

TIPOS SOROLÓGICOS DE *Sh. PARADYSENTERIAE* ENCONTRADOS EM SÃO PAULO

SYLVIO SOARES DE ALMEIDA
AUGUSTO DE E. TAUNAY
JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES

Médicos do Instituto Adolfo Lutz

AMÉLIA PACHECO TRIGO

Téc. Lab. do Instituto Adolfo Lutz

Uma identificação exata dos diferentes tipos de *Sh. paradysenteriae* é frequentemente impossível por meio de provas bioquímicas, pois tipos diversos de *b. paradysentéricos* podem apresentar idênticas reações nos meios diferenciais comumente usados. Os métodos sorológicos são os únicos que permitem uma identificação precisa, condição particularmente importante sob o ponto de vista do estudo e controle epidemiológicos. O processo de aglutinação em lâmina com soros tipo-específicos, constitui um método rápido e econômico de identificação sorológica; uma vez preparados os soros necessários a tipagem dos bacilos do grupo paradysentérico se faz de forma simples e adequada às finalidades práticas.

A complexidade da estrutura antigênica da *Sh. paradysenteriae* dificultou de início a sua classificação sorológica. Das diversas tentativas neste sentido, a de Andrewes e Inman¹ foi a que teve melhor êxito. Êstes AA. postularam a existência de 4 tipos que denominaram V, W, X e Z. Além desses que se caracterizavam pela preponderância em cada um dêles dos respectivos antígenos V, W, X e Z, admitiram ainda a existência de um 5.º tipo, denominado Y, caracterizado por possuir os 4 antígenos acima em proporções mais ou menos igualmente distribuídas e dois tipos VZ e WX, nos quais êsses dois antígenos estariam representados em quantidades igualmente significativas. Êsse esquema de Andrewes e Inman demonstrou-se exato no sentido de que permitia a classificação da maioria das amostras de *Sh. paradysenteriae*; no entanto um número relativamente grande de culturas não se enquadrava dentro dessa classificação.

Boyd² estudando o comportamento sorológico de grande número de bacilos paradisentéricos confirmou nas suas linhas gerais a classificação de Andrewes e Inman, alterando-a porém em alguns pontos e desenvolvendo-a, de modo a incluir novos tipos que nela não estavam anteriormente representados. Assim, Boyd admitiu a existência dos tipos V, W e Z de Andrewes e Inman considerando porém os tipos X e Y como variantes degradadas, respectivamente dos tipos Z e W. Descreveu também 9 tipos sorológicos diferentes, todos êles possuindo um antígeno específico próprio; dêsses novos tipos apenas 2 se relacionavam com os tipos V, W e Z de Andrewes e Inman por intermédio de antígenos secundários comuns, caracterizando-se os outros 6 por não possuírem êsses antígenos de grupo ou apresentá-los em quantidade muito reduzida.

Os trabalhos de Boyd levaram então a uma nova classificação sorológica dos b. paradisentéricos: os tipos V, W e Z de Andrewes e Inman e mais os 3 tipos correlatos de Boyd passaram a ser designados "Flexner" I a VI, enquanto os 6 tipos restantes tomaram a denominação de "Boyd" I a VI.

A existência dos novos tipos sorológicos de *Sh. paradysenteriae* descritos por Boyd tem sido geralmente confirmada, particularmente graças aos importantes trabalhos de Wheeler³ e de Weil⁴. Há entretanto, divergências entre as afirmações dêsses dois AA. Wheeler se aproxima mais dos conceitos de Boyd, ao negar a individualidade das amostras X e Y como tipos sorológicos definidos e ao afirmar que os antígenos tipo-específicos que caracterizam as diversas amostras de *Sh. paradysenteriae* são qualitativamente diferentes dos antígenos grupo-específicos.

Para Wheeler uma determinada amostra de *Sh. paradysenteriae* se relaciona com as demais por antígenos de grupo comuns, mas é caracterizada pela presença de um só antígeno tipo específico que lhe é próprio e que não se encontra nas amostras restantes. Weil, ao contrário, chega a conclusões semelhantes às primitivas de Andrewes e Inman pois aceita a validade dos tipos X e Y e acredita que as amostras sejam caracterizadas por um componente antigênico primário, associado a outros antígenos quantitativamente menos importantes e por isso denominados secundários. Um determinado antígeno primário, isto é, predominante em uma determinada amostra, poderá ser secundário em outra. Weil identificou 14 antígenos diferentes nos b. para-

disentéricos; a predominância de um desses antígenos é que caracteriza a amostra como "tipo" sorológico definido. Admite, por outro lado, que existam 3 tipos mistos, isto é, nos quais se encontrem dois componentes antigênicos dominantes, e portanto com caracteres de antígeno primário. Sob o ponto de vista prático, as divergências entre as opiniões de Wheeler e Weil não teriam maior significação, se não tendessem a tornar algo confusa a classificação sorológica dos *b. paradysentéricos*, pois nem sempre há correspondência entre os diversos tipos desses AA.

No quadro I estão reproduzidas as classificações de Andrewes e Inman e a de Boyd, com a sua equivalência em relação à mais recente de Wheeler⁵ e que foi por nós adotada neste trabalho.

QUADRO I

Andrewes e Inman	Boyd	Wheeler
V	V	I
W	W	II
Z	Z	III
—	Boyd 103	IV
—	Boyd P 119	V
—	Boyd 88	VI
X	—	—
Y	—	—
—	Boyd 170	VII
—	Boyd P 288	VIII
—	Boyd P 274	IX
—	Boyd D 1	X
—	Boyd D 19	XI
—	Boyd P 143	XII

MÉTODOS E MATERIAL

O método utilizado por nós para a identificação sorológica dos *b. paradysentéricos* foi, em suas linhas gerais, o proposto por Wheeler⁶, tanto para o preparo dos soros polivalentes e tipo específicos como para as aglutinações em lâmina.

SOROS: As amostras de *Sh. paradysenteriae* utilizadas na preparação dos soros foram cedidas por Wheeler a um de nós (A.E.T).

Tratava-se de amostras lisas (suspensão estável, não aglutináveis por solução de tripaflavina a 0,2% e com morfologia normal). Os animais foram inoculados em dias alternados na quantidade de 1cc com doses crescentes da suspensão de germens; a 1.^a inoculação foi mais ou menos de 300.000.000 e a última de 1.200.000.000 por cc. Foram feitas 5 inoculações, sendo as duas primeiras sub-cutâneas com germens em suspensão formolada a 0,4% e as três últimas na veia com germens vivos.

Após 5 dias da última inoculação procedia-se a uma sangria de prova, com sangue obtido por punção do coração quando não foi possível a punção da veia marginal da orelha.

Verificada por aglutinação em tubo a existência de um título suficiente procedia-se à sangria definitiva. O sangue era obtido em condições de limpeza, mas não de assepsia; era conservado em geladeira por 24 horas mais ou menos quando então se procedia à centrifugação e separação do soro, adicionando-se por fim ácido fênico na concentração de 0,5%, o que mantém a esterilidade apesar da técnica "sética".

Com os diversos soros assim obtidos prepararam-se 2 soros polivalentes, que foram denominados A e B. O soro A foi obtido misturando-se partes iguais dos soros I a VI e o B adicionando-se partes iguais dos soros VII a XII. O funcionamento de ambos foi verificado por aglutinação em lâmina com as diversas culturas utilizadas nas inoculações, como se pode observar nas quadros II e III.

QUADRO II

Soro Polivalente A	Aglutinação em lâmina com as amostras													
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	X	Y
não absorvido	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

QUADRO III

Soro Polivalente B	Aglutinação em lâmina com as amostras															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	X	Y	Son nei	Alk.
não absorvido	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
absorvido com Sh. sonnei e Alkales cens.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Os soros puros para um determinado tipo foram obtidos após se ter verificado por aglutinação em lâmina, quais as amostras que davam aglutinações cruzadas; entre estas escolhiam-se as que demonstravam aglutinação mais intensa para com elas proceder à absorção das aglutininas não desejadas. Quase sempre as reações mais fortes foram obtidas com as raças X e Y, que por êsse motivo foram as mais frequentemente usadas. As raças eram semeadas na véspera em tubos de caldo glicosado, e 2cc. do caldo eram então distribuídos em placas de alumínio (25 x 25 cms), contendo ágar comum ou ágar Hottinger; após 24 horas a 37° retirava-se o excesso do líquido e o crescimento era aspirado com uma pipeta Pasteur, sendo quase sempre necessário diluir um pouco a cultura com pequena quantidade de sôro a absorver. A quantidade de germens necessários para uma absorção completa é evidentemente variável em cada caso particular; por tentativa verificamos que na maioria das vezes era necessária uma placa (25x25cms) para a absorção de 15cc de sôro.

Os soros a serem absorvidos foram diluídos a 1/10 com solução fisiológica e as absorções realizadas em banho-maria a 37-39° durante 2 horas. Findo êsse prazo eram centrifugados a 4.000 rotações por minuto em centrífuga inclinada e o sôro límpido separado por aspiração. Verificava-se a seguir, por aglutinação em lâmina, se a absorção fôra completa; caso contrário, procedia-se a nova absorção até desaparecimento completo das aglutininas não específicas. A seguir cada um dos soros tipo-específico era experimentado com outras amostras de *Shigellas* com o fim de verificar a possível existência de reações cruzadas. Tal fato foi verificado apenas com os soros IX e XI que precisaram ser absorvidos respectivamente com amostras de Sh. Alkalescens e Sh. Sonnei, o que confirma observações anteriores de Wheeler sôbre a existência de componentes antigênicos comuns entre os tipos P274 (IX) e D19 (XI) e as referidas *Shigellas*. Obtido o sôro específico para o tipo desejado, adicionava-se ácido fênico como preservativo e distribuía-se o sôro em pequenos frascos de vidro munidos de rôlha com conta-gotas.

O quadro IV mostra de maneira esquemática todas as operações realizadas para a obtenção dos diversos soros tipo-específicos e o seu comportamento após as respectivas absorções. Para

evitar confusão com o tipo X (Wheeler), a raça X de Andrewes e Inman é representada entre parentesis (X).

QUADRO IV

SÔRO TIPO-ESPECÍFICO		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
ABSORVIDO COM AS CULTURAS		(X),Y II III	I Y	I (X),Y	I III	(X),Y	(X),Y I	—	I,Y (X)	Alk. I,Y	I,(X)	Sonnei I,(X),Y	I,II
EXPERIMENTADO COM AS CULTURAS	I	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
	VI	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
	(X)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	VII	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
	VIII	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
	IX	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
	XI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
XII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
Sonnei	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alk.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

CULTURAS: As amostras utilizadas no presente trabalho apresentavam os caracteres morfológicos e culturais e as reações bioquímicas gerais próprias do grupo; foram na sua maior parte isoladas no Instituto Adolfo Lutz durante os últimos anos, em nosso laboratório; outras nos foram fornecidas pela Coleção de Culturas do referido Instituto e pelo Dr. Luís de Sales Gomes; algumas nos foram cedidas pelos Drs. Lucas Assumpção (Faculdade de Higiene e Saúde Pública) e Nelson Planet (Instituto Biológico). Os germens foram cultivados em tubos de ágar-comum; após 24 horas de estufa a 37° foi adicionada aos tubos solução fisiológica formolada (a 0,4%) em quantidade adequada para se obter uma suspensão espessa. Verificada a inexistência de auto-aglutinação a suspensão era aspirada com uma pipeta Pasteur mu-

nida de um pequeno filtro de algodão na extremidade afilada, e uma gota era depositada sobre a superfície quadriculada de uma placa de Hudleson. Cada raça era experimentada inicialmente com os dois soros polivalentes A e B. Para isso depositava-se uma gota do respectivo soro sobre a gota da suspensão dos germens; misturava-se com um fino bastão de vidro e verificava-se a existência ou não de aglutinação. Quando esta não se manifestava imediatamente prolongava-se a observação por alguns minutos (4 ou 5), submetendo-se a placa a movimentos de rotação. Verificada a aglutinação com qualquer dos 2 soros, procedia-se então à prova com os soros específicos correspondentes, procedendo-se de forma semelhante à anterior. Quase sempre as aglutinações foram rápidas e nítidas, muitas vezes imediatas; três culturas apesar de aglutinadas a frio com o soro polivalente A precisaram ser previamente fervidas durante meia hora, para aglutinarem com os soros tipo-específicos.

RESULTADOS

Foram examinadas 225 amostras de *Sh. paradysenteriae*.

Dêse total, 200 culturas (88,8%) puderam ser identificadas como tipos sorológicos no conceito de Wheeler, isto é, como possuindo um antígeno tipo-específico único; 25 amostras não puderam ser classificadas de acordo com esse conceito.

O quadro anexo (V) mostra a frequência dos vários tipos sorológicos no material por nós estudado.

QUADRO V

Tipos de Wheeler	Equivalência	N.º de culturas	%
I	Andrewes V	34	17 %
II	Andrewes W	100	50 %
III	Andrewes Z	7	3,5%
IV	Boyd 103	19	9,5%
V	Boyd P 119	26	13 %
VI	Boyd 88	5	2,5%
VII	Boyd 170	2	1,0%
VIII	Boyd P 288	1	0,5%
IX	Boyd P 274	0	0,0%
X	Boyd D 1	0	0,0%
XI	Boyd D 19	3	1,5%
XII	Boyd P 143	3	1,5%

DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos revela com grande evidência a predominância dos tipos de Wheeler I, II e III (V, W e Z primitivos de Andrewes e Inman) que constituem 70,5% do total examinado; nos restantes 29,5% estão incluídos os demais tipos "Flexner" e 4 dos tipos "Boyd", não tendo sido identificados representantes dos tipos IX e X (Boyd P274 e D1). Examinados sob o ponto de vista dessa conclusão geral, os nossos resultados se aproximam dos que têm sido obtidos pelos AA. estrangeiros ^{7, 8 e 9} que estudaram a distribuição dos diferentes tipos sorológicos dos b. paradisentéricos, e bem assim dos de A. Assis e colaboradores,¹⁰ realizados no Rio de Janeiro. É digno de nota, no entanto, o achado no nosso material, de um número relativamente grande de amostras pertencentes aos tipos Boyd 103 e Boyd 119, representados por 22,5% contra apenas 3,5% no material estudado por Assis. Com relação à frequência dos tipos individualmente considerados, os nossos dados confirmaram a maior incidência do tipo II (primitivo tipo W de Andrewes e Inman) que sózinho representa 50% de todos os tipos encontrados. Situa-se a seguir, o tipo I (Andrewes V), com 17% do total.

Das 5 amostras identificadas como tipo VI, quatro se comportaram bioquimicamente como o bacilo Manchester, e uma como Boyd 88. Acreditamos que a porcentagem de 2,5% encontrada para este tipo sorológico não represente a sua frequência real, pois a particularidade cultural facultativa de produzir gás nos meios de isolamento ou identificação habituais tende a dificultar o seu reconhecimento como b. disentérico.

Das 25 culturas que não puderam ser identificadas como pertencendo a nenhum dos tipos sorológicos admitidos por Wheeler, 16 aglutinavam com o sôro polivalente A, mas não eram aglutinadas por nenhum dos soros univalentes, tipo-específicos, adequadamente absorvidos. No conceito de Boyd e que é também o de Wheeler, essas amostras devem ser consideradas como pertencendo aos primitivos tipos X ou Y de Andrewes e Inman ou seja

como tipos que perderam os seus antígenos específicos, possuindo apenas os antígenos de grupo. As 9 culturas restantes comportaram-se de maneira diversa, pois aglutinaram igualmente bem com mais de um sôro tipo específico, confirmando aparentemente a afirmativa de Weil, com relação à existência de tipos sorológicos mistos. Tais culturas serão objeto de futuras pesquisas que oportunamente serão publicadas.

RESUMO

Os AA. estudaram o comportamento sorológico de 225 culturas de *Sh. paradysenteriae*, utilizando-se do método de aglutinação em lâmina com sôros tipo-específicos, proposto por Wheeler. Puderam ser identificadas como tipos sorológicos definidos 200 amostras, 50% das quais foram classificadas como tipo II; foram também frequentes os tipos I (17%), V (13%) e IV (9,5%). Os demais tipos foram identificados com menor freqüência, não tendo sido encontrados os tipos IX e X. Não foram demonstrados antígenos tipo-específicos em 16 culturas, que devem ser considerados como raças X ou Y. Segundo os conceitos de Wheeler, não puderam ser classificadas 9 amostras, pois revelaram possuir mais de um antígeno tipo-específico.

SUMMARY

The authors analysed serologically 225 cultures of *Shigella paradysenteriae* by the slide-agglutination test of Wheeler with type-specific sera. Of the 200 cultures that could be identified by this method, type II was the most frequent (50%); also common were types I (17%), V (13%) and IV (9,5%). Other types were identified less frequently; no types IX and X were found. Type-specific antigens were not detected in 16 cultures; since strong reactions were given by them with polyvalent sera they were regarded as belonging to the former X and or Y types. Agglutination with more than one type-specific sera was obtained with 9 other *Sh. paradysenteriae* cultures; these strains will be more thoroughly studied and reported later.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDREWES, F. W. e INMAN A. C. — 1919 — A study of the serological races of the Flexner group of dysentery bacilli — *Medical Research Council, Special Report Series*, N.º 42, London.
- 2 — BOYD, J. S. K. — 1938 — The antigenic structure of the manitol-fermenting group of dysentery bacilli — *J. Hyg.*, 38: 477-499.
- 3 — WHEELER, K. M. — 1944 — Antigenic relationships of *Shigella paradysenteriae* — *J. Immunol.*, 48: 87-101.
- 4 — WEIL, A. J. BLACK, J. e FARSETTA, K. — 1944 — The serological types of *Shigella Paradysenteriae* (Flexner). — *J. Immunol.*, 49: 321-351.
- 5 — 1945 Stool and urine cultures for enteric disease organisms. Connecticut State Department of Health. Bureau of Laboratories Approved Method EN-1
- 6 — WHEELER, K. M. — 1944 — Serological Identification of Dysentery bacilli — *Am. J. Public Health*, 34: 621-629.
- 7 — GONZÁLEZ, I. M. e OTERO, P. M. — 1945 — Antigenic and biochemical studies of *Sh. paradysenteriae* isolated in Puerto Rico. *J. Immunol.*, 50: 373-376.
- 8 — EWING, W. H. e GRAVATTI, J. L. — 1947 — *Shigella* types encountered in the Mediterranean area — *J. Bact.*, 53: 191-195.
- 9 — FULTON, M. e CURTIS, S. F. — 1946 — Bacteriology of collection of *Shigella* Strains — *J. Inf. Dis.*, 78: 198-203.
- 10 — ASSIS, A., MONTEIRO FILHO, A. e RIBEIRO, V. R. L. — 1946 — Tipos sorológicos de *Shigella paradysenteriae* no Rio de Janeiro — *O Hospital*, 30: 367-374.