

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

---

**BOLETIM N. 85**

**MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DO GÊNERO SALMONELLA**

**DR. LUCAS DE ASSUMPCÃO**  
Chefe de Serviço do Instituto de Higiene  
de São Paulo

— 1945 —  
IMPrensa OFICIAL DO ESTADO  
— SÃO PAULO —

## BOLETINS DO INSTITUTO DE HIGIENE

- N.º 1 — Sobre algumas medidas antimaláricas em Malaia (Dr. S. T. Darling) — 1919.
- N.º 2 — Pesquisas recentes sobre a opilação na Indonésia (Dr. S. T. Darling) — 1919.
- N.º 3 — Intoxicação pelo Betanaftol no tratamento da uncinariose (Dr. W. G. Smillie) — 1920.
- N.º 4-5 — O predomínio da *Leptospira ictero-hemorrhagiae* nos ratos de São Paulo — Bacilos semelhantes aos da peste encontrados nos ratos da cidade de São Paulo (Dr. W. G. Smillie) — 1920.
- N.º 6 — Ensaio de calorimetria alimentar (Drs. G. H. de Paula Souza e L. A. Wanderley) — 1921.
- N.º 7 — Existência e disseminação do *Ancilostoma duodenale* no Brasil (Dr. W. G. Smillie) — 1922.
- N.º 8 — A febre tifóide em São Paulo e o seu histórico (Dr. Emilio Ribas) — 1922.
- N.º 9 — Profilaxia do impaludismo no Brasil (Dr. Belisário Penna) — 1922.
- N.º 10 — Profilaxia das doenças venéreas (Dr. E. Rabello) — 1922.
- N.º 11 — Investigações sobre a uncinariose (Dr. W. G. Smillie) — 1922.
- N.º 12 — Estudo epidemiológico da febre tifóide em São Paulo (Dr. F. Borges Vieira) — 1922.
- N.º 13 — Estudo dos componentes do óleo essencial de quenopódio. Sua aplicação na profilaxia da ancilostomose (Dr. S. B. Pessoa) — 1923.
- N.º 14 — Valor da desinfecção na profilaxia das doenças infectuosas (Dr. F. Borges Vieira) — 1923.
- N.º 15 — Alimentação na idade escolar e pré-escolar (Dr. A. de Almeida Jor.) — 1923.
- N.º 16 — Investigações sobre alguns métodos para avaliação da capacidade respiratória (Dr. A. de Almeida Jor.) — 1923.
- N.º 17 — O Estado de São Paulo e alguns dos seus serviços de saúde pública (Dr. G. H. de Paula Souza) — 1923.
- N.º 18 — Algumas considerações sobre a mortalidade infantil em São Paulo (Dr. G. H. de Paula Souza) — 1923.
- N.º 19 — Serviço de Estatística Sanitária (Dr. G. H. de Paula Souza) — 1924.
- N.º 20 — Sugestões para a melhoria da Legislação Sanitária Estadual sobre gêneros alimentícios (Drs. G. H. de Paula Souza e Nicolino Morena) — 1924.
- N.º 21 — A prova de Schick na escola (Dr. F. Borges Vieira) — 1924.
- N.º 22 — A educação higienica na escola (Dr. Nuno Guerner) — 1924.
- N.º 23 — Contribuição ao estudo das reações biológicas na cisticercose (Drs. Gastão Fleury da Silveira, Samuel B. Pessoa e Clóvis Correia) — 1927.
- N.º 24 — Portadores de germes. Pesquisas de laboratório sobre as febres tifóide e paratifóide em São Paulo (Dr. A. Santiago) — 1927.
- N.º 25 — Sobre a reação de Kahn (Drs. F. Borges Vieira e Gastão Fleury da Silveira) — 1927.
- N.º 26 — Colesterinemia na lepra (Drs. J. M. Gomes, Carlos Leitão Filho e Alexandre Wancolle) — 1928.
- N.º 27 — Lepra (Dr. J. M. Gomes) — 1928.
- N.º 28 — Tentativa de seleção profissional (Dr. Monteiro de Camargo) — 1928.
- N.º 29 — Considerações sobre a epidemiologia de algumas doenças transmissíveis na cidade de São Paulo — Brasil (Dr. F. Borges Vieira) — 1928.
- N.º 30 — Sobre a nova técnica da reação de Kahn (Dr. Gastão Fleury da Silveira) — 1928.
- N.º 31 — Modificação do poder coagulante do soro sanguíneo no decurso da febre tifóide (Dr. Benjamin Ribeiro) — 1928.

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

---

**BOLETIM N. 85**

**MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DO GÊNERO SALMONELLA**

**DR. LUCAS DE ASSUMÇÃO**  
Chefe de Serviço do Instituto de Higiene  
de São Paulo

— 1945 —  
IMPrensa OFICIAL DO ESTADO  
— SÃO PAULO —

## MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO SALMONELLA

DR. LUCAS DE ASSUMPÇÃO  
Do Instituto de Higiene de São Paulo

### I — Considerações em torno das definições do gênero *Salmonella*.

Em 1900 LIGNIÈRES criou o termo *Salmonella* em homenagem a SALMON, tomando como tipo o bacilo da peste porcina (Hog-colera), estudado em 1885, nos Estados Unidos, por SALMON e SMITH.

Atualmente agrupam-se no gênero *Salmonella* bactérias que são, umas somente patogênicas para o homem, outras só para os animais, e ainda muitas que são patogênicas para os animais e também para o homem.

Por muito tempo as bactérias pertencentes a esse gênero foram classificadas pelas suas propriedades bioquímicas, principalmente pela fermentação dos hidratos de carbono, mas como na sua maioria as salmonelas apresentam reações bioquímicas quase iguais, o estudo sobre salmonelas e salmoneloses tem sido muito prejudicado.

A própria definição do gênero vem sofrendo modificações de ano para ano.

BUCHANAN (1918) agrupava no gênero *Salmonella* as bactérias com "a propriedade de fermentar a glicose com produção de ácido e gás, porém não a lactose". Como se vê, trata-se de uma definição extraordinariamente incompleta, existindo muitas bactérias intestinais que se poderiam enquadrar nesse gênero, o que de forma alguma seria possível.

CASTELLANI e CHALMERS, em 1919, melhoraram a caracterização do gênero, dando-lhe as seguintes propriedades: "fermentar completamente a glicose, porém, não a lactose, e parcial e totalmente a manita, além de outros hidratos de carbono, e não coagular o leite".

Em 1930, no Congresso da Associação Internacional de Microbiologia, reunido em Paris — e ao qual tivemos ocasião de assistir — a sua Secção de Taxonomia resolveu criar uma Comissão encarregada do estudo do género *Salmonella*, sendo designado para seu presidente H. H. SCHÜTZE (Lister Institute, Londres) e para membros dessa Comissão: KAUFFMANN (Copenhague), P. BRUCE WHITE (Londres), W. M. SCOTT (Londres), LIGNIÈRES (Buenos Aires) e JORDAN (Estados Unidos), servindo como Secretário R. ST. JOHN-BROOKS, de Londres. Em 1934 foram publicadas as conclusões, indicando elas que as salmonelas constituem um grande grupo de bacilos Gram negativos “não esporulados e relacionados sorologicamente”, com mais os caracteres seguintes: “não fermentam a lactose nem a sacarose, não coagulam o leite, não liquefazem a gelatina nem produzem indol, e fermentam a glicose geralmente com ou sem produção de gases. Todas as espécies conhecidas são patogênicas para o homem, para os animais, ou para ambos”.

Para a identificação dos diversos antígenos encontrados nas salmonelas, já existiam esquemas organizados por BRUCE WHITE na Inglaterra e por KAUFFMANN, mas apresentavam símbolos diferentes, de maneira que esses esquemas só poderiam ser consultados por meio de uma chave que desse a equivalência das suas letras e algarismos. A Comissão apresentou um esquema da composição antigênica das salmonelas, com a denominação de esquema de KAUFFMANN-WHITE (1934), no qual foi adotada a terminologia de KAUFFMANN. Este esquema foi em seguida universalmente aceito para a classificação das salmonelas em tipos, de acordo com a sua constituição antigênica e não pelas propriedades bioquímicas, aceitando a definição do género dada por WHITE, em 1929, que compreendia: “um grande grupo de bacilos Gram negativos não esporulados e relacionados sorologicamente, que não fermentam a lactose nem a sacarose, não coagulam o leite, não liquefazem a gelatina nem produzem indol, mas atacam a glicose geralmente com produção de gases, e outras vezes não. Todas as espécies conhecidas são patogênicas para o homem, para os animais, e às vezes para ambos”.

BERGEY, no seu “Manual of determinative Bacteriology”, até à quarta edição, publicada em 1934, definiu o género *Salmonella* baseando-se somente nas propriedades bioquímicas das bactérias que o compunham: “São móveis ou não. Encontram-se no canal intestinal em vários tipos de processos inflamatórios agudos. Atacam numerosos hidratos de carbono, com produção de ácido, ou ácido e gás, porem, não a lactose, sacarose e salici-

na. Não produzem, em geral, acetil-metil-carbinol". De acordo com a sua definição, BERGEY incluiu no gênero **Salmonella** espécies que a não são classificadas como salmonelas, tais como — **S. morgani**, **S. watareka**, **S. vekanda** etc..

Na quinta edição, publicada em 1939, BERGEY adota, no seu Manual, o critério da Comissão das salmonelas e apresenta a seguinte definição bioquímica das bactérias desse gênero: "Usualmente móveis, porém, podendo ocorrer formas imóveis. Atacam numerosos hidratos de carbono com a formação de ácido, e usualmente gás. Não fermentam lactose, sacarose e salicina. Não formam indol e não liquefazem a gelatina".

BERGEY, nesta edição, após definir o gênero, faz ver que a fermentação da lactose e sacarose, assim como a formação de indol e a liquefação da gelatina podem ser constatadas em espécies sorologicamente pertencentes ao gênero **Salmonella**, e que, por serem exceções muito raras, não invalidam a sua definição bioquímica do gênero. Resolveu, contudo, eliminar do gênero a **S. typhi** e **S. sendai**, mantendo-as no gênero **Eberthella**, ao qual se reúnem bactérias móveis que não produzem gás nos hidratos de carbono, o que BERGEY julga de grande valor prático na identificação. Pelas mesmas razões exclue **S. gallinarum**, que por ser imóvel e não produzir gás é classificada no gênero **Shigella**.

De fato, KRISTENSEN e KAUFFMANN (1935) obtiveram variantes de **S. eastbourne** que produzem indol; existem variantes de **S. anatum** que fermentam a lactose, embora tardiamente; e ainda salmonelas que liquefazem a gelatina: **S. dar-es-salaam**, **S. schleissheim** e **S. abortus ovis**.

Em setembro de 1939, reuniu-se em Nova York o Terceiro Congresso Internacional de Microbiologia — ao qual também estivemos presentes — tendo sido organizada a **Salmonella Subcommittee**, com os seguintes elementos: H. SCHÜLZE, P. BRUCE WHITE, F. KAUFFMANN, V. M. SCOTT, R. St. JOHN-BROOK (Secretário), todos membros da Comissão anterior; e mais E. HORMAECHE (Montevideo), P. R. EDWARDS (Lexington, Estados Unidos) e M. TESDAL (Oslo), que organizaram um novo esquema, conhecido por **Esquema de Kauffmann-White** de 1939.

Este esquema é uma simplificação do esquema publicado em 1934 pela **Salmonella Subcommittee**. Ele apresenta as seguintes modificações:

- 1) Foram suprimidos os seguintes tipos de salmonelas ou variantes: **S. typhi-murium** var. **binns**, variante não específica de **S. typhi-murium**; **S. cholerae suis** var.

knnzendorf, variante não específica de *S. cholerae-suis*; *S. typhi sui* var. *voldagsen*, variante não específica de *S. typhi suis*; *S. thompson* var. *berlin*, variante não específica de *S. thompson*; *S. newport* var. *puertorico*, variante não específica de *S. newport*; *S. enteritidis* var. *danzsz*, variante cultural de *S. enteritidis* e *S. pullorum* por ser uma variante cultural de *S. gallinarum*.

- II) De outro lado, algumas salmonelas antes indicadas como variantes foram incluídas como tipos: *S. kottbus*, *S. dublin*, *S. rostock*, *S. moscow* e *S. muenster*.
- III) Fatores de pouca importância no diagnóstico diferencial foram abandonados, não fazendo parte do esquema, como os fatores "3" e "4" das fases não específicas.
- IV) As fases dos antígenos "H" do novo Esquema Antigênico são designadas por fase 1 e fase 2.
- V) Só são consideradas as fases que ocorrem nos meios usuais; ao passo que as obtidas em culturas com soros imunes, são consideradas como fases artificiais, não lhes podendo ser atribuída importância, sendo omitidas, como, por exemplo, "e", "g", "j" de *S. typhi* e "z5" de *S. schleissheim*.
- VI) O Esquema Antigênico é apenas um quadro para determinação diagnóstica e não para classificação de todos os antígenos existentes.

Esta Subcomissão ainda propôs se modificasse a definição genérica bioquímica das salmonelas, visto que, de acordo com as mais recentes investigações, entre elas podem ser encontrados tipos ou variantes produzindo indol, fermentando a lactose e liquefazendo a gelatina. A definição genérica de BRUCE WHITE (1934), aceita pela "Salmonella Subcommittee" daquela época: — "deixando de fermentar lactose e sacarose, de coagular o leite, de liquefazer a gelatina ou produzir indol; atacam regularmente glicose etc.", propõe a Subcomissão de 1939 se modifique para: — "não fermentam a sacarose, não coagulam o leite e raramente fermentam a lactose; liquefazem a gelatina ou produzem indol, atacando regularmente a glicose etc.", ficando deste modo definido o gênero **Salmonella**.

Mas ainda é preciso levar em consideração o fato seguinte: há bactérias que se assemelham às salmonelas, pela sua constituição antigênica, apresentando antígenos somáticos e ciliares,

como, por exemplo, certas raças dos gêneros **Escherichia**, **Eberthella**, **Shigella**, e mesmo **Pasteurella**, que apresentam relações sorológicas com as salmonelas, em razão de possuírem alguns de seus antígenos. Isso mesmo foi demonstrado por Schutze, que revelou a existência de antígenos somáticos das salmonelas do grupo B na **P. pseudotuberculosis**.

De acordo com a opinião mais recente de KAUFFMANN, (1) a modificação adotada pela Subcomissão (1939) ainda não satisfaz, porquanto realmente não separa o grupo das salmonelas de outros grupos, além de não levar em consideração as observações que ultimamente têm sido feitas, e que dizem respeito ao fato de terem sido encontrados antígenos somáticos em bactérias pertencentes a outros gêneros.

Levando em consideração esses fatos, KAUFFMANN propõe a seguinte definição: "Salmonelas são bactérias Gram negativas, as quais, pela sua estrutura antigênica podem ser colocadas no Esquema de KAUFFMANN-WHITE".

Podem ainda surgir bactérias com fórmulas antigênicas não assinaladas no esquema — que apresenta antígenos especiais para cada grupo — sendo possível apresentarem elas antígenos desconhecidos.

São também importantes os estudos mais recentes de bactérias coliformes isoladas do homem e principalmente de casos patológicos de animais. Estas bactérias diferem das salmonelas pelas suas propriedades bioquímicas, fermentando lentamente a lactose, fermentando com produção de gás a glicose, manita e maltose, mas não a sacarose. Liquefazem lentamente a gelatina, sendo vermelho de metila positivas e Voges-Prokauer negativas, produzindo grande quantidade de H<sub>2</sub>S e não dando inóculo. Trata-se de organismos da família **Enterobacteriaceae**, cujas propriedades bioquímicas não coincidem com as de nenhuma bactéria atualmente conhecida dessa família, mas que ainda não justificaram a criação de um novo gênero.

KAUFFMANN, em diversos estudos, e mais recentemente PELUFFO, EDWARDS e BRUNER (2) e EDWARDS, CHERRY e BRUNER (3), sobre os paracolis, têm discutido a questão. Parece tratar-se de um grupo intermediário entre os colis e as salmonelas, aproximando-se destas aqueles que esses trabalhos têm demonstrado possuírem antígenos somáticos e cílios a elas relacionados.

Continua, contudo, aberta a questão: devem essas bactérias ser consideradas colis ou salmonelas?

Os novos conhecimentos sobre o assunto vão tornando cada vez mais difícil uma definição capaz de marcar claramente os

limites do gênero **Salmonella**. Ainda não se sabe qual o critério que predominará, se o bioquímico ou o sorológico. No caso deste ser unicamente admitido, teríamos de classificar como salmonelas a maioria dos colis com antígenos a elas relacionados, e mesmo espécies muito afastadas, como a **P. pseudotuberculosis**, que possui antígenos somáticos do grupo B.

Em suma: atualmente o critério a seguir na classificação das espécies do gênero **Salmonella** deve basear-se, de um lado, nas propriedades bioquímicas que dão um certo limite ao gênero, de outro, no estudo da sua constituição antigênica, confluindo ambos para a identificação da espécie ou tipo dentro do gênero **Salmonella**.

## II — Métodos de enriquecimento e isolamento.

### 1 — Enriquecimento.

O aperfeiçoamento dos meios especiais de cultura deram um grande impulso ao estudo das bactérias do gênero **Salmonella**.

Com os estudos de Mueller (1923) (4) começaram a aparecer meios mais indicados ao isolamento de bactérias desse gênero.

KAUFFMANN (1930) (5) apresentou um meio com verde brilhante e tetrationato de sódio, que facilita o desenvolvimento de salmonelas na presença de grande quantidade de colis. A ação impediante deste meio é maior para as bactérias coliformes de origem fecal do que para as do gênero **Aerogenes**, nele ainda se desenvolvem bactérias dos gêneros **Proteus**, **Pseudomonas**, **Alcaligenas** etc., que interferem no isolamento das salmonelas em meio sólido, como veremos adiante. Acresce mais: praticamente o meio ainda impede o desenvolvimento da flora bacteriana Gram positiva.

O meio de KAUFFMANN tem sido o mais usado até esta data para o enriquecimento de qualquer material contaminado do qual se queira isolar salmonelas.

É o meio que usamos.

Prepara-se da seguinte maneira:

**Meio de enriquecimento de KAUFFMANN.** Tetrationato original: Por em um recipiente 50 c. c. de carbonato de cálcio e esterilizar na autoclave. Ajuntar 900 c. c. de caldo simples, esteril, e em seguida 100 c. c. de uma solução de ipossulfito de sódio, esterilizada na autoclave (500 grs. de ipossulfito + um litro de água). Ajuntar 20 c. c. de solução (iodo-iodurada (iodo 20 grs., iodureto de potássio 25 grs., água q. s. 100 c. c.)). Operar assepticamente, pois o meio não deve ser aquecido.

Para se obter o meio "K": A 1000 c. c. de tetracionato original ajuntar 10 c. c. de solução aquosa de verde brilhante a 1% e 50 c. c. de bilis de boi esterilizada. Repartir em tubos estereis na quantidade de 10 a 15 c. c. por tubo, agitando continuamente para evitar a sedimentação do carbonato de cálcio. Controlar a esterilidade do meio deixando os tubos vários dias na estufa a 37°C.

**Meio de enriquecimento de LEIFSON-Selenito-F.** Outro meio usado para enriquecimento de bacilos tífico e paratíficos, também aconselhado no enriquecimento para isolamento de salmonelas em geral, é o de LEIFSON-Selenito-F. (6).

LEIFSON denominou de meio Selenito-F a um meio líquido próprio para enriquecimento de bacilos tífico e paratíficos das fezes e urina, com a seguinte composição:

	Por cento
Fosfatos de sódio (anídricos) . . . . .	1,0
Peptona . . . . .	0,5
Lactose . . . . .	0,4

É preciso determinar experimentalmente as proporções exatas do monofosfato e do difosfato de sódio, sendo que, com a peptona e o selenito de sódio usados, o meio deverá apresentar o pH 7,0. Repartir em tubos; esterilizar na autoclave aberta durante 30 minutos, evitando temperaturas mais altas, que prejudicam o meio.

No caso de se usar um só meio de enriquecimento — como geralmente fazemos — é preferível lançar mão do de KAUFFMANN. Esta é também a opinião de HORMAECHE e SURRACO (7), que dizem: "Usando el medio al selenito, además del tetracionato, aumentamos el número de positivos en un 20% aunque en valor absoluto el primero sea inferior al segundo. Igualmente resulta clara la ventaja de hacer dos aislamientos a partir del medio "K", uno a las 24 horas y otro a los 5 días".

Fazemos, geralmente, dois isolamentos: um após 24-48 horas e outro no 5.º dia; mas, em muitos casos, temos obtido melhores resultados fazendo passagens sucessivas — do primeiro tubo para um segundo e deste para um terceiro tubo do meio K.

## 2 — Isolamento.

Quando se procura isolar, diretamente em placas, salmonelas de qualquer produto contaminado, apenas se obtém resultado no caso delas existirem em grande quantidade, principalmente quando são empregados os meios que tão amiúde se usa para esse isolamento, como placas de MAC CONKEY, agar-lactose-

tornasol, Endo, agar-ácido rosólico etc.. O abundante crescimento dos colibacilos nestes meios, como principalmente o de bactérias do gênero **Proteus** — na sua variação H, de WEIL e FELIX — invadem a placa, impossibilitando o isolamento de colônias puras de outro germe. Ainda mais: mesmo nos melhores meios de enriquecimento — como os retro referidos — não se desenvolvem só as salmonelas, mas também as múltiplas espécies dos gêneros **Proteus**, **Pseudomonas**, **Alcaligenes** etc., e algumas espécies mais resistentes do grupo coli-aerogenes.

Conseqüentemente, convem usar meios de isolamento que impeçam ou dificultem o desenvolvimento das bactérias que, além das salmonelas, cresçam nos meios de enriquecimento.

O método de isolamento que geralmente dá melhores resultados, é o indicado por KAUFFMANN em 1930, seguido também por HORMAECHÉ e seus colaboradores, com ligeiras modificações.

Consiste o método de KAUFFMANN no enriquecimento em meio "K" e isolamento nos 1.º e 5.º dias de incubação a 37º, em placas, no meio de KRISTENSEN, LESTER e JÜRGENS.

No meio de KRISTENSEN há grande inibição de bactérias do gênero **Proteus** e coliformes. As bactérias normalmente ciliadas, desenvolvem-se em sua variante "O", não invadindo, portanto, o meio. O bacilo piocianico cresce dando colônias semelhantes às das salmonelas. As culturas obtidas de colônias isoladas desse meio são muitas vezes impuras, porque algumas espécies — principalmente **Proteus** — embora inibidas, mantêm-se vivas, desenvolvendo-se nas culturas seguintes. Há, contudo, a grande vantagem do forte poder impediante sobre os coliformes e, mais ainda, sobre bactérias do gênero **Proteus**, as quais, quando presentes, invadem todas as placas dos outros meios, não permitindo isolamento de colônias suspeitas para identificação. Ainda mais: quando no meio de KRISTENSEN raramente vegetam bactérias do gênero **Proteus**, estas se apresentam em colônias redondas, circunscritas, não invadindo o meio, isto é, na sua variante "O".

O meio de KRISTENSEN é, de fato, dos conhecidos até esta data, o melhor para isolamento de salmonelas, como o de LEIFSON (agar-desoxicolato-citrato) para o isolamento de shigelas. Contudo, tanto o meio de KRISTENSEN para salmonelas, como o de LEIFSON para shigelas — impedem o desenvolvimento, aquele, de algumas salmonelas (**S. abortus equi**, **S. typhi suis** etc.), este, de várias shigelas (ligeiro impedimento de **Sh. dysenteriae**, e ainda mais de **Sh. ambigua**, **Sh. alkalescens**, etc.).

**Meio de KRISTENSEN; LESTER e JÜRGENS, modificado por HORMAECHE (8)** (Agar-lactose-sacarose-verde brilhante verm. fenol):

Extrato de carne (Liebig) .....	5 gr.
Peptona (Witte ou Bacto) .....	10 "
Clorureto de sódio .....	5 "
Lactose .....	10 "
Sacarose .....	10 "
Solução de vermelho de fenol ....	40 "
Água destilada .....	1000 c.c.

Juntar ao meio fundido, antes de repartir em placas, 1,5 c.c. por litro de uma solução aquosa de verde de brilhante (Grübler) a 0,5%.

Fórmula da solução de vermelho de fenol:

Vermelho de fenol .....	1 gr.
Soda N/10 .....	40 "
Água destilada .....	460 c.c.

O meio de KRISTENSEN, adotado e modificado por KAUFFMANN, não contém sacarose, mas somente lactose a 1,5%. HORMAECHE ajunta sacarose ao meio, na proporção de 1 por cento, reduzindo a lactose à mesma proporção. A sacarose permite eliminar alguns colis que se desenvolvem no meio, fermentando esse hidrato de carbono mas não a lactose, em 24 horas. Ela deve ser acrescentada ao meio sem ser aquecida, usando-a HORMAECHE em solução esterilizada com clorofórmio a 20%. As nossas soluções de lactose e sacarose são esterilizadas por filtração em filtros Seitz.

**Meio de agar-lactose-sacarose-verde brilhante-ácido rosólico.**

Este meio — ao qual damos preferência no isolamento de salmonelas após enriquecimento no meio K — é o que propomos, resultando de uma combinação por nós feita dos meios de KRISTENSEN modificado por HORMAECHE e das placas de agar-ácido rosólico de CALAZANS-RANGEL PESTANA (9).

Extrato de carne .....	5 gr.
Agar .....	30 "
Peptona .....	10 "
Lactose .....	10 "
Sacarose .....	10 "
Sol. de ácido rosólico a 1% .....	10 c.c.
Sol. de verde brilhante a 0,5% ....	2 c.c.
Água destilada .....	1000 c.c.

Colocar em uma panela 900 c. c. de água destilada e o agar, reservando 100 c. c. para dissolver os outros ingredientes. Dissolver o agar deixando-o impregnar-se, durante 15 minutos, no mínimo, e fundir por ebulição na autoclave sem pressão, durante 20 minutos. Dissolver o extrato de carne e a peptona nos 100 c. c. da água reservada, aquecendo em banho-maria. Misturar as duas partes e restabelecer com água destilada o volume para um litro. Em seguida titular com solução N/20 de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ajustando ao pH 7,6-7.8. Autoclavar a 121°C. durante 5 a 10 minutos. Filtrar em algodão no funil à filtração quente ou na autoclave. Esterilizar 20 minutos, a 121°C. Ajuntar, enquanto o meio estiver fundido, as soluções estereis de lactose e sacarose não aquecidas (usamos as soluções a 20%, filtradas em filtro Seitz), e as soluções de ácido rosólico (1 gr. dissolvida em 100 c. c. de alcool a 50°) e verde brilhante. Distribuir em placas.

Neste meio os proteus quando vegetam não o invadem e os que fermentam a sacarose dão colônias amarelas; os colis não crescem e as salmonelas vegetam bem, dando colônias da cor do meio.

Nas considerações retro referidas sobre as vantagens e desvantagens do meio de KRISTENSEN, vimos que mesmo entre as colônias perfeitamente separadas, as culturas delas obtidas não raro são impuras, fato igualmente observado no meio com ácido rosólico e verde brilhante que acabamos de apresentar. Por consequência, recomendamos se faça reisolamentos a partir das colônias isoladas desses meios, em placas de agar-lactose-tornasol. Tanto nos exames diretos, como naqueles após enriquecimento, além do material ser passado nas placas com um dos meios de isolamento que acabamos de indicar, é conveniente, ainda, fazê-lo passar em placas de agar-lactose-tornasol, meio que, por não conter substâncias inibidoras, dará colônias puras. Se no material semeado houver bactérias do gênero **Proteus**, estas invadirão o meio, fato reconhecível pelo "Hauch" característico, o que então impossibilitará o isolamento de colônias puras. Convem lembrar ainda os lentos fermentadores; mas o problema fundamental é a diferenciação rápida entre **Proteus** e **Salmonella**. Quando o material semeado nas placas de agar-lactose-tornasol revelar a presença do **Proteus**, invadindo a superfície do meio, há indicação de se fazer reisolamentos das colônias isoladas.

### III — Provas bioquímicas para a determinação do gênero **Salmonella**.

#### 1 — Provas bioquímicas preliminares.

As colônias suspeitas, obtidas dos meios de isolamento, de-

vem ser submetidas às provas fundamentais bioquímicas que caracterizam o gênero **Salmonella**.

No caso da pesquisa ser unicamente de salmonelas — que é o assunto de que estamos tratando — pode-se passar diretamente à identificação das colônias obtidas, porquanto, sendo elas isoladas dos meios de KRISTENSEN ou de agar-lactose-sacarose-verde brilhante-ácido rosólico, retro referidos, não se apresenta o problema das bactérias do gênero **Proteus**, que são geralmente inibidas.

Acontece, porem, que nos exames comuns de fezes dos casos com perturbações intestinais, as pesquisas são comumente de bactérias dos gêneros **Salmonella** e **Shigella**, dependendo do meio ou meios usados o diagnóstico da disenteria. Nestes casos, o material, após enriquecimento ou diretamente, deverá ser semeado em placas de um dos meios seguintes: agar-lactose-tornasol, desoxicolato-citrato (LEIFSON) (10), KRISTENSEN, ou verde brilhante-ácido rosólico. Placas de agar-lactose-tornasol são ainda de grande utilidade (devido a não terem substâncias inibidoras), porquanto, nos outros meios, algumas shigelas e salmonelas não crescem.

O meio de desoxicolato-citrato de LEIFSON é altamente seletivo para shigelas (tambem servindo para salmonelas); ele inibe os coli-bacilos mas não as bactérias do gênero **Proteus**. Estas, no entanto, desenvolvem-se na forma "O", sendo as suas colônias semelhantes às das salmonelas. Mais de metade das vezes, as colônias isoladas como suspeitas de **Salmonella** ou **Shigella** são de **Proteus**, bactérias muito comuns nas fezes, e que teriam de ser submetidas a provas preliminares de identificação bioquímica. Para eliminar tão grande e inútil trabalho, julgamos indispensável o conhecimento de alguns meios que estabeleçam a diferenciação rápida entre **Salmonella** e **Proteus**.

SURRACO e PEREYRA (11) estudaram muito bem o assunto, tendo verificado que o único meio recomendável para esse fim seria o de SOSA (12). Aham, contudo, que esse meio utiliza para reconhecimento dos **Proteus**, de sua atividade proteolítica e que esta é de intensidade variável, o que dificulta obter-se resultado rápido. Além disso, essa atividade não é apresentada pelo **Proteus morgani**, que afirmam constituir 30% dos proteus isolados das fezes, baseados em suas estatísticas.

Levando em consideração esses fatos, estudaram um meio seletivo baseado na decomposição da uréia, atividade enzimática característica do gênero **Proteus**.

Como demonstrou WOLF (13), sob a ação das bactérias do gênero **Proteus** a uréia é hidrolizada com produção de carbonato

de amônio. Dirigindo as suas pesquisas nesse sentido, SURRACO e PEREYRA experimentaram o processo aconselhado em "A System of Bacteriology" (14), que apresenta o seguinte meio como método facil para diferenciação entre colis e proteus: caldo contendo 1% de uréia e 0,5 c. c. de uma solução alcoólica de timol azul a 0,4% para cada 100 c. c. do meio. Em poucas horas de culturâ os colis deixam o meio amarelado, ao passo que os proteus o tornam azul ou azul-esverdeado, devido à produção de carbonato de amônio e consequente alcalinização do meio.

Fazendo diversas modificações nesse meio, e após minuciosas experiências, SURRACO e PEREYRA aconselham seja ele feito da seguinte maneira:

Caldo fermentado (esterilizado a 120°)	100	c. c.
Uréia . . . . .	1	gr.
Lactose . . . . .	1,5	gr.
Sacarose . . . . .	1,5	gr.
Sol. de sal sódico de timol azul . . . . .	0,3	c. c.

Ajustar ao pH 7,5. Distribuir em tubos de fermentação de Durham-Esterilizar a 100°.

A sol. de sal sódico de timol azul é preparada da seguinte maneira:

Timol azul . . . . .	0,32	gr.
Soda N/10 . . . . .	6,88	c. c.
Água q. s. . . . .	20	c. c.

O meio, com o pH 7,5, é de cor amarela. Com a maioria das Salmonelas o pH se eleva a 8,1, tornando-se o meio amarelo-verdoso. A ação dos proteus sobre a uréia, permite dividi-los em dois grupos: a) proteus que produzem urease rápida e abundante, elevando o pH a 8,9, dando ao meio um tom azulado (**P. vulgaris**, **P. mirabilis**, **P. americanus**) e mesmo francamente azul, quando a reação vai a mais de 9,1; b) proteus que produzem urease lentamente, atingindo o pH apenas 8,6 e o meio ficando de cor verde (geralmente **Proteus morgani**).

SURRACO E PEREYRA dizem que a-pesar-de usarem os melhores meios para o isolamento de **Salmonella** e **Shigella**, ainda assim se torna indispensavel o meio que propuzeram, pois com ele conseguiram eliminar 72,25% das colônias suspeitas, por não pertencerem aos gêneros precitados.

Portanto, obtidas as colônias suspeitas (umas 3 ou 4) e após purificação, ou passagem no meio com uréia, são continuadas as provas bioquímicas gerais preliminares características do gênero **Salmonella**.

Passamos em uma série de cinco hidratos de carbono, que nos servirá não só para salmonelas comõ tambem para a identificação de outros germes da flora intestinal: lactose, glicose, manita, maltose e sacarose. O meio usado é o semissólido de HISS, com indicador ácido-rosólico (CARVALHO LIMA — Bacteriologia) (loc. cit.), que é preparado da seguinte maneira:

Água destilada .....	1000	c. c.
Gelatina . . . . .	40	gr.
Agar . . . . .	8	gr.
Peptona . . . . .	10	gr.
Clorureto de sódio .....	3	gr.
Extrato de carne .....	2	gr.

Ao clorureto de sódio, agar e gelatina ajuntar a água necessária, reservando cerca de 100 c.c. para os outros ingredientes. Dissolver e fundir durante uns 15 minutos por ebulição na autoclave, sem pressão. Na água reservada, dissolver a peptona e o extrato de carne, aquecendo em banho-maria. Combinar, em seguida, as duas partes e restabelecer o volume para um litro. Titular ao pH 7,4 a 7,6 com N/20Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e ajustar com N/1 Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>. Autoclavar a 121°C, durante 5 a 10 minutos. Filtrar. Ajuntar 1% da solução de ácido rosólico (sol. de ácido rosólico a 1% em alcool a 50%). Ajuntar os hidratos de carbono a 1%. Distribuir em tubos de 110 por 11 mm. e esterilizar na autoclave a 100°C, durante 30 minutos.

O meio é muito bom para o estudo dos bacilos Gram negativos da flora intestinal, apresentando a vantagem da verificação conjunta da fermentação e produção de gás. Ainda nas provas preliminares fazemos as seguintes reações especiais: hidrogênio sulfurado e indol; passamos em gelatina e leite tornasolado.

As provas preliminares que acabamos de indicar são suficientes para a identificação de bactérias do gênero **Salmonella**; e só fazemos as provas bioquímicas completas em casos especiais.

## 2 — Provas bioquímicas completas.

As colônias isoladas apresentando nas provas preliminares as reações bioquímicas características do gênero **Salmonella**, retro referidas, são, então, submetidas às seguintes provas bioquímicas, que completam a identificação.

**Fermentação de hidratos de carbono.** Os mais importantes, além dos cinco que fazem parte das provas bioquímicas preliminares, são: monosacáride — sorbita; disacáride — trealose; trisacáride — rafinose; polisacáride — dextrina, e as pentoses — ramnose, arabinose e xilose.

**Meio glicerina-sulfito-fucsina de STERN.** Os trabalhos, principalmente de STERN (1916), ZELLER (1922) e de MIESSNER e BAARS (1927) demonstraram que bactérias do grupo coli-tífico-paratífico-disentérico, quando semeadas no meio glicerinado de STERN, umas tornam o meio roxo ou violeta escuro — são as “Stern-positivas”, como por exemplo: **S. paratyphi B, S. enteritidis** etc.: outras, deixam o meio de cor vermelho-pálida — são as “Stern-negativas”: **S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi C, E. coli** etc..

**Meio glicerinado de Stern (15)**

Caldo fermentado .....	100 c. c.
Sol. sat. a 37°C de fucsina básica .....	V-VI gotas
Sol. de hipossulfito de sódio a 10% (recente) .....	2 c. c.
Sol. aquosa de crisoidina a 0,25% .....	1 c. c.
Glicerina (ou outro açúcar) .....	1 gr.

Este meio deve ser conservado na geladeira e ao abrigo da luz, pois se altera rapidamente sob a ação do ar e da luz. Con-venem usá-lo quando recentemente preparado.

**Ação sobre o meio de Bitter.**

O meio de BITTER, WEIGMANN e HALS (1926) (16), com rannose, serve para distinguir algumas salmonelas — principalmente Para B de Breslau — umas acidificando o meio e outras não.

**Meio de BITTER, WEIGMANN e HALS.**

Solução salina:

Fosfato dissódico Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 gr.
Sulfato de amônio .....	1 gr.
Citrato de sódio .....	2 gr.
Cloreto de sódio .....	5 gr.
Peptona Witte .....	0,05 gr.
Água destilada q. s. ....	1000 c. c.

Ajuntar os ingredientes à água destilada aquecendo lentamente e agitando até obter a dissolução dos sólidos. Filtrar em papel e distribuir em balões de 100 c. c.. A cada balão adicionar os açúcares — a rannose a 0,5% e a glicose, dulcita e arabinose a 1% — e ferver para dissolver. Distribuir em tubos de vidro neutro e esterilizar em vapor fluente, durante meia hora, dois dias sucessivos.

O meio, semeado, deve permanecer na estufa a 37°, durante 15 a 20 horas. Acrescentar, em seguida, duas gotas de solução alcoólica a 0,5% de vermelho de metila. Ler os resultados: coloração vermelha — positivo; amarela — negativo.

### Ação sobre o meio de SIMMONS.

Diversos pesquisadores vinham observando que bactérias pertencentes aos grupos tífico-paratífico-coli-aerogenes podiam ser separadas de acordo com sua habilidade de utilizar ácidos orgânicos, ou seus sais, como fontes de carbono — WAGNER (1913), ALTOBELLI (1914), AYERS, RUPP e JOHNSON (1919), PESCH (1921). Coube, contudo, aos trabalhos de KOSEK (17-18) a apresentação de um teste baseado na inabilidade dos coli-bacilos de utilizar ácido cítrico, ou citrato de sódio, como fonte de carbono, em contraste com bactérias do gênero aerógenes, que, utilizando o citrato, crescem abundantemente no meio líquido indicado pelo autor.

O meio de SIMMONS (19) é o próprio meio citratado de KOSEK, com adição de agar e de bromo-tímol azul como indicador, cujas ingredientes e modo de preparar são os seguintes:

Gelose citratada de Simmons

Agar lavado .....	20 gr.
NaCl .....	5 gr.
MgSO <sub>4</sub> .....	0,2 gr.
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 gr.
Citrato de sódio .....	2 gr.
Água destilada .....	1000 c. c.
Azul de bromotímol (sol-alc. 1,5%)	10 c. c.

Pesar 20 grs. de agar, cortar em pedaços pequenos e lavar bem durante algum tempo com água destilada, a qual será trocada 3 a 4 vezes. Dissolver os sais em água destilada, ajuntar o agar lavado e dissolvê-lo na autoclave a 120°C durante 10-15 minutos. Retirar da autoclave e filtrar em algodão. Ajustar o pH a 6,8-7,2. Repartir em balões com 100 c. c. em cada um. Esterilizar a 110°C. durante 20 minutos.

O meio será fundido quando tiver de ser usado. Ajuntar os açúcares (glicose, ramnose, dulcita e arabinose) e mais 1 c. c. da sol. alcoólica a 1,5% do azul de bromotímol. Distribuir e esterilizar em vapor fluente. O meio quando frio apresenta cor verde-oliva transparente, devendo ser conservado na geladeira. O azul de bromotímol é um indicador amarelo ao pH 6, indo até o azul ao pH 7,6. A cor do agar-citrato torna-se amarela ou alaranjada quando o meio se acidificar, tornando-se azul quando a sua reação for alcalina.

### Fermentação de ácidos orgânicos e seus sais

Diversos estudos têm sido feitos sobre a decomposição de sais de ácidos orgânicos pelas bactérias. Destacam-se, pela sua

importância, os de BROWN, DUNCAN e HENRY (1924-1926) (20-21) nos quais se verificou que, pelo uso principalmente de seis sais sódicos orgânicos (citrato, d-tartrato, l-tartrato, m-tartrato, fumarato e mucato) se podia estabelecer diferentes grupos entre as bactérias do gênero **Salmonella**, mesmo diferenciando tipos. Ainda mais: estendendo os seus estudos sobre a redução desses sais, constataram diferenças entre certos vibriões do grupo coli-aerógenos, entre o bacilo da difteria e o bacilo de Hoffmann etc..

É o seguinte o meio para verificação da fermentação de sais de ácidos orgânicos, segundo os trabalhos de BROWN, DUNCAN e HENRY e de KAUFFMANN (1935) (22)

Peptona .....	10 gr.
HONa 0,1 N .....	7 c. c.
Sol. de azul de bromotimol .....	12 c. c.
Água destilada .....	1000 c. c.

A solução de azul do bromotimol é a seguinte:

Azul de bromotimol .....	1 gr.
HONa 0,1N .....	25 c. c.
Água destilada .....	475 c. c.

Os sais são usados separadamente, convindo, de preferência, ajuntar os seguintes ao meio: citrato, d-tartrato, l-tartrato, i-tartrato e mucato. São geralmente empregados na concentração de 1%, mas os levógiros a 0,5%. Com HONa 0,2 N ajustar ao pH 7,4. O meio pode ser esterilizado a 115-120°C durante 20 minutos.

Convem verificar os resultados após 10 dias de incubação, realizando leituras também no correr desses dias. No momento em que se tiver de verificar o resultado, ajuntar a 3 c. c. do meio, 0,1 c. c. de sol. aquosa saturada de acetato de chumbo. Agitar bem, deixando o tubo em repouso, na posição vertical, durante algumas horas ou até o dia seguinte, fazendo, então, a leitura. Considera-se que houve decomposição do ácido orgânico pela bactéria, quando no fundo do tubo se observa um pequeno precipitado granular escuro, formado principalmente de carbonato de chumbo, ficando o líquido límpido. Não sendo a bactéria capaz de decompor o ácido orgânico, forma-se volumoso precipitado esbranquiçado do sal de chumbo, que ocupa mais de metade do volume do meio. Este precipitado não se deposita no fundo do tubo, permanecendo em suspensão indefinidamente. É indispensável utilizar também tubos do meio não semeado, que servirão de controle.

#### IV — Classificação sorológica.

##### A) Considerações gerais sobre a constituição antigênica das salmonelas.

Embora SMITH e REAGH (1903) e BEYER e REAGH (1904) tivessem verificado que o *B. suipestifer* apresenta, na sua forma normal, dois antígenos — um, flagelar, termolábil, e outro termoestável, associados a seu corpo, foram, contudo, os trabalhos de WEIL e FELIX (1917-1920) (23-24) que verdadeiramente constituíram as pesquisas iniciais básicas para o estudo da constituição antigênica das salmonelas.

WEIL e FELIX observaram nas culturas do bacilo *Proteus* X 19, dois tipos diferentes de colônias: umas, circunscritas, planas, e outras que se espalhavam, apresentando um crescimento invasor. Ao exame microscópico, as primeiras eram formadas por bacilos imóveis, ao passo que as segundas, por bacilos móveis, ciliados. As colônias produzidas pela variante ciliada foram designadas com o símbolo "H" (*hauch-véu*) e as com bactérias sem cílios, pelo símbolo "O" (*ohne hauch* — sem véu). A observação de que essas colônias "H" e "O" correspondiam a duas espécies de antígenos bem diferenciados, tornaram clássicas as denominações abreviadas de antígeno "H" para o flagelar (que se encontra nos cílios ou flagelos) e "O" para o somático (contido no corpo ou soma das bactérias).

Principalmente pelos estudos de ARKWRIGHT (25), com bactérias do grupo coli-tífico-disentérico, foi verificado o fato de um mesmo germe poder apresentar em gelose duas variantes: uma, de colônias lisas, dando cultura homogênea em caldo e não se aglutinando espontaneamente em soro fisiológico; outra, de colônias rugosas, cujas culturas em caldo depositam e aglutinam espontaneamente em soro fisiológico. As colônias lisas foram denominadas abreviadamente S (*smooth*) e as rugosas R (*rough*).

Da maior importância é o fato dessas alterações, que apresentam as variantes S e R, serem acompanhadas de mudanças nas suas atividades bioquímica e imunológica. A forma rugosa (R) contém um antígeno somático, termo e álcool resistente que os estudos de WHITE (1926) mostraram diferir do antígeno somático ("O") característico da forma lisa (S). Os anticorpos resultantes de animais imunizados com esses antígenos não aglutinam senão a variante que lhe corresponde.

SCHÜLTZ (1921) (27) estudando variantes rugosas do grupo tífico-paratífico, tomando bactérias aparentadas, como *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. enteritidis* etc., verificou

que as suas formas lisas apresentavam antígenos somáticos ("O") perfeitamente distintos pela sua especificidade, ao passo que as rugosas eram indistinguíveis pela aglutinação. O conhecimento destes fatos é importante na identificação dos antígenos somáticos das salmonelas, para o que será preciso partir de colônia lisa.

Podem as salmonelas apresentar, na constituição do seu antígeno somático, um, dois ou mesmo três fatores antigênicos, com o ainda alguns fatores menores.

O antígeno "H" das salmonelas se encontra nos seus cílios ou flagelos, sendo termolábil. O aquecimento a 100° de uma salmonela ciliada destrói o antígeno ciliar, conservando apenas o antígeno somático, termo-resistente. A cultura assim aquecida, se for inoculada em coelho fornecerá anti-soro somático, aglutinando o antígeno somático e não o ciliar.

A presença do antígeno ciliar nas bactérias moveis, ficou perfeitamente demonstrada na seguinte experiência de ORCUTT (1924): (28) Submeteu-se uma suspensão de bactérias moveis a uma prolongada agitação mecânica, fazendo, em seguida, cent trifugações fracionadas, com o fim de conseguir suspensões de flagelos sem os corpos bacterianos. Obtidas estas suspensões e inoculadas em coelho, o anti-soro conseguido apresentava anti-corpos "H" — soro flagelar sem ação sobre a parte somática da bactéria.

O antígeno "H" das salmonelas também pode apresentar diversos fatores.

O conhecimento e o estudo dos diversos fatores antigênicos apresentados pelas salmonelas na constituição dos seus antígenos "O" e "H", foram tornando possível uma classificação sorológica desse grupo de bactérias em tipos nitidamente diferenciados, o que não era possível pelas provas bioquímicas

As pesquisas de SCHÜLTZ' (1920 e 1921, loc. cit.), (29) principalmente as de ANDREWES (1922) (30), como as de BRUCE WHITE (1926, loc. cit. e 1929) (31) — foram muito importantes nesse sentido.

ANDREWES verificou que certas espécies de salmonelas podem apresentar um fenômeno muito curioso, observado no antígeno "H", fenômeno que se pode revelar em duas formas perfeitamente distintas pela sua especificidade e que se denominam **fases**. Apresentam-se estas fases em uma forma **específica** e outra **não específica**. Nesta os antígenos são comuns com os que se encontram em numerosas salmonelas, donde denominar-se **fase de grupo** ou **não específica**; naquela, a composição do antígeno flagelar é própria do tipo (embora possa ocorrer algumas

vezes em outros), razão pela qual se designa **fase específica**. As salmonelas podem apresentar uma só dessas fases e se denominarão **monofásicas**, ou as duas, e serão **bifásicas**.

Na fase específica do antígeno flagelar de algumas salmonelas monofásicas, pode ainda ocorrer uma variação denominada **variação alfabeta** de KAUFFMANN e MITSUI (1930) (32), como, por exemplo, se observa em **S. dar-es-salaam**, monofásica, apenas apresentando fatores antigênicos ciliares na fase específica, mas dissociados, uns (iw), em umas colônias — fase  $\alpha$  — e outros (en), em outras colônias — fase  $\beta$ .

A identificação sorológica de uma salmonela é feita pela determinação dos seus antígenos somáticos, ciliares e Vi (antígeno da virulência).

WHITE e em seguida KAUFFMANN, como vimos atrás, propuseram símbolos diferentes para antígenos iguais das salmonelas, sendo que, após um acordo realizado, foi possível a apresentação do esquema de KAUFFMANN-WHITE para a classificação sorológica das salmonelas, esquema que foi aceito pela Associação Internacional de Microbiologia, em 1934. Este esquema vem sendo ampliado de ano para ano, mas sempre conservando a sua estrutura fundamental.

No esquema de KAUFFMANN-WHITE há, em primeiro lugar, uma divisão em cinco grupos, de acordo com os diferentes fatores do antígeno "O", sendo estes grupos representados pelas letras maiúsculas A, B, C, D e E, que se caracterizam pela existência de antígenos comuns; e ainda um grupo denominado heterólogo. Os fatores antigênicos que entram na composição desses grupos são designados pelos algarismos romanos I, II, III, IV, V, VI etc.

O grupo A tem como antígeno fundamental o II, sendo constituído por uma só espécie — a **S. paratyphi A**.

O grupo B caracteriza-se pelo fator IV, ora único (**S. californica**), mas geralmente reunido a outros, como I, V, XII e XXVII.

No grupo C o antígeno comum é o VI, sempre acompanhado de alguns dos fatores VII e VIII.

O antígeno fundamental do grupo D é o IX, acompanhado dos fatores I e XII.

Apresenta o grupo E o antígeno comum III e mais os seguintes: I, X, XV, XIX e XXVI.

No grupo heterogêneo são reunidas raras espécies que mostram diversos fatores antigênicos somáticos diferentes dos apresentados pelos dos outros grupos.

A subdivisão em tipos, dentro destes cinco grupos, é feita em seguida de acordo com a constituição do antígeno flagelar (“H”).

Há, na constituição do antígeno flagelar das salmonelas, um verdadeiro complexo antigênico, que se divide em duas partes, denominadas **fase específica** e **fase não específica**. A fase específica foi por sua vez subdividida de acordo com os estudos de KAUFFMANN e MITSUI (loc. cit.) nas fases  $\alpha$  e  $\beta$ . Atualmente o esquema de KAUFFMANN-WHITE apresenta o antígeno “H” dividido em Fase 1 e Fase 2. Os fatores antigênicos presentes na Fase 1 são assinalados com as letras maiúsculas a, b, c, d etc. do alfabeto; ao passo que os da Fase 2, na sua maioria, por algarismos arábicos — 1, 2, 3, 5, etc.. Passaram a fazer parte da Fase 2, mesmo assinalados pelas letras maiúsculas do alfabeto, os fatores antigênicos da fase B de KAUFFMANN e MITSUI.

Na sua grande maioria, as salmonelas apresentam fatores ciliares nas duas fases (**S. paratyphi B**, **S. paratyphi C**, **S. typhi murium** etc.), outras vezes só apresentam esses fatores na fase específica ou Fase 1 (**S. paratyphi A**, **S. typhi** etc.), podendo ainda apresentá-los — mas excepcionalmente — na fase de grupo (**S. abortus equi**). Ainda o esquema de KAUFFMANN-WHITE admite a **S. gallinarum**, sem antígeno flagelar em ambas as fases.

O complexo antigênico somático e flagelar das salmonelas é resumido em uma fórmula que indica os seus principais fatores antigênicos, assinalados no esquema de KAUFFMANN-WHITE. Por exemplo, a fórmula antigênica de **S. london**, bifásica, é a seguinte: III, X, XXVI: lv: 1.6... Isto quer dizer que **S. london** apresenta três antígenos somáticos, indicados pelos algarismos romanos III, X, XXVI; dois fatores ciliares na fase 1, indicados pelas letras minúsculas “lv”, e mais dois fatores na fase 2, assinalados com os algarismos arábicos “1.6...”. Os dois pontos que acompanham este antígeno indicam a existência, ainda, de outros antígenos menores nessa fase. Na **S. typhi**, monofásica, com antígeno ciliar apenas na Fase 1, a fórmula antigênica é a seguinte: IX, XII, (Vi): d: —, indicando o travessão (—) final a não existência de antígeno ciliar na Fase 2. A **S. abortus equi**, também monofásica, mas não apresentando antígeno ciliar na Fase 1, é representada pela fórmula IV, XII: —: enx<sup>16</sup>.

## B) Preparo de soros diagnósticos aglutinantes.

1) **Soros somáticos.** No preparo de soros somáticos é preciso que a cultura seja lisa (S), convindo selecionar colônias **seguramente** lisas, com a reação de PAMPANA (33), de aglutinação com solução de tripaflavina, por um dos seguintes processos: a) misturar volumes iguais de sol. de tripaflavina a 1/500 em água fisiológica, com a suspensão bacteriana, em tubos de aglutinação; b) em uma lâmina colocar uma gota da sol. de tripaflavina a 1/500 e ao lado uma alça da colônia ou cultura, misturar em seguida, lentamente, a gota com a cultura, por inclinações da lâmina. A forma S não aglutina ao passo que as colônias ou culturas R (rugosas) aglutinam rapidamente.

Selecionada a cultura lisa, semear em gelose ou em caldo e incubar 24 horas a 37°C. Se for usada a cultura em gelose, fazer uma suspensão em água fisiológica, aproximadamente com 2000 milhões de bactérias por c.c. Aquecê-la a 100°C durante 2 horas (ou a cultura em caldo), com o fim de destruir os antígenos ciliares. Inocular coelhos adultos, por via venosa, nas doses de 0,5 — 1 — 1,5 — 2 c. c., com um, dois ou cinco dias de intervalo. Sangrar do sétimo ao décimo dia.

Os soros assim preparados apresentam anticorpos somáticos para mais de um fator antigênico, de acordo com o complexo antigênico somático inoculado. Para se obter um soro-fator puro, é necessário absorver as aglutininas de certos fatores, deixando-se apenas as do fator desejado. Por exemplo, para se obter aglutininas unicamente anti-fator VII, pode-se tomar o soro somático preparado com **S. oranienburg**, que apresentará aglutininas para os fatores somáticos "VI, VII", saturá-lo com **S. muenchen**, a qual, apresentando os fatores antigênicos somáticos "VI, VIII", absorverá os anticorpos para o fator "VI", deixando o soro apenas com aglutininas para o fator "VII".

Os soros-fatores puros, indispensáveis na identificação sorológica dos tipos de **Salmonella**, de acordo com o esquema de KAUFFMANN-WHITE, são os seguintes, sendo alguns com dois fatores por conveniência da sua pesquisa em conjunto:

I — II — III, XIX — IV — V — VI<sup>1</sup> — VI<sup>2</sup> — VII — VIII — IX, IX, XII — X — XI — XIII, XXII — XIV, XXV, — XV — XVI — XVII — XVIII — XIX — XX — XXI — XXII — XXIII — XXIV — XXV — XXVII — XXVIII — XXIX — XXX — XXXIII e Vi.

O anti-soro Vi pode ser obtido das imunizações com antígeno Vi de **S. typhi**, como também das de **S. paratyphi C** e **S. ballerup**, mas ainda após absorções.

As aglutinações somáticas devem ser feitas de preferência com as bactérias aquecidas uma ou duas horas a 100°C, ou tratadas pelo álcool, e a leitura do resultado, após 24 horas na estufa a 37°C. O soro agindo somente sobre o antígeno somático assim preparado, dá aglutinação em forma de grumos finos, que se depositam no fundo do tubo, desagregando-se com certa dificuldade pela agitação, caracterizando a **aglutinação granular ou somática**.

2) **Soros flagelares**. Para o preparo de soros flagelares é preciso selecionar raças bem moveis, visando-se cultura de 24 horas em caldo, na temperatura ambiente, formoladas a 0,3% (elas assim também servem para as aglutinações flagelares). Estas culturas são inoculadas em coelhos adultos pelo mesmo processo indicado no preparo de soros somáticos.

Para obtenção de bons soros flagelares deve-se, sempre que possível, usar tipos monofásicos; quando o antígeno cujo soro se quer preparar não existe senão em uma salmonela bifásica, convem selecionar colônias da fase que interessa, e mesmo obter cultura pura dessa fase, por seleções repetidas. Mas isto nem sempre é possível, porquanto algumas raças apresentam grande tendência de variar para a outra fase. Neste caso, tomar umas 10 colônias submetendo-as a uma aglutinação rápida com soros para as duas fases e selecionar uma que aglutine com a fase que se quer. Este processo de seleção deverá ser repetido diversas vezes, sempre com a última colônia selecionada, até que mais ou menos 90% das colônias isoladas permaneçam na fase procurada. Convem usar logo a cultura, porquanto esta porcentagem de colônias da fase selecionada não se mantém no correr de muitos transplantes, os quais vão revelando aumento de dissociação. Mesmo nas melhores condições, a cultura selecionada de uma fase — nas salmonelas bifásicas — sempre produz na imunização aglutinações menores para a outra fase, como também aglutininas somáticas, convindo ser ambas absorvidas. Saturando-se, por exemplo, um soro flagelar anti-**S. bareilly** ( $y: 1,5$ ) na fase 1 (fator  $y$ ), com **S. typhi suis** ( $c: 1,5$ ) em fase 2 (1,5), são absorvidas ao mesmo tempo as aglutininas somáticas comuns (VI, VII) e flagelares da fase 2 (1,5), obtendo-se assim um soro puro para o fator “ $y$ ”.

A obtenção de soros puros é mais difícil, quando se trata dos fatores ciliares “2”, “5”, “6” e “7”, convindo, então, saturar os respectivos soros com as restantes fases 2, visto indicarem os dois pontos (...) que acompanham esses fatores no esquema, a existência de antígenos menores, não mencionados, que se podem relacionar.

A aglutinação flagelar deve ser feita a 50°C, em banho-maria, onde permanecerá umas 2 horas. Macroscopicamente caracteriza-se por grandes flocos que se desagregam facilmente — o que constitui a **aglutinação flocular** ou ciliar.

Os seguintes soros-fatores ciliares são necessários e só poderão ser obtidos após as saturações indispensáveis:

a, b, c, d, eh, en, enx, f, fg, fgt, g, gt, gm, gmq, gms, gp, gq, gpu, gst, h, i, k, lv, lw, m, mt, n, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z, z<sup>4</sup>, z<sup>6</sup>, z<sup>10</sup>, z<sup>12</sup>, z<sup>14</sup>, z<sup>16</sup>, z<sup>17</sup>, z<sup>18</sup>, 2, 5, 6 e 7.

### C) Técnica de classificação sorológica.

1) **Provas sorológicas preliminares.** Geralmente usamos fazer esta prova logo após as pesquisas fundamentais bioquímicas que caracterizam o gênero **Salmonella**, ou provas bioquímicas preliminares a que submetemos os germes isolados.

Com um soro polivalente, que contenha todos os fatores aglutinantes somáticos e flagelares das salmonelas fazemos uma aglutinação macroscópica rápida. Como antígeno usamos suspensão espessa, em água fisiológica, da bactéria a examinar. Em uma grande lâmina de vidro, dividida em quadrados (2x2 centímetros) colocamos uma alça de platina (com 4 mm. de diâmetro interno) do soro polivalente em cada quadrado e sobre ela outra alça (do mesmo diâmetro) da suspensão bacteriana. Misturamos bem com a própria alça e em seguida movimentamos ligeiramente a lâmina e lemos o resultado. A aglutinação é geralmente instantânea.

Estas provas de aglutinação rápida também podem ser feitas por meio de gotas, principalmente se forem muitas, para evitar que o material seque. Também podem ser feitas diretamente com todas as colônias suspeitas, obtidas dos meios de isolamento, mesmo antes, portanto, das provas bioquímicas preliminares.

Sendo a aglutinação positiva, passamos às provas sorológicas completas.

2) **Provas sorológicas completas.** As bactérias que aos exames bioquímico e sorológico preliminares forem classificadas como salmonelas, passam a ser submetidas a provas sorológicas completas, as quais irão determinar o seu tipo sorológico.

A identificação em tipos baseia-se atualmente na determinação, pela aglutinação, dos diversos fatores antigênicos encontrados nas salmonelas, e cujos símbolos de maior importância constam do esquema de KAUFFMANN-WHITE.

Nos exames de rotina, a técnica a seguir será a da aglutinação rápida, deixando-se o processo lento de aglutinações so-

máticas e ciliares, retro referido, feito com soros em diversas diluições, para mais seguras determinações ou pesquisas.

Em primeiro lugar, verifica-se a qual dos cinco grupos somáticos pertence a salmonela cujo tipo se quer determinar. É preciso ter um soro somático de cada grupo, sendo que, o do grupo A será constituído apenas pelo anti-soro de **S. paratyphi A**; os outros — B, C, D e E — formados respectivamente por uma mistura de anti-soros somáticos correspondendo aos antígenos somáticos de cada grupo. No grupo heterogêneo usamos três misturas de anti-soros somáticos: n. 1 — mistura de anti-soros de **S. aberdeen**, **S. poona** e **S. worthington** (para os fatores antigênicos XI, XIII, XXII e XXIII); n. 2 — com os anti-soros de **S. carrau**, **S. onderstepoort**, **S. gaminara**, **S. kirkee** e **S. cerro** (para os fatores VI, XIV, XVI, XVII, XVIII, XXIV e XXV); e n. 3 — constituído pela mistura dos anti-soros somáticos de **S. kentucky**, **S. minnescta**, **S. tel aviv**, **S. ballerup**, **S. urbana**, **S. arizona** (para os fatores antigênicos XX, XXI, XXVI, XXVIII, XXIX, XXX e XXIII).

Na mistura de soros que constituem os grupos B, D e E evitamos ajuntar soros que no complexo antigênico somático apresentem o fator I, muito comum nesses grupos.

Fazemos com esses 9 soros (geralmente diluídos a 1/10) a aglutinação rápida, que será quase instantânea, determinando a qual dos grupos somáticos pertence a salmonela em estudo.

Determinado o grupo somático a que pertence a salmonela, procede-se de modo idêntico a identificação dos antígenos flagelares. Em primeiro lugar fazemos uma aglutinação rápida com soro flagelar preparado com **S. cholerae suis** (var. **kunzendor**) — amostra que não apresenta antígeno na fase I, mas que na fase 2 tem os fatores ciliares 1, 3, 4, 5, (\*) não específicos. Nós o usamos saturado por **S. oraniemburg**, para maior garantia da pureza dos seus anti-soros, que devem ser unicamente ciliares. A aglutinação positiva com ele nos indicará: a) que se trata de uma salmonela com um ou os dois desses fatores antigênicos não específicos (1,5); b) e que ela é bifásica, porque só salmonelas bifásicas apresentam esses fatores não específicos (53 das 104 indicadas no último esquema de KAUFFMANN-WHITE).

Geralmente ainda fazemos aglutinação rápida com um soro ciliar de **S. abortus equi** (salmonela monofásica, que só apresen-

---

(\*) Nos últimos esquemas de Kauffmann-White, os fatores 3 e 4 foram suprimidos.

ta antígeno "H" na fase 2) com anticorpos para os fatores "enx", que são, após os fatores não específicos assinalados pelos algarismos arábicos, os mais encontrados (em 23 das 104 salmonelas do esquema). A aglutinação com este anti-soro apenas indicará ser provável tratar-se de salmonela bifásica, isto devido à presença do fator "e" em muitas salmonelas da fase 1; mas auxiliará muito as provas de identificação, principalmente entre as salmonelas dos grupos B e C, como também do grupo "heterogêneo".

Uma vez determinado o grupo, e a existência ou não dos antígenos ciliares não específicos ("1,5" ou "enx"), passamos a fazer aglutinações flagelares para os antígenos da fase 1, mas unicamente com os soros dos tipos do grupo previamente determinado, selecionando ainda, entre estes, os que apresentem ou não fatores "1,5" ou "enx", de acordo com a verificação anterior.

Por exemplo, vamos supor que uma salmonela em identificação foi aglutinada — com os soros dos grupos — unicamente com soro somático do grupo D, e também pelo anti-soro ciliar de *S. kunzendorf* (1,5), indicando ser bifásica. O esquema de KAUFFMANN-WHITE (1941) assinala 14 tipos de salmonelas no grupo D, que apresentam fatores ciliares diferentes. São os fatores ciliares do grupo D é que deverão ser pesquisados; mas, ainda destes, de preferência devemos pesquisar os fatores da fase 1 das salmonelas que apresentem, na fase 2, fatores não específicos — assinalados pelos algarismos arábicos (1,5) — porque a salmonela em estudo revelou a sua presença. Assim, das 14 salmonelas do grupo D, já podem ser excluídas: as monofásicas (*S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. rostock*, *S. macedonia*, *S. blegdam*, *S. berta* e *S. gallinarum*); as bifásicas *S. goettingen* e *S. dar es salaam* por não apresentarem na fase 2 nenhum dos fatores não específicos "1,5", ficando apenas a possibilidade da nossa raça ser uma daquelas que apresentem estes fatores inespecíficos, isto é, *S. eastbourne*, *S. sendai*, *S. onanimon* e *S. panamá*, o que poderá limitar a pesquisa dos antígenos ciliares da fase 1, apenas aos seguintes fatores: "eh", "a", "b" e "lv".

A determinação dos fatores da fase 2 de uma salmonela é feita pelo mesmo processo de aglutinações rápidas, logo após a identificação dos fatores ciliares da fase 1. Também aqui é indispensável usar soros-fatores puros, obtidos pelas saturações, como vimos atrás, quando tratamos do seu preparo.

A identificação dos componentes antigênicos "H" de uma salmonela bifásica exige cuidados especiais, devido ao fenômeno da variação de fase de ANDREWES. Nas salmonelas bifásicas a mudança de fase é um fenômeno brusco, mas que não altera o

antígeno somático. Cada amostra apresenta propensões diferentes em mudar de fase, mantendo-se algumas em uma delas, mas outras apresentando frequentes mudanças.

Sem o perfeito conhecimento deste fenômeno, a classificação do tipo não será feita satisfatoriamente, pois a salmonela pode apresentar-se em uma dessas fases.

Comumente, o que se nota com respeito às fases é o seguinte: As culturas das salmonelas bifásicas são de **fase misturada**; quando passadas em placas de gelose, de modo a se obter colônias isoladas, duas espécies de colônias podem apresentar-se, embora indistinguíveis na sua forma. Verificando-se a aglutinação das colônias separadamente, com um anti-soro flagelar de *S. cholerae suis*, var. *kunzendorf* (antígeno "H" só na fase 2, com as aglutininas de grupo para os fatores "1,5"), algumas colônias aglutinam e outras não: estas se apresentam em pura fase específica, aquelas em pura fase de grupo. Há casos em que todas as colônias são positivas, isto é, todas aglutinam com o soro de grupo. Se a salmonela se mostrar persistentemente nesta fase, há processos que a induzem a apresentar a sua fase específica.

SCOTT (1926) (34) e colaboradores mostraram que o desenvolvimento em excesso do antígeno de grupo que às vezes uma salmonela manifesta obstinadamente, poderá ser inibido se ela for cultivada em diversas gerações (3 a 5 são suficientes), em caldo contendo anti-soro da fase não específica. WASSEN (1935) (35) descreveu um método para a separação das fases específicas e não específicas, baseando-se no efeito imobilizante do soro imune homólogo: Um pedaço de papel de filtro esterilizado e impregnado com soro apropriado é colocado no meio de gelose semi-sólida e esta semeada no ponto mais afastado do papel; o desenvolvimento da fase homóloga é detido à distância do papel, ao passo que o da fase heteróloga se aproxima dele. GARD (1937) (36) melhorou e simplificou este método, juntando o soro imune diretamente ao agar semi-sólido. Semeada a salmonela em picada, o crescimento da fase homóloga do soro ficará confinado à linha da picada, difundindo-se no meio a sua fase heteróloga. É esta a técnica mais usada atualmente.

Nas identificações sorológicas completas, não se tratando de exames rápidos de rotina, a determinação dos complexos antigênicos somáticos e ciliares deve ser acompanhada da determinação de cada um dos fatores antigênicos que fazem parte desses complexos. E como última prova, deve ser feita a confirmação da existência dos fatores encontrados, pelo processo de absorções, principalmente pela prova da absorção mútua ou cruzada

das aglutininas, conhecida por prova “espelho” (mirror test). Ela consiste no seguinte: se, por exemplo, uma salmonela em identificação, classificada no grupo E, revelar antígenos somáticos e ciliares cuja fórmula seria III, XV: eh: 1.6,..., portanto igual à de **S. newington**, deverá, em prova de saturação, absorver todos as aglutininas somáticas e ciliares de um anti-soro de **S. newington**, o qual perderá as aglutininas tanto para esta como para a salmonela em identificação. Mas ainda é indispensável que um anti-soro preparado com esta raça em identificação, por sua vez saturado por **S. newington**, não mais aglutine os antígenos de ambas, ficando assim concluída a prova de absorção cruzada das aglutininas, e só deste modo seguramente determinado o tipo de salmonela em estudo.

## ESQUEMA DA ESTRUTURA ANTIGÊNICA DAS SALMONELAS

(KAUFFMANN-WHITE -- 1941)

		ANTIGENOS “H”	
T I P O	ANTIGENOS “O”	Fase 1	Fase 2
<b>Grupo A</b>			
1 <i>S. paratyphi</i> A	[I], II, XII	a	—
<b>Grupo B</b>			
2 <i>S. paratyphi</i> B	[I], IV, V, XII	b	1, 2,...
3 <i>S. abony</i>	[I], IV, V, XII	b	enz <sup>16</sup>
4 <i>S. Typhi murium</i>	[I], IV, [V], XII	i	1, 2,...
5 <i>S. stanley</i>	IV, V, XII	d	1, 2,...
6 <i>S. heidelberg</i>	IV, V, XII	r	1, 2,...
7 <i>S. chester</i>	IV, [V], XII	eh	enz <sup>17</sup>
8 <i>S. saint paul</i>	I, IV, V, XII	eh	1, 2,...
9 <i>S. zagreb</i>	IV, V, XII	eh	1, 2,...
10 <i>S. kaposvar</i>	IV, V, XII	e (h)	1, 5,...
11 <i>S. san diego</i> 1	IV, [V], XII	eh	enz <sup>15z17</sup>
12 <i>S. san diego</i> 2	IV	eh	en..
13 <i>S. arechavaleta</i>	IV, [V], XII	a	1, 7,...
14 <i>S. reading</i>	IV, XII	eh	1, 5,...
15 <i>S. derby</i>	[I], IV, XII	fg..	—
16 <i>S. essen</i>	IV, XII	gm..	—
17 <i>S. budapest</i>	I, IV, XII	gt..	—
18 <i>S. brandenburg</i>	IV, XII	lv	enz <sup>15z17</sup>
19 <i>S. bispebjerg</i>	I, IV, XII	a	enz <sup>16</sup>
20 <i>S. abortus equi</i>	IV, XII	—	enz <sup>16</sup>

ANTIGENOS "H"

T I P O	ANTIGENOS "O"	ANTIGENOS "H"	
		Fase 1	Fase 2
21 S. abortus ovis .....	IV, XII	c	1, 6,..
22 S. abortus bovis .....	[I], IV, XXVII, XII	b	enz <sup>z</sup> <sub>16</sub>
23 S. bredeney 1 .....	I, IV, [XXVII], XII	lv	1, 7,..
24 S. bredeney 2 .....	I, IV	lv	1, 7,..
25 S. schleissheim .....	IV, XXVII, XII	bz <sup>12</sup>	—
26 S. california .....	IV	gmt	—
27 S. altendorf .....	IV, XII	c	1, 7,..
<b>Grupo C</b>			
28 S. paratyphi C .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII (Vi)	c	1, 5,..
29 S. cholerae suis 1 .....	VI <sup>1</sup> , VII	[c]	1, 5,..
30 S. cholerae suis 2 .....	VI <sup>2</sup> , VII	[c]	1, 5,..
31 S. typhi suis .....	VI <sup>2</sup> , VII	c	1, 5,..
32 S. thompson .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	[k]	1, 5,..
33 S. virchow .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	r	1, 2,..
34 S. oranienburg .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	mt	—
35 S. potsdam .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	lv	enz <sup>15z</sup> <sub>17</sub>
36 S. bareilly .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	y	1, 5,..
37 S. hartford .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	y	enz..
38 S. mikawashima .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	y	enz <sup>15z</sup> <sub>17</sub>
39 S. montevideo 1 .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	gms..	—
40 S. montevideo 2 .....	VI <sup>1</sup> , VII	gms..	—
41 S. oslo .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	a	enz <sup>z</sup> <sub>16</sub>
42 S. amersfoort .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	d	enz <sup>z</sup> <sub>16</sub>
43 S. braenderup .....	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII..	eh	enz <sup>15z</sup> <sub>17</sub>
44 S. newport .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	eh	1, 2,..
45 S. kottbus .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	eh	1, 5,..
46 S. bovis morbificans .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	r	1, 5,..
47 S. Oregon .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	d	1, 2,..
48 S. muenchen .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	d	1, 2,..
49 S. manhattan .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	d	1, 5,..
50 S. narashino .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	a	enz <sup>z</sup> <sub>16</sub>
51 S. glostrup .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	z <sup>10</sup>	enz <sup>15z</sup> <sub>17</sub>
52 S. litchfield .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	lv	1, 2,..
53 S. duesseldorf .....	VI <sup>1</sup> , VIII..	z <sup>4z</sup> <sub>21</sub>	—
<b>Grupo D</b>			
54 S. typhi .....	IX, XII, (Vi)	d	—
55 S. enteritidis .....	[I], IX, XII	gm	—
56 S. dublin .....	I, IX, XII..	gp	—
57 S. rostock .....	I, IX, XII..	gpu	—
58 S. moscow .....	IX, XII..	goq	—
59 S. blegdam .....	IX, XII..	gmq	—
60 S. berta .....	IX, XII..	f, g, t..	—
61 S. eastbourne .....	[I], IX, XII..	eh	1, 5,..
62 S. sendai .....	[I], IX, XII..	a	1, 5,..

		ANTÍGENOS "H"	
T I P O	ANTÍGENOS "O"		
		Fase 1	Fase 2
63 S. onanimon	I, IX, XII..	b	1, 2...
64 S. dar es salaam	[I], IX, XII..	lw	enz <sup>16z</sup> <sup>18</sup>
65 S. goettingen	IX, XII..	lw	enz <sup>15</sup>
66 S. panamá	I, IX, XII..	lv	1, 5...
67 S. gallinarum	IX, XII	—	—
Grupo E			
68 S. london	III, X, XXVI	lv	1, 6...
69 S. give	III, X, XXVI	lv	1, 7...
70 S. anatum	III, X, XXVI	eh	1, 6...
71 S. muenster	III, X, XXVI	eh	1, 5...
72 S. nyborg	III, X, XXVI	eh	1, 7...
73 S. amager	III, X, XXVI	y	1, 2...
74 S. zanzibar	III, X, XXVI	k	1, 5...
75 S. shangani	III, X, XXVI	d	1, 5...
76 S. meleagridis	III, X	eh	lw
77 S. lexington	III, X, XXVI	z <sup>10</sup>	1, 5...
78 S. uganda	III, X, XXVI	l,z <sup>13</sup>	1, 5...
79 S. vejle	III, X, XXVI	eh	1, 2...
80 S. newington	III, XV	eh	1, 6...
81 S. selandia	III, XV	eh	1, 7...
82 S. new brunswick	III, XV	lv	1, 7...
83 S. illinois	III, XV	z <sup>10</sup>	1, 5...
84 S. senftenberg	I, III, XIX	gst...	—
85 S. niloese	I, III, XIX	d	z <sup>6</sup>
86 S. habana	I, III, XXIII	fg...	—
Grupo Heterogêneo			
87 S. aberdeen	XI	i	1, 2...
88 S. rubislav	XI	r	enx
89 S. poona	XIII, XXII	z...	1, 6...
90 S. borbeck	XIII, XXII	lv	1, 6...
91 S. worthington	I, XIII, XXIII	lw	z ..
92 S. wichita	I, XIII, XXIII	d...	—
93 S. carrau	VI, XIV, XXIV	y	1, 7...
94 S. onderstepoort	[I], VI, XIV, XXV	eh	1, 5...
95 S. hvittingfoss	XVI	b	enz <sup>16</sup>
96 S. gaminara	XVI	d	1, 7...
97 S. kirkee	XVII	b	1, 2...
98 S. cerro	XVIII	z <sup>4z3z25</sup>	—
99 S. kentucky	(VIII) XX	i	z <sup>6</sup>
100 S. minnesota	XXI, XXVI	b	enz <sup>16</sup>
101 S. tel aviv	XXVIII	y	enz <sup>15</sup>
102 S. ballerup	XXIX [Vi]	z <sup>4</sup>	—
103 S. urbana	XXX	b	enx
104 S. arizona	XXXIII	z <sup>4z3z26</sup>	—

( ) Significa que não é predominante.

[ ] Significa que pode faltar.

.. Significa que existem restos antigênicos.

## S U M M A R Y

The A. describes the various methods for the isolation and identification of the genus **Salmonella**.

To simplify the exposition the subject is divided under four headings: I — considerations on the characteristics of the genus **Salmonella**; II — methods for enrichment and isolation; III — biochemical tests for the detection of the genus *Salmonella*; IV — serological classification in accordance with the KAUFFMANN-WHITE scheme.

The first part gives a summary of the changes observed from year to year in the definition of the genus **Salmonella**. The A. believes that the criterion most generally accepted is based on one hand on the biochemical characteristics which, up to a point, limit the genus, and also on the study of their antigenic constitution.

The methods of enrichment such as those of KAUFFMANN and LEIFSON-SELENITO-F. are studied in the second part; also isolation methods such as lactose-rosolic acid, KRISTENSEN-LESTER and JURGENS (modified by HORMAECHE) and the agar-lactose-saccharose-brilliant-green-rosolic-acid method. This last, suggested by the A. renders difficult the growth of *B. proteus* and *coli*.

The biochemical tests are considered in the third part, under the sub-division of preliminary and complete biochemical tests.

In the fourth and last part the A. studies the serological classification, and the technique for the preparation of pure factor antigens, and also a brief investigation of the various antigens of greater importance included in the KAUFFMANN-WHITE scheme.

## B I B L I O G R A F I A

- 1) KAUFFMANN, F. — 1941. Die Bakteriologie der Salmonella. Gruppe. Ed. E. Munksgaard-Kopenhagen.
- 2) PELUFFO, C. A., Edwards, P. R. and Bruner, D. W. — 1942. A Group of Coliform Bacilli Serologically Related to the Salmonella. The Jour. of Inf. Dis. V 70. N. 2, págs. 185-192.
- 3) EDWARDS, P. R., Cherry, W. B. and Bruner, D. W. — 1943. Further Studies on Coliform Bacteria Serologically Related to the Genus Salmonella. The Jour. of Inf. Dis. V. 73. N. 3, págs. 229-238.
- 4) MUELLER, L. — 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du Bacille typhique et des paratyphiques. Compt. Rend. Soc. Biol. V: LXXXIX, págs. 434-437.
- 5) KAUFFMANN, F. — 1930-1931. Ein Kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus und Paratyphusbazillen. Zeit. für Bact. Abt. Orig., CXIX, págs. 148-160.
- 6) LEIFSON, E. — 1936. New selenite media for the isolation of typhoid and paratyphoid (Salmonella) bacilli. The Amer. Jour. of Hyg., V. 24, págs. 423-432.
- 7) HORMAECHE, E., e SURRACO, N. L. — 1941. Estudios sobre el valor de los métodos de aislamiento de Salmonelas y Shigelas. Arch. Uruguayos de Med., Cir. y Especialidades. T. XVIII — N. 6, págs. 485-503.
- 8) HORMAECHE, E., e PELUFFO, C. A. — 1941. Las salmonelosis infantiles y su diagnóstico. The Puerto Rico Jour. of Publ. Health and Tropical Med., V. 17. N. 2, págs. 71-78.
- 9) CARVALHO LIMA, J. P. — Bacteriologia, 1.a Edição, 1933, pág. 93.
- 10) LEIFSON, E. — 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. The Jour. of Path. and Bact. Vol. XL, págs. 581-599.
- 11) SURRACO, N. L. y PEREYRA, V. R. — 1942. Nuevo medio de cultivo para el repicado de colonias en el aislamiento de salmonelas y shigelas. Arch. Uruguayos de Med. Cir. y Especialidades. Tomo XXI, n. 5, págs. 518-532.
- 12) SOSA, H. — 1940. Medio de cultivo para la selección de colonias en el aislamiento de bacterias patógenas intestinales. Rev. Inst. Bact. Bs. As. Vol. IX, págs. 478-486.

- 13) WOLF, C. G. L. — 1918. The Biochemistry of Bacillus Proteus. Jour. Path. Bact. Vol. XXII, págs. 289-307.
- 14) A System of Bacteriology in Relation to Medicine. Vol. IV, pág. 269.
- 15) STERN, W. — 1916. Studien zur Differenzierung der Bakterien der ColiTyphus-Gruppe Mittels Jafärbter, flüssiger Nährböden. Beiträge zur Biologie der Bakteriengruppe Paratyphus B-enteritidis. Z bl. Bakt., Vol. LXXVIII, págs. 481-492.
- 16) BITTER, L., Weigmann, F. und Habs, H. — 1926. Bestimmung der gebildeten Säuremenge zur Unterscheidung verwandter Bakterien. Rhamnosereaktion zur Differenzierung von Paratyphus B. und Breslaubakterien. Münch. Med. Wsch. Vol. LXXIII, págs. 940-941.
- 17) KOSER, S. A. — 1923. Utilization of the Salts of Organic Acids by the Colon-Aerogenes Group. J. Bact., Vol. VIII, págs. 493-520.
- 18) KOSER, S. A. — 1924. Correlation of citrate utilization by members of the colon-aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. J. Bact., Vol. 9, págs. 59-77.
- 19) SIMMONS, J. S. — 1926. A culture Medium for Differentiating Organisms of Typhoid-Colon Aerogenes Group and for Isolation of Certain Fungi. The Jour. of Inf. Dis. Vol. 89, págs. 209-214.
- 20) BROWN, H. C., Duncan, J. T. and Henry, T. A. — 1924. The fermentation of Salts of Organic Acids as an Aid to the Differentiation of Bacterial Types. The Jour. of Hyg., Vol. XXIII, págs. 1-22.
- 21) BROWN, H. C., Duncan, J. T. and Henry, T. A. — 1926. The differentiation of food-poisoning bacteria. Lancet - Lond., I, págs. 117-118.
- 22) KAUFFMANN, F. — 1935. Über die Typeneinteilung der Gärtner Gruppe. Zeit. für Hy. CXVII, págs. 431-450.
- 23) WEIL, E. e FELIX, A. — 1917. Untersuchungen ueber das Wesen der Fleckfieber Agglutination. Wien. Klin. Woch. Vol. 30, págs. 1509-1511.
- 24) WEIL, E. e FELIX, A. — 1920. Über den Doppel-typus der Rezeptoren in der Typhus Paratyphus-Gruppe. Zeit. f. Immunitats. Vol. 29, págs. 36-60.
- 25) ARKWRIGHT, J. A. — 1921. Variation in Bacteria in Relation to Agglutination both by Salts and by Specific Serum. J. Path. and Bact. Vol. 24, págs.
- 26) WHITE, P. B. — 1926. Further Studies of the Salmonella Group. Med. Res. Council. Spee. Rep. N. 103.
- 27) SHÜTZE, H. — 1921. The Permanence of the Serological Paratyphoid B Types, with Observations on the Non-Specificity of Agglutination with "Rough" Variants. The Jour. of Hyg. Vol. 20, págs. 330-341.
- 28) ORCUTT, M. L. — 1924. Flagellar agglutinins. J. Exp. Med. Vol. 40, págs. 43-49.
- 29) SHÜTZE, H. — 1920. The paratyphoid B group. The Lancet. Vol. 198, págs. 93-97.

- 30) ANDREWES, F. W. — 1922. Studies in group agglutination. I — The Salmonella Group and its Antigenic Structure. Jour. Path. and Bact. Vol. 25, págs. 505-521.
- 31) WHITE, P. B. — 1929. A System of Bacteriology. Vol. IV — Chapter II. The Salmonella Group. Pág. 86.
- 32) KAUFFMANN, F. e MITSUI, C. — 1930. Vergleichende Untersuchungen in der typhus-Paratyphus Gruppe. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Vol. III, págs. 749-772.
- 33) PAMPANA, E. J. — 1933. Microbic dissociation of the "R" variant by means of a specific drop agglutination. The Jour. of Hyg. Vol. 33, pág. 402.
- 34) SCOTT, W. M. — 1926. The "Thompson" type of Salmonella. Jour. Hyg. Vol. 25, págs. 398-405.
- 35) WASSÉN, A. — 1935. Essais d'application au vibron cholérique de la méthode fondée sur la faculté de déplacement des bactéries. Bull. Mensuel de l'Office Int. d'Hyg. publ. Vol. 27, págs. 1121-1134.
- 36) GARD, S. — 1937. Ein Colistamm mit Salmonella H. Antigen zugehörig ein Beitrag zur Frage der Definition der Salmonella-gruppe. Zeit. f. Hyg. Vol. 120, págs. 59-65.