horas a 37°C e, em seguida, tratada do mesmo modo descrito na preparação dos soros polivalentes flagelares. As mesmas técnicas de indução de fase são usadas para tipagem dos soros-tipos.

Na obtenção de soros flagelares puros, quando se usa uma raça monofásica, muitas vezes não é necessário absorver; basta verificar qual a diluição em que não há mais aglutinação somática. Se não for possível eliminá-la por diluição, esse soro deverá ser absorvido com a mesma raça usada na sua preparação, previamente aquecida a 100°C

por 1 hora. Outra cêpa com a mesma composição somática, mas possuindo flagelados diferentes, também pode ser usada e, nesse caso, não é necessário aquecimento prévio.

Usando uma amostra difásica, mesmo com a fase induzida, é preciso também remover as que correspondem à fase bloqueada, muitas vezes presentes.

Nestes casos, as culturas usadas para absorver devem ter a mesma composição somática e os mesmos antígenos flagelares que se deseja suprimir. Por exemplo: na preparação do soro flagelar *i* utiliza-se *S. typhimurium* com a fase 1-2 bloqueada; êste soro deverá ser absorvido com *S. paratyphi* B que tem a mesma composição somática e flagelar de *S. typhimurium*, exceção dos antígenos da fase 1.

Quando o antígeno H se compõe de frações diferentes, como por exemplo: eh-enx, lv-gm-gp, etc., é necessário não só remover as frações somáticas como também parte do antígeno flagelar. Assim, para preparar a fração *p* (*S. dublin* 1-9-12; gp), absorve-se com *S. enteritides* 1-9-12; gm; nesses casos, quase sempre é necessário empregar uma maior quantidade de germes na absorção.

As amostras usualmente utilizadas para o preparo dos soros flagelares são:

<i>S. paratyphi</i> A	a
<i>S. paratyphi</i> B (monofásica)	b
<i>S. cholerae-suis</i> (fase 1)	c
<i>S. typhi</i>	d
<i>S. newport</i> (fase 1)	eh
<i>S. derby</i>	f
<i>S. enteritides</i>	g
<i>S. newport</i>	h
<i>S. typhimurium</i>	i
<i>S. london</i>	lv
<i>S. oranienburg</i>	mt
<i>S. dublin</i>	p
<i>S. paratyphi</i> B (fase 2)	2
<i>S. thompson</i> (fase 2)	5
<i>S. anatum</i> (fase 2)	6
<i>S. bredeney</i> (fase 2)	7

V — SALMONELOSES

As manifestações clínicas da salmonelose podem variar desde o portador assintomático até as septicemias fulminantes. Os quadros clínicos observados em geral se apresentam sob quatro modalidades: 1) gastroenterite; 2) bacteremia ou septicemia com ou sem localização extra-intestinal; 3) forma tífica ou febre entérica; 4) convalescente ou portador assintomático.

1. SALMONELOSES NA PRIMEIRA INFÂNCIA

a) *Infecções intestinais agudas (Gastroenterite)*

O desconhecimento relativo dos agentes responsáveis pelas diarreias agudas da primeira infância torna difícil qualquer medida profilática ou terapêutica e impossível qualquer estudo epidemiológico referente à salmonelose, incriminada por altas cifras de mortalidade nos países da América do Sul. Segundo MORAES²⁸ (1960) ocorrem anualmente no Brasil de 110 000 a 140 000 mortes de infantes, sendo que no município de São Paulo no quinquênio 1955-1959 ocorreram cerca de 14 000, por doenças diarreicas.

Com o fito de estabelecer em São Paulo a frequência dos mais importantes agentes etiológicos da diarreia da primeira infância, realizamos inquéritos em anos diferentes, nos quais a idade e a síndrome nem sempre foram as mesmas. Os dados referentes a êsses vários inquéritos estão condensados nos quadros XVI e XVII.

Para o mesmo grupo etário com a mesma síndrome clínica, dos 713 casos examinados, em 9,8% foram encontrados salmonelas.

Comparando as proporções dos vários grupos entre si, verifica-se haver uma diferença significativa apenas entre o grupo de 1945 e o de 1964, usando o método da prova bicaudal, nível de significância de 5% (valor crítico = 1,96), com correção para continuidade. Variando a síndrome clínica ou a idade dos pacientes, a incidência das salmonelas tornou-se muito baixa (quadro XVII).

QUADRO XVI

Frequência de enterobactérias reconhecidamente patogênicas

	Anos			
	1945	1956	1957	1964
Idade 1 mês até	5 anos	5 anos	5 anos	5 anos
N.º de casos	200	46	97	370
Síndrome clínica	aguda	aguda	aguda	aguda
<i>Salmonella sp.</i>	15%	15%	7%	5%
<i>Shigella sp.</i>	15%	15%	11%	10%
<i>E. coli G.E.I.</i>	—	19%	22%	23%
Negativos	70%	53%	60%	62%

QUADRO XVII

Frequência de enterobactérias reconhecidamente patogênicas

	Anos		
	1951	1954	1956
N.º de casos	300	92	307
Idade	até 5 anos	até 1 mês	até 1 mês
Síndrome clínica	Doença mitigada	Doença aguda	Doença aguda
<i>Salmonella sp.</i>	2%	1%	0,3%
<i>Shigella sp.</i>	7%	0%	0,0%
<i>E. coli G.E.I.</i>	—	17%	50,0%
Negativos	91%	82%	49,7%

Os sôro-tipos encontrados foram em número de 10, predominando *S. newport*. Os que tiveram distribuição mais uniforme nos diferentes anos foram: *S. typhimurium* e *S. derby*, como se vê no quadro XVIII.

Além da forma endêmica, foi-nos dado surpreender um surto epidêmico de gastroenterite ocorrido em um dos nosocômios da Capital. Graças à facilidade de se fazerem exames repetidos das crianças internadas, foi logo surpreendido após ter atingido cinco crianças. A fonte de contágio foi a água

usada no banho devido à prática de lavar várias crianças ao mesmo tempo na mesma banheira; o sôro-tipo responsável foi *S. derby*.

A incidência por nós assinalada é semelhante à de PELLUFFO *et alii*³⁹ (1946) em inquérito também realizado em São Paulo. Já os resultados de COSTA & BROOKING¹² o de Janeiro de MAROJA & LOWERY³⁷ (1956) em Santarém do Pará diferem não só quanto à frequência do germe como dos sôro-tipos encontrados.

QUADRO XVIII

Sôro-tipos encontrados

Sôro-tipo	A n o s					Total	%
	1945	1951	1956	1957	1964		
<i>S. newport</i>	15	2	1	1	2	21	30,0
<i>S. typhimurium</i>	5	2	2	1	2	12	17,1
<i>S. anatum</i>	3	1	1	—	—	5	7,1
<i>S. paratyphi B</i>	3	—	—	—	—	3	4,2
<i>S. derby</i>	2	1	2	2	6	13	18,5
<i>S. butantan</i>	—	—	—	1	1	2	2,7
<i>S. oranienburg</i>	—	—	—	1	1	2	2,7
<i>S. panama</i>	—	—	—	—	4	4	5,4
<i>S. dublin</i>	—	—	—	—	2	2	2,7
<i>S. montevideo</i>	—	—	1	—	1	2	2,7
<i>Salmonella sp.</i>	3	—	—	—	—	3	4,2
Total	31	6	7	6	19	70	

b) *Bacteremia ou septicemia com localização extra-intestinal*

Por uma combinação de fatores próprios da idade, são as crianças as vítimas prediletas das salmonelas pela facilidade de se exporem à infecção. Os quadros clínicos que determinam passam muitas vezes despercebidos, principalmente quando não são precedidos de manifestações entéricas.

Em geral, sobrevêm como complicação de uma enterite, mas podem ser determinados por penetração direta do germe na corrente circulatória através da faringe (HORMAECHÉ; PELUFFO & ALEPPO²⁴ 1936) ou por via pulmonar, como ficou bem demonstrado pelos trabalhos experimentais de CLEMMER *et alii*¹⁰ (1960) e de DARLOW; BALE & CARTER¹⁶ (1961) e clínicos de DATTA¹⁷ (1960).

Admitindo-se, conforme já demonstrado por HORMAECHÉ; PELUFFO & ALEPPO²⁴ (1936), que a enterite por salmonelas nas crianças é freqüentemente precedida de rino-faringite (sendo possível em tais casos, isolar salmonelas do exsudato da garganta) e

que nem sempre as infecções desse tipo se localizam no intestino, não é de estranhar a possibilidade do aparecimento de um estado septicêmico que pode condicionar localizações as mais variadas da enterobactéria (BORNSTEIN⁸ 1943; SAPHRA & WINTER²⁷ 1957).

No Brasil são raras as publicações referentes ao assunto. Em 1943 tivemos a oportunidade de descrever dois casos um relativo a uma panofthalmia com destruição do olho esquerdo de uma criança de 10 meses de idade que também apresentava quadro de broncopneumonia e outro referente a uma pleurite purulenta em criança de dois anos de idade. Do pus pleural foi isolada a *S. derby* e o sangue demonstrou aglutinação para essa bactéria até a diluição de 1/12 200⁵⁵.

Entre as manifestações extra-intestinais consideradas freqüentes, merece ser assinalada a localização meníngea, principalmente em recém-nascidos e prematuros. A literatura refere número elevado de casos, seja isolados ou em surtos epidêmicos, quase sempre determinados por implantação do germe em comunidade hospitalar (VELLOT & MQTET⁶³, 1950; BEENE; HANSEN & FULTON⁷

1951) conseqüentes à facilidade que têm êses microrganismos de se disseminarem quer por contacto direto, quer através de alimentos ou de objetos contaminados.

Entre nós, a ocorrência de casos isolados de meningite primária ou secundária por salmonelas tem sido assinalada (PESTANA & RUGAI⁴¹, 1940; BARACCHINI⁵, 1949) e os registros de exames do líquido cefalorraquidiano do Instituto "Adolfo Lutz" mostram que, apesar de não ser ocorrência freqüente, nos últimos 18 anos foram diagnosticados 28 casos isolados. De acôrdo com êstes dados, os tipos sorológicos responsáveis por estas infecções correspondem a: *S. typhimurium* (10), *S. newport* (5), *S. cholerae-suis* (3), *S. bredeney* (2), *S. anatum* (1), *S. oranienburg* (1), *S. dublin* (1), *S. butantan* (1), *S. panama* (1) e mais três casos cujos tipos não puderam ser identificados por se apresentar o germe rugoso.

Também nos foi dado observar (TAUNAY; BASTOS & MARTINS⁶¹, 1964) uma epidemia de meningite por *Salmonella* em crianças que, além de apresentar um número elevado de casos, mostra bem a importância do centro de tipagem de salmonelas para elucidar ocorrências dessa natureza. Em agosto de 1961 isolamos do líquido de um recém-nascido de 11 dias, internado no Hospital "Emílio Ribas", uma enterobactéria identificada como *S. grumpensis*. Três meses antes, havíamos recebido para identificação uma cultura correspondente a um caso de meningite purulenta do Hospital das Clínicas da U.S.P. e que também identificamos como *S. grumpensis*.

Nos meses seguintes e até maio de 1962 ocorreram mais 15 casos de meningite pelo mesmo agente etiológico que, à vista da informação de que procediam de zonas muito diferentes da cidade, fizeram com que acreditássemos estar face a uma epidemia diferente das até então descritas. Nas fichas clínicas do Hospital "Emílio Ribas" onde foram hospitalizadas as crianças, não constavam dados epidemiológicos esclarecedores, a não ser a residência dos seus responsáveis. Organizamos um pequeno inquérito epidemiológico onde procuramos verificar, entre outros dados, o local do nascimento, a assistência pré e pós-natal, bem como se a meningite fora precedida de disenteria ou se havia casos de disenteria entre os familiares.

Assim conseguimos localizar 13 familiares e, desde logo, verificamos um dado comum a todos os casos, isto é, o de que tôdas as crianças haviam nascido em uma mesma maternidade. Procurando a citada maternidade, verificamos que ali não havia referências a casos de infecção meningea e os quadros intestinais não eram em número maior do que habitualmente ocorre em hospitais dêsse tipo. Sugerido o exame das fezes de tôdas as enfermeiras e do pessoal atendente que de qualquer modo estivesse ligados aos cuidados dos recém-nascidos; de 32 pessoas foi isolada uma vez *S. newport*, não podendo portanto ser a responsável.

Indagando qual o tempo de permanência das parturientes na maternidade, fomos informados de que a média era de três dias, tempo insuficiente para que a infecção se manifestasse. Visitando os berçários, verificamos um número excessivo de leitos em cada berçário e a prática nada recomendável de atirar, no chão de ladrilhos, as fraldas servidas, o que nos levou a solicitar para exame o pó da varredura dos berçários, de onde conseguimos finalmente isolar a *S. grumpensis*.

Doze dias após a demonstração do germe na poeira da varredura, das fezes de um recém-nascido isolamos a mesma salmonela sem que fôsse possível encontrá-la novamente na varredura do chão. Uma semana depois, nôvo exame da varredura revelou que o germe ainda estava presente, apesar das medidas profiláticas que foram preconizadas. Nos dois meses seguintes não apareceram novos casos, quando êstes voltaram a ser diagnosticados em recém-nascidos de 8 dias nascidos na mesma maternidade. Nessa altura já havíamos constatado 24 casos com 22 óbitos.

Providências tomadas pela Secretaria de Saúde Pública e da Assistência Social determinaram o fechamento da maternidade e tôda ela foi desinfetada com formol até que os exames bacteriológicos das sementeiras do pó dos berçários não mais revelaram a presença de enterobactérias, o que ocorreu em 18 dias.

Do modo pelo qual o germe foi introduzido no berçário nada pudemos concluir. Sua presença, pelo menos por um período de 18 meses, deve ter sido conseqüência da má enfermagem e do acúmulo de crianças em espaço reduzido.

LEEDER³³ (1956), fazendo um estudo de epidemia semelhante a esta, mostrou que a criança, uma vez infectada, atua como foco de infecção por muito tempo. Se levarmos em conta o número de crianças nascidas na referida maternidade durante o período em que a bactéria esteve presente na poeira, podemos suspeitar de que grande número delas se tenha contaminado representando um foco importante de propagação da doença, e que foi confirmado pelo número elevado de casos (12) de gastroenterite por *S. grumpensis* que ocorreram em 1962 (quadro XXI pág. 64). Antes dessa data nunca havíamos isolado esse sôro-tipo e por informação pessoal do Prof. Ciro Peluffo, num dos autores que o identificou pela primeira vez num cobaio, diz não ter conhecimento de seu isolamento em casos humanos.

2. SALMONELOSES EM ADULTOS

a) *Gastroenterite*

A quase totalidade das salmonelas isoladas em nosso laboratório corresponde a casos isolados de gastroenterite; em surtos epidêmicos nunca nos foi dado verificá-la e no Brasil só temos conhecimento de duas ocorrências dessa natureza.

SILVA; SILVA & GUIMARÃES⁵¹ (1964) descreveram surto ocorrido em Salvador onde não foi possível isolar dos alimentos o agente responsável pela epidemia. Nos últimos meses do ano passado, foram-nos enviadas para identificação 26 cepas de salmonelas das quais 25 correspondiam a casos humanos de uma epidemia ocorrida entre os funcionários

de uma companhia de mineração do Amapá e uma isolada de uma lata de leite em pó usado na preparação de um sorvete. A sôro-tipagem de todas as cepas recebidas revelou tratar-se de uma *S. paratyphi C*, confirmando assim a origem da epidemia, uma vez que todos os doentes haviam consumido o referido sorvete.

O envio posterior de 15 latas de leite em pó da mesma procedência confirmou a presença de *S. paratyphi C* em uma das latas de onde o germe foi isolado em sementeira direta do leite sem necessidade de métodos de enriquecimento.

b) *Bacteremia com localização extra-intestinal*

Em nossa casuística foi uma eventualidade pouco comum, apenas duas vezes isolamos em adultos *S. oranienburg* (empiema pleural e abscesso peri-renal respectivamente).

c) *Forma tífica ou febre entérica*

A febre entérica não é freqüente em São Paulo, principalmente se compararmos sua frequência com a alta incidência da febre tifóide. Em cultivos de sangue realizados nestes últimos 4 anos, relativos a 5 937 casos suspeitos, obtivemos os resultados expressos no quadro XIX.

Já nos 8 anos anteriores, de 10 314 amostras de sangue foram isolados os seguintes sôro-tipos: *S. paratyphi A* (6), *S. choleraesuis* (5), *S. typhimurium* (1); *S. anatum* (1) e *S. newport* (1).

QUADRO XIX

Incidência relativa da *S. typhi* e outras salmonelas

Ano	N.º exames	<i>S. typhi</i>	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. reading</i>	<i>S. choleraesuis</i>
1963	1 287	91	2	—	—	—
1964	874	77	—	—	—	—
1965	1 305	105	1	—	—	—
1966	2 471	158	2	1	1	1
Total	5 937	431	5	1	1	1

Em hemoculturas provenientes também da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, GOMES & ARANTES²⁰ (1950), num período de 6 anos, isolaram do sangue 15 cepas de *S. cholerae-suis* var. Kuzendorf.

d) Portadores humanos

A fonte de infecção é quase sempre de hospedeiros (homem ou animal) que albergam o agente infeccioso e a transmissão se faz pela contaminação de alimentos ou pela ingestão de tecidos contaminados de animais doentes.

O conhecimento dos portadores é de máxima importância, uma vez que o controle das infecções por salmonelas se baseia na iluminação das fontes de infecção.

Infelizmente entre nós pouco se tem feito no sentido de levantar a incidência de portadores assintomáticos e os dados que possuímos são relativos a inquéritos com a finalidade de estabelecer a frequência de enterobactérias patogênicas entre a população normal ou a exames efetuados em portadores de enterocolopatias crônicas de variada etiologia.

Numa amostra abrangendo 1 552 habitantes de um município do interior do Estado, incluindo a população da zona urbana e rural, encontramos 6 casos positivos.

De 124 pacientes com enterocolopatias crônicas, em exames repetidos durante vários dias num período de 1 mês, foram isoladas 10 salmonelas, sendo que somente em um caso a mesma salmonela foi encontrada em 2 exames sucessivos, para uma média de 5 exames feitos em cada um dos pacientes.

Ainda em inquérito recente⁴⁸ (1966), com a finalidade de verificar portadores de bacilos tíficos nos contatos de convalescentes de febre tifóide, abrangendo um grupo de 165 pessoas num total de 990 exames, uma vez que foram repetidos 6 vezes, incluindo fezes e urina, foram isoladas 5 salmonelas, sendo importante notar que por 2 vezes foi isolada um *S. derby* da urina, sem estar presente nas fezes.

Ocasionalmente podem existir portadores de salmonelas nos quais o germe se localiza em outras cavidades naturais. Por um período de 15 anos temos isolado *S. typhimurium* da secreção nasal de um portador assintomático.

Os sôro-tipos encontrados nesses portadores foram os seguintes: *S. derby* (7), *S. anatum* (3), *S. newport* (4), *S. oranienburg* (1), *S. butantan* (2), *S. bredney* (1), *S. typhimurium* (1), *S. reading* (1), *Salmonella* sp. (1).

3. TIPOS DE SALMONELAS ISOLADAS NO MUNICÍPIO DE S. PAULO

Examinando as fezes de 35 705 indivíduos, na sua maioria adultos com e sem doença intestinal, num período de 17 anos, foram isoladas 720 salmonelas (quadro XX).

A frequência desses sôro-tipos variou nos diferentes anos de acordo com o quadro XXI

QUADRO XX

Sôro-tipos determinados em 17 anos

Sôro-tipo	N.º	%
<i>S. newport</i>	143	19,88
<i>S. anatum</i>	127	17,70
<i>S. typhimurium</i>	80	11,12
<i>S. derby</i>	72	10,01
<i>S. oranienburg</i>	5	7,64
<i>S. montivideo</i>	32	4,45
<i>S. paratyphi B</i>	30	4,17
<i>S. panama</i>	22	3,05
<i>S. butantan</i>	22	3,05
<i>S. bredney</i>	18	2,50
<i>S. grumpensis</i>	15	2,08
<i>S. senftenberg</i>	14	1,94
<i>S. reading</i>	13	1,80
<i>S. paratyphi A</i>	12	1,66
<i>S. london</i>	10	1,39
<i>S. give</i>	12	1,39
<i>S. paratyphi C</i>	4	0,55
<i>S. saint-paul</i>	2	0,27
<i>S. essen</i>	2	0,27
<i>S. rostock</i>	2	0,27
<i>S. enteritides</i>	2	0,27
<i>S. dublin</i>	2	0,27
<i>S. cholerae-suis</i>	1	0,13
<i>S. miami</i>	1	0,13
<i>S. havana</i>	1	0,13
<i>S. sendai</i>	1	0,13
<i>S. brandenburg</i>	1	0,13
<i>S. newington</i>	1	0,13
<i>S. newbrunswick</i>	1	0,13
<i>Salmonella</i> sp.	22	3,05

QUADRO XXI

Frequência dos sôro-tipos nos diferentes anos

	1950	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	total
<i>S. newport</i>	9	4	7	10	13	16	12	9	7	6	8	9	8	9	8	6	2	143
<i>S. anatum</i>	6	2	3	6	13	11	10	15	9	7	12	8	5	8	8	2	2	127
<i>S. typhimurium</i>	5	3	3	6	6	9	4	2	7	3	—	3	3	7	9	5	5	80
<i>S. derby</i>	2	—	1	9	4	6	6	6	4	6	1	2	6	2	4	7	6	72
<i>S. oranienburg</i>	1	—	1	8	1	6	4	—	2	3	6	2	7	5	5	4	—	55
<i>S. montevideo</i>	1	—	2	2	2	2	3	10	2	—	—	2	2	2	2	—	—	32
<i>S. paratyphi B</i>	—	2	—	4	1	—	3	1	1	1	6	2	1	3	5	—	—	30
<i>S. butantan</i>	1	—	1	3	1	1	4	—	—	—	—	2	—	4	5	—	—	22
<i>S. panama</i>	—	—	—	—	—	1	—	1	—	2	2	3	1	5	4	2	1	22
<i>S. bredney</i>	—	1	—	—	4	2	—	1	—	—	2	3	1	—	—	3	1	18
<i>S. grumpensis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	1	1	1	—	15
<i>S. senftenberg</i>	1	—	—	1	4	2	—	1	2	—	1	—	1	1	—	—	—	14
<i>S. reading</i>	—	—	—	—	—	3	1	1	1	—	—	—	—	—	—	3	4	13
<i>S. paratyphi A</i>	—	1	—	2	—	—	—	2	—	2	—	—	1	—	1	2	1	12
<i>S. london</i>	1	2	3	2	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	10
<i>S. give</i>	1	—	—	1	—	3	2	—	—	—	1	2	—	2	—	—	—	12
<i>S. paratyphi C</i>	—	—	—	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
<i>S. saint-paul</i>	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	1	—	3
<i>S. essen</i>	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>S. rostock</i>	1	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>S. enteritides</i>	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>S. dublin</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>S. cholerae-suis</i>	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>S. miami</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>S. havana</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>S. sendai</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>S. brandenburg</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>S. newington</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>S. newbrunswick</i>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Salmonella sp.</i>	2	3	3	5	4	—	—	—	—	—	—	2	1	1	—	—	—	21
Total	31	18	24	64	57	65	51	54	37	31	39	40	49	50	52	36	22	720

TAUNAY, A. E. — Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de S. Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 28:43-69, 1968.

Gráfico I

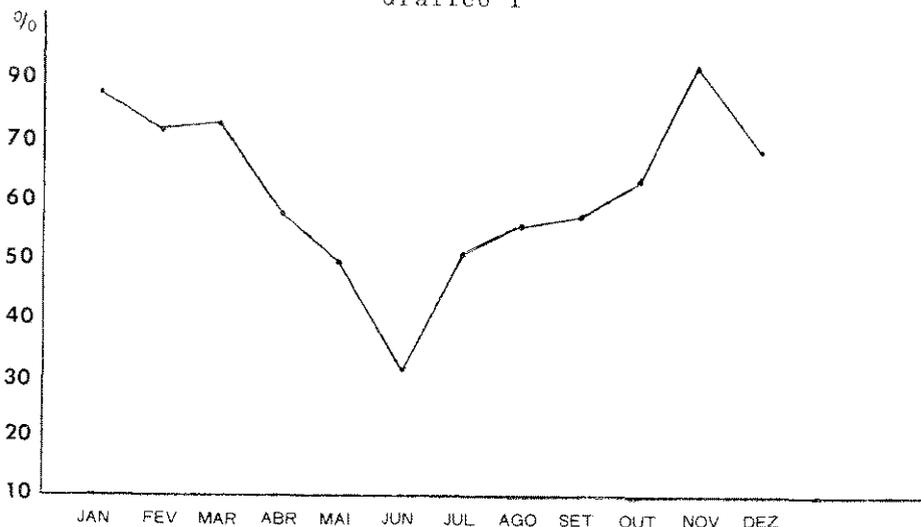
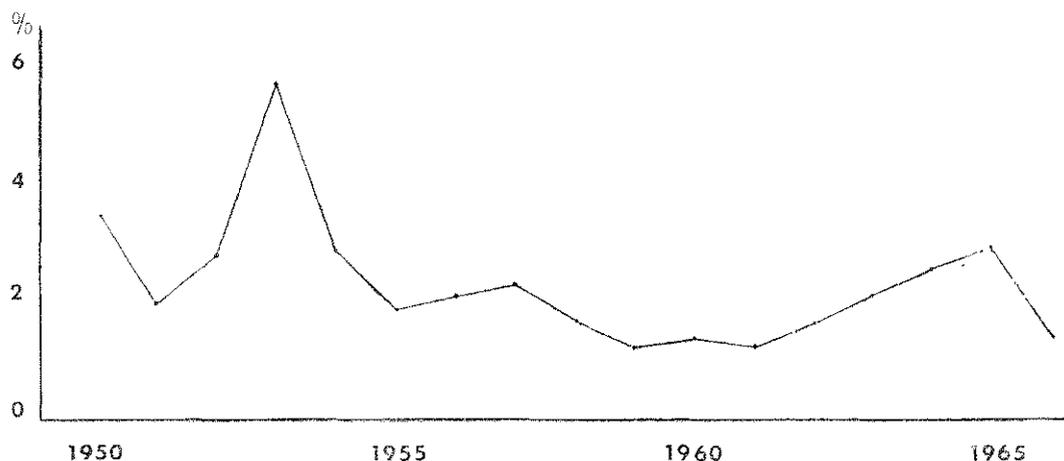


Gráfico II



O gráfico I mostra a sua distribuição nos diferentes meses e o gráfico II, nos vários anos.

De 1945 a 1966 foram identificadas em nosso laboratório 1 825 salmonelas provenientes de casos humanos, na sua maioria isoladas das fezes, algumas do sangue, líquido céfalo-raquidiano e de supurações diversas. Provinham na quase totalidade de material recebido para exame na Secção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e, em menor porcentagem, de culturas vindas para identificação. No quadro XXII estão agrupadas, segundo os grupos do esquema de Kauffmann-White.

O exame do quadro XXII confirma o que dissemos anteriormente sobre a possibilidade

de identificar a maioria das salmonelas isoladas do homem com um número reduzido de soros diagnósticos, uma vez que quase todas se enquadram dentro de poucos grupos sorológicos.

4. FONTES DE INFECÇÃO HUMANA

Sendo os animais o grande reservatório de salmonelas, o levantamento do grau de infestação tem interesse epidemiológico. Vários autores que se ocuparam do assunto em São Paulo encontraram salmonelas em animais (D'APICE¹⁵ 1943, PESTANA & RUGAI⁴² 1943, PENHA & ESQUIBEL⁴⁰ 1945) ou em carnes e seus derivados (ASSUNÇÃO⁴ 1946, PESTANA & RUGAI⁴⁸, 1947.

QUADRO XXII

Amostras identificadas em nosso laboratório

GRUPO A	N.º	%	GRUPO D	N.º	%
<i>S. paratyphi A</i>	34	1,83	<i>S. panama</i>	74	3,38
GRUPO B			<i>S. rostock</i>	4	0,20
<i>S. paratyphi B</i>	60	3,23	<i>S. dublin</i>	23	1,23
<i>S. typhimurium</i>	247	13,30	<i>S. sendai</i>	2	0,10
<i>S. derby</i>	168	9,05	<i>S. miami</i>	1	0,05
<i>S. reading</i>	33	1,77	<i>S. enteritides</i>	1	0,05
<i>S. bredney</i>	48	2,58	<i>S. mendoza</i>	1	0,05
<i>S. abartus-equi</i>	1	0,05	GRUPO E		
<i>S. brandenburg</i>	3	0,16	<i>S. anatum</i>	234	12,60
<i>S. essen</i>	2	0,10	<i>S. give</i>	45	2,42
<i>S. californica</i>	1	0,05	<i>S. butantan</i>	51	2,47
GRUPO C			<i>S. london</i>	14	0,75
<i>S. newport</i>	313	16,86	<i>S. senftenberg</i>	20	1,07
<i>S. oranienburg</i>	94	5,06	<i>S. newington</i>	1	0,05
<i>S. paratyphi C</i>	23	1,23	<i>S. grumpensis</i>	39	2,10
<i>S. montevideo</i>	46	2,46	GRUPO I		
<i>S. cholera-suis</i>	39	2,10	<i>S. gaminara</i>	1	0,05
<i>S. bonariensis</i>	3	0,16	GRUPO L		
<i>S. typhi-suis</i>	1	0,05	<i>S. minnesota</i>	1	0,05
<i>S. oregon</i>	1	0,05	<i>Salmonella sp.</i>	226	12,17
<i>S. havana</i>	1	0,05			

Examinas as fezes de 104 cães portadores de enterites agudas, dos quais por sete vezes encontramos *E. coli* G.E.I. dos grupos somáticos 111-86-55-128-26-25, tendo-se encontrado em um só uma salmonela (*S. anatum*). A incidência da salmonelose canina foi muito menor do que a observada em outros países; tal fato provavelmente decorre dos cães raramente serem alimentados com rações preparadas industrialmente, como é comum em outros países.

Sendo também as moscas incriminadas pela transmissão de doenças infecciosas, principalmente de infecções entéricas e não sendo ainda devidamente esclarecido o assunto, em 1957, procuramos verificar (COUTINHO; TAU-

NAY & LIMA¹⁹) que a importância da mosca como vetor de agentes patogênicos para o homem. De 185 lotes examinados, em 70,27% isolamos *E. coli*, sem nunca termos isolado uma enterobactéria patogênica; apesar de ser um dado sugestivo, não se lhe pode dar maior valor, em virtude de ter a *Musca domestica*, como criadouros preferenciais, excrementos de animais.

Apesar de contradizer a maioria dos autores que se preocuparam com o assunto, achamos razoável a opinião de HARDY & WATT²² (1948), quando afirmam que a mosca doméstica só influi na transmissão de infecções entéricas quando associada a abundante exposição de dejetos humanos.

Na mesma ocasião investigamos (TAUNAY; LIMA & COUTINHO⁵⁹ 1957), a presença de enterobactérias patogênicas em baratas; em 114 espécimes (20 pools) não encontramos salmonelas.

De resto, são informações esporádicas obtidas através de culturas que nos são enviadas para identificação: *S. typhimurium* de epizootias em cobaios, perus e galinhas.

VI — RESUMO

Após comparar métodos bacteriológicos diferentes, foi possível estabelecer uma rotina de trabalho que permite isolar e identificar com segurança os vários tipos de salmonelas mais freqüentemente responsáveis pelas infecções humanas.

Os resultados obtidos são comparáveis com os de outros autores que se ocuparam do mesmo assunto, seja na mesma região ou em outros pontos do país. Foi possível verificar serem as salmonelas de origem animal responsáveis por 9,8% das infecções gastrintestinais agudas que ocorreram em 712 crianças cujas idades variam de um mês até cinco anos, inquérito êste realizado em anos diferentes. Pudemos verificar que para outros grupos etários (recém-nascidos) ou nas formas mitigadas da doença, sua frequência é baixa. Êsse fato não leva à conclusão de ser o recém-nascido mais resistente porque constatamos que, havendo condições propícias, o contágio se processa facilmente e não raro sob formas septicêmicas graves.

A verificação de elevado número de portadores humanos mostrou que na região deve haver condições para disseminação da doença. Entre êstes, foram encontrados portadores eliminando o germe pela urina, fato para o qual não encontramos explicação.

Cães, mosmas e baratas não representaram foco importante de infecção na região em estudo. A observação atingiu um período de 17 anos, tendo sido examinadas as fezes de 35 705 indivíduos na sua maioria adultos com e sem doença intestinal, tendo sido isolados 720 salmonelas pertencentes a 19 sôrotipos diferentes; dêstes, os 4 mais freqüentes foram *S. Newport* (19,88%) *S. Anatum* (17,70%) *S. Typhimurium* (11,12%) e *S. Derby* (10,01%).

VII — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHARD & BENSUAUDE — Soc. Méd. Hôp. Paris 13:679, 1896. Apud Salmonella Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society For Microbiology⁴⁶.
2. ANDREWES, F. W. — Studies in group-agglutination. I. The salmonella group and its antigenic structure. J. Path. Bact. 25:505-21, 1922.
3. ASSUMPÇÃO, L. — Considerações gerais sobre as salmoneloses humanas e a constituição antigênica das salmonelas. Boletim do Instituto de Higiene de São Paulo, n.º 75, 1942.
4. ASSUMPÇÃO, L. — Pesquisa de bactérias do gênero salmonella em carnes e seus derivados vendidos a retalho. Arq. Hig. Saúde Pública 11:475-86, 1946.
5. BARACCHINI, O. — Salmonella Typhimurium isolada de um caso de meningite cerebrospinal. Rev. Inst. Adolfo Lutz 9:92-4, 1949.
6. BARACCHINI, O. — Identificação de enterobactérias: meio triplice açúcar modificado. Hospital 49:537-9, 1956.
7. BEENE, M. C.; HANSEN, A. E. & FULTON, M. — Salmonella meningitis: recovery from meningitis due to Salmonella sp. (type Montevideo), with consideration of problem of salmonella meningitis. Amer. J. Dis. Child. 82:567-73, 1951.
8. BORNSTEIN, S. — The state of the salmonella problem. J. Immun. 46:439-96, 1943.
9. CALAZANS, S. C. & PESTANA, B. R. — Emprêgo do ácido rosólico no isolamento e identificação dos bacilos do grupo coli-typhico-dysenterico em meios solidos. Mem. Inst. Butantan 7:285-302, 1932.
10. CLEMMER, D. I.; HICHEY, J. L. S.; BRIDGES, J. F.; SCHLISSMANN, D. J. & SHAFFER, M. F. — Bacteriologic studies of experimental airborne salmonellosis in chickens. J. Infect. Dis. 106:197-222, 1960.
11. COSTA, G. A. & VERNIN, C. S. — Sobre u'a modificação do meio de Monteverde. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 53:105-114, 1955.
12. COSTA, G. A.; COSTA, A. & BROOKING, C. — As shigeloses e salmoneloses na etiologia das diarreias agudas da criança. Bol. Inst. Puericul. 14:79-98, 1957.

13. COUTINHO, J. O.; TAUNAY, A. E. & LIMA, L. P. C. — Importância da *Musca domestica* como vector de agentes patogênicos para o homem. Rev. Inst. Adolfo Lutz 17:5-23, 1957.
14. CRAIGIE, J. — Studies on the serological reaction of the flagella of *B. Typhosus*. J. Immun. 21:417-511, 1931.
15. D'APICE, M. — Observações sobre o aborto contagioso das águas em São Paulo. Arq. Inst. Biol. 14:235-242, 1943.
16. DARLOW, H. M.; BALE, W. R. & CARTER, G. B. — Infection of mice by the respiratory route with *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. 59:303-8, 1961.
17. DATTA, N. — An outbreak of infection with *Salmonella typhimurium* in a general hospital. J. Hyg. 58:229-241, 1960.
18. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — Identification of enterobacteriaceae. Minneapolis, Burgess publ., 1955.
19. FICHER & MÜLLER — Apud ASSUMPÇÃO, L. 3.
20. GOMES, L. S. & ARANTES, M. — Sobre quinze amostras de *Salmonella choleraesuis* var. Kunzendorf, isoladas de sangue humano. Cormogênese dessa variedade em certos meios de cultura. Rev. Inst. Adolfo Lutz 10:89-92, 1950.
21. HARDY, A. V. & WATT, J. — Newer procedures in laboratory diagnosis and therapy in control of bacillary dysentery. Amer. J. Public Health 34:503-9, 1944.
22. HARDY, A. V. & WATT, J. — Studies of the acute diarrheal diseases. XVIII. Epidemiology. Public Health Rep. 63:363-378, 1948.
23. HARDY, A. V. & GALTON, M. M. — Salmonellosis: the role of food processing plants in the dissemination of *Salmonella*. Amer. J. Trop. Med. 4:725-730, 1955.
24. HORMAECHE, E.; PELUFFO, C. A. & ALEPPO, P. — Nueva contribución al estudio etiologico de las "diarreas infantiles de verano"; las *Salmonellas* en las enterocolites de la infancia. Arch. Urug. Med. Cir. Especialid. 9:113-162, 1936.
25. HORMAECHE, E. & SURREACO, N. L. — Estudio sobre el valor de los metodos de aislamiento de *Salmonellas* y *Shigellas*. Arch. Urug. Med. Cir. Especialid. 18:485-503, 1941.
26. HORMAECHE, E. & PELUFFO, C. A. — Laboratory diagnosis of *Shigella* and *Salmonella* infections. Bull. WHO 21:247-77, 1959.
27. KAUFFMANN, . — Die Technik der Typhenbestimmung in der typhys-Paratyphysgruppe. Zbl. Bakt. (Abs. 1) 119:152-60, 1930.
28. KAUFFMANN, F. — Weitere Erfahrungen mit dem Kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. Zeit. Hyg. Infektr. 117:26-32, 1935.
29. KAUFFMANN, F. — Enterobacteriaceae. 2. ed. Copenhagen, Munksgaard, 1954.
30. KAUFFMANN, F. — The bacteriology of enterobacteriaceae: collected studies of the author and his coworkers. Copenhagen, Munksgaard, 1966.
31. KLIGLER, I. J. — Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. J. Exp. Med. 28:319-22, 1918.
32. KRUNWIEDE, C. & KOHN, L. A. — A triple-sugar modification of the Russell double-sugar medium. J. Med. Research 37:225-7, 1917.
33. LEEDER, F. S. — An epidemic of *Salmonella panama* infections in infants. An. New York Acad. Sci. 66:54-60, 1956.
34. LE MINOR, L. — Le diagnostic de laboratoire des entérobactéries. 2. ed. St. Mandé, La Tourelle, 1962.
35. LIGNERES, J. — Rec. Méd. Vet. Paris 7:331, 1900. Apud SALMONELLA Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 46.
36. LOEFFLER — Zbl. Bakt. II, 129, 1892, Apud SALMONELLA Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology 46.
37. MAROJA, R. C. & LOWEREY, W. D. — Estudos sobre diarreias agudas. II. Frequência de *Shigellas* e *Salmonellas* nos casos de diarreia aguda em Santarém, Pará. Rev. Serv. Espec. Saúde Pública 8:585-9, 1956.
38. MORAES, N. L. A. — Epidemiologia das diarreias infantis. Bol. Inst. Pueric. 17:200-4, 1960.
39. PELUFFO, C. A.; BIER, O.; AMARAL, J. P. & BIOCCA, E. — Estudos sobre as salmoneloses em São Paulo. I. Incidência dos diferentes tipos de diarreias infantis. Mem. Inst. Butantan 19:211-5, 1946.
40. PENHA, A. M. & ESQUIBEL, A. — Novas observações de salmonelose bovina em gado importado, submetido à premunicação contra a "tristeza". Bol. Soc. Paulista Med. Vet. 7:73-86, 1945.

TAUNAY, A. E. — Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de S. Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz 28:43-69, 1968.

41. PESTANA, B. R. & RUGAI, E. — Salmonelas isoladas de líquido céfalo-raquidiano. An. Paulista Med. Cir. 39: 378, 1940.
42. PESTANA, B. R. & RUGAI, E. — O porco normal como portador de salmonelas. Rev. Inst. Adolfo Lutz 3:232-5, 1943.
43. PESTANA, B. R. & RUGAI, E. — Da presença de salmonelas nas carnes pré-preparadas. Rev. Inst. Adolfo Lutz 7: 5-7, 1947.
44. RUGAI, E. — Tríplice-açúcar modificado. Trabalho não publicado.
45. RUXS, A. C. — The isolation of typhoid, paratyphoid, and dysenteric bacteria from faeces and urine. A comparative study of some culture media. Brit. Med. J. 1:606-7, 1940.
46. SALMONELLA Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. The genus *Salmonella* Lignières, 1900. J. Hyg. 31: 333-50, 1934.
47. SAPHRA, I. & WINTER, J. W. — Clinical manifestations of salmonellosis in man: an evaluation of 779 human infections identified at the New York Salmonella Center. New Eng. J. Med. 256:1128-34, 1957.
48. SCHMID, A. W. — Contribuição para o conhecimento da epidemiologia da febre tifoide através da pesquisa de portadores. Tese apresentada à Faculdade de Higiene e Saúde Pública de São Paulo, BR, para concorrer à Cátedra de Epidemiologia. São Paulo, 1966.
49. SCHOTTMÜLLER — Apud ASSUMPCÃO, L.ª.
50. SCHÜTZE, E. — The paratyphoid B. group. Lancet 1:93-7, 1920.
51. SILVA, G. R.; SILVA, I. & GUIMARAES, C. C. — An outbreak of food poisoning due to salmonella typhimurium in a general hospital. I. Epidemiological features. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 6:258-67, 1964.
52. SINGER, J. — Culture of enterobacteriaceae. I. A practical medium containing urea, tryptone, lactose and indicators. Amer. J. Clin. Pathol. 20:880-3, 1950.
53. SINGER, J. — Culture of enterobacteriaceae. II. Use of urea triple-sugar agar. Amer. J. Clin. Pathol. 20:884-5, 1950.
54. SURRACO, N. L. & PEREYRA, V. R. — Nuevo medio de cultivo para el repicado de colonias en el aislamiento de salmonelas y shigelas. Arch. Urug. Med. Cir. Especialid. 21:518-32, 1942.
55. TAUNAY, A. E. & SILVA, M. B. — Salmonelose com localização extraintestinal. Rev. Inst. Adolfo Lutz 3:244-6, 1943.
56. TAUNAY, A. E.; CORRÊA, G. A. & FLEURY, C. T. — Meios de cultura para pesquisa de salmonelas intestinais. Rev. Inst. Adolfo Lutz 4:201-6, 1944.
57. TAUNAY, A. E. — Bacteriologia das shigeloses. Rev. Inst. Adolfo Lutz 11:49-102, 1951.
58. TAUNAY, A. E.; PONTES, J. F.; PRADO, E. & PEIXOTO, E. S. — Shigeloses: comparação de métodos de colheita das fezes no diagnóstico bacteriológico das enterocolites crônicas. Aglutininas e coproaglutininas na enterocolite crônica. Rev. Inst. Adolfo Lutz 16:37-61, 1956.
59. TAUNAY, A. E.; LIMA, L. P. C. & COU-TINHO, J. O. — Observações sobre a transmissão de agentes patogênicos para o homem por meio de baratas. Rev. Inst. Adolfo Lutz 17:25-32, 1957.
60. TAUNAY, A. E.; MARTINS, H.; TOPOROWSKI, J.; TOLEDO, L. A. & PEIXOTO, E. S. — Investigações laboratoriais sobre a enterite infantil por *E. coli* G.E.I. Rev. Inst. Adolfo Lutz 18:45-82, 1958.
61. TAUNAY, A. E.; BASTOS, C. O. & MARTINS, H. — Surto epidêmico de meningite por *Salmonella grumpensis*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 24:45-9, 1964.
62. THOMAS, M. E. M. — Disadvantages of the rectal swab in diagnosis of diarrhoea. Brit. Med. J. 2:394-6, 1954.
63. VELLOTT, J. & MATET, Y. — Les meningites a *Salmonella*. Paris Med. 40:213-7, 1950.
64. WEIL, E. & FELIX, A. — Untersuchungen über das Wesen der Fleckfieber agglutination. Wien. Klin. Wschr. 30:1509-11, 1917.
65. WHITE, B. — The salmonella group. In Inglaterra Medical Research Council. A system of bacteriology in relation to medicine. London, H. M. Stationat., 1929. v. 4, p. 86-158.

Recebido para publicação em 14 de outubro de 1968.

