

SHIGUELOSES

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE COLHEITA DAS FEZES NO DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DAS ENTEROCOLITES CRÔNICAS. AGLUTININAS E COPROAGLUTININAS NA ENTEROCOLITE CRÔNICA (*)

AUGUSTO DE E. TAUNAY (**)

J. FERNANDES PONTES (***)

ERASTO PRADO (****)

ETHEL SANDOVAL PEIXOTO (*****)

1) COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE COLHEITA NO DIAGNÓSTICO DE ENTEROCOLITES CRÔNICAS. VERIFICAÇÃO DE AGLUTININAS E COPROAGLUTININAS NA ENTEROCOLITE CRÔNICA.

Estudos clínicos e epidemiológicos que se seguiram à descoberta de Shiga, em 1898, sobre a etiologia bacteriana de algumas formas de disenteria, demonstram que a moléstia pode ser provocada por grande número de bactérias de fácil identificação, tôdas elas enquadradas no gênero *Shigella*, família *Enterobacteriaceae*.

A expressão disenteria bacilar, usualmente empregada para caracterizar a infecção, é bastante imprópria porque, se em grande número de casos a enterite aguda domina o quadro (acompanhada dos sintomas clássicos: febre, diarréia, cólicas intestinais e tenesmos), não podemos esquecer as formas atípicas em que a sintomatologia

(*) Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas e laudado com o prêmio "Mário Pereira" (1955).

(**) Chefe da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

(***) Chefe do Serviço de Gastreenterologia do Hospital das Clínicas.

(****) Protologista do Serviço de Gastreenterologia do Hospital das Clínicas.

(*****) Técnico de laboratório do Instituto Adolfo Lutz.

Recebido para publicação em 1-3-56.

disentérica está ausente, na história atual ou remota, compondo o quadro clínico de enterocolite crônica. É bem provável, e disto nos convencemos cada vez mais, que estas formas atípicas sejam bem mais freqüentes do que se pensa.

Com muita razão, ASSIS (1935) propôs a denominação de shigelose em substituição à de disenteria bacilar, aí englobando "tô-das as determinações patológicas produzidas por bacilos disentéricos, quer os intestinais como os extraintestinais".

O diagnóstico das shigeloses agudas não é maior problema para o clínico e para o laboratorista, uma vez que apresenta sintomas bastante característicos, sendo o germe causador facilmente encontrado nos exsudatos intestinais, muitas vezes em cultura pura. Já o mesmo não acontece nas formas crônicas em que não existem sintomas característicos, sendo o agente causador, por vezes, dificilmente encontrado nas fezes.

Tais processos são, justamente, os de maior importância porque, além do desconforto que trazem aos doentes, são os principais responsáveis pela disseminação da moléstia. Para sua elucidação é que o laboratório muito pode contribuir, evidenciando a presença de bacilos disentéricos nas fezes ou investigando a presença de coproanticorpos ou de anticorpos sanguíneos.

Grandes progressos foram conseguidos, nestes últimos anos, na obtenção de meios de cultura que facilitam, extraordinariamente, o isolamento desses germes, mas condições outras, além do meio de cultivo, podem influir no resultado do exame, razão por que nos propusemos a avaliar técnicas diferentes de colheita das fezes e, sempre que possível, a realizar a pesquisa de coproanticorpos e aglutininas sanguíneas. Os motivos que nos levaram a assim proceder foram devidos a opiniões discordantes que existem sobre o assunto e que passaremos a analisar, começando pela cultura das fezes, onde o método de colheita, o transporte ou os meios de cultura usados influem grandemente nos resultados.

Método de colheita do material para exame. Quatro foram os processos escolhidos: 1) fezes eliminadas normalmente; 2) colheita direta no intestino por aspiração nas lesões intestinais ou nas criptas da mucosa; 3) "swab" retal; 4) raspado retal.

O primeiro processo é o mais empregado, não requer qualquer cuidado especial, possibilitando ao laboratorista escolher as partes que mais interessam para o exame, ou sejam, as mucosidades que quase sempre estão presentes nos casos de shigelose crônica. É o método de escolha para BOYD (1940).

A colheita direta no intestino por aspiração, método preconizado por FELSEN (1938), praticada com o auxílio do sigmoidoscópio, permite, além de se observar o estado da mucosa, a obtenção de material diretamente das ulcerações porventura existentes, assim como das criptas da mucosa. Em geral, nas fezes e secreções assim obtidas, o número de germes saprófitos é reduzido, o que possibilita sementeiras generosas sem temor de sobrecarregar as placas. Segundo seu idealizador, com técnica apropriada e exames repetidos, pode-se demonstrar, em grande número de casos, a presença de bacilos disentéricos.

As desvantagens do método seriam a aparelhagem e o tempo de que se necessita para a sua execução, exigindo sempre a presença do protologista, além de facilidades para que as sementeiras possam ser feitas imediatamente após a colheita.

O "swab" retal descrito por HARDY e WATT (1944), grandemente empregado por autores americanos, sendo de execução muito simples, permite obtenção de material a qualquer momento e, portanto, é muito conveniente para quando se necessita examinar grande número de pessoas. A crítica que se pode fazer a este processo é de que a colheita, sendo feita às cegas, consistindo em simples massagem da porção terminal da mucosa retal, nem sempre atingiria os lugares adequados. Além do mais, havendo necessidade de transporte, o dessecamento dos tampões de algodão se processa rapidamente, servindo unicamente para os locais em que a colheita é imediatamente seguida pela sementeira do material. TAUNAY (1951), usando a técnica de Hardy e col., obteve resultados nitidamente superiores no isolamento de bacilos disentéricos, comparativamente ao exame das fezes colhidas normalmente. THOMAS (1954), entretanto, indica várias falhas do método e mesmo um dos seus preconizadores, HARDY (1955), estudando a incidência de salmonelas no intestino de porcos, acentua que a colheita pelo "swab", feita logo após a morte do animal — com o esfíncter retal relaxado — permite o dôbro de isolamentos positivos, em confronto com a colheita no animal vivo. Dos mesmos animais, conseguiram resultados melhores cultivando fezes obtidas no ceco.

Raspado retal — Processo muito semelhante ao descrito por Felsen. Em lugar de obtermos material para cultura por aspiração usando tubo de vidro com pêra de borracha, êsse é conseguido raspando a mucosa retal com cureta. O método tem os mesmos inconvenientes do processo descrito por Felsen. ASSIS (1937), em 163

pacientes, portadores de retite crônica, isolou de 38 dêles, bacilos disentéricos do grupo Flexner sem que o germe pudesse ser evidenciado pelo exame das fezes. O processo usado por Assis é um misto de "swab" e raspado.

Meios de cultura — Todos os meios de cultura, usualmente empregados para o isolamento de bacilos disentéricos, consistem em uma base de ágar lactosado à qual se junta, além de um ou mais indicadores de reação, substâncias bacteriostáticas que impedem o desenvolvimento de germes gram-positivos, inibindo, ao mesmo tempo, bacilos dos grupos *coli* e *Proteus* sem prejudicar o crescimento dos disentéricos.

O uso de meios altamente seletivos tem dado resultados muito satisfatórios, mas apresenta o inconveniente de impedir o desenvolvimento de certos tipos de shiguelas (PESTANA e FARACO, 1940).

HORMAECHE e col. (1941), comparando alguns dêesses meios e, ao mesmo tempo, fazendo revisão sôbre o assunto, concluem que de todos os meios de cultura conhecidos, até hoje, o ágar SS é o que tem dado melhores resultados, no que estão de acôrdo GALTON e col. (1950) e KAUFFMAN (1951). O inconveniente de usar meio altamente seletivo pode ser corrigido fãcilmente pelo emprêgo de uma segunda placa de meio diferenciador.

O sucesso do exame, como demonstrou THOMSEN (1955) também depende do número de bactérias patogênicas existentes nas fezes, que não raro aparecem nas placas em formas atípicas. Daí ser de grande conveniência isolar grande número de colônias, sejam típicas ou não.

Métodos indiretos — 1). Pesquisa de coproanticorpos — A verificação de DAVIES (1922), de que nos casos agudos de shigelose era possível encontrar, nas fezes, anticorpos homólogos ao germe isolado, foi confirmada por PREDCHESNKY e col. (1940) que aconselham tal processo como rotina de diagnóstico. BURROWS e col. (1947) fazendo estudos experimentais, com o cólera em cobaios, mostrou que sendo esta infecção exclusivamente intestinal, provocava nas fezes o parecimento de imuno-globulina em tudo semelhante à do sangue e por êle denominada coproanticorpo. Verificou, também, que aparece no intestino por curto período, podendo ser encontrado muito antes dos anticorpos sanguíneos, desaparecendo de 3 a 4 semanas após o término da infecção, ao passo que os anticorpos sanguíneos perduram por muito mais tempo. O valor diagnóstico dos coproanticorpos foi contestado por SILLIKER e col. (1952) que, traba-

lhando com 18 antígenos dos grupos *Shigella* e *Salmonella*, obtiveram resultados contraditórios. Assim é que em 41 pacientes com perturbações gastrentéricas de quem não fôra possível isolar germes patogênicos, em 21 obtiveram reações positivas (51%). De 58 outros indivíduos com sintomas similares, mas em quem se isolou uma bactéria patogênica, somente em 21 (36%) conseguiram reações positivas. Daí concluírem ser o método pouco utilizável na rotina diagnóstica. GONZALEZ e col. (1950), usando métodos semelhantes, não conseguiram evidenciar coproanticorpos e BARKSDALE e col. (1951) em um caso de colite ulcerativa, encontraram coproanticorpos reagindo com numerosos antígenos, todos do grupo disentérico. Das fezes do doente, isolaram bacilo do grupo *coli*, capaz de remover totalmente êsses coproanticorpos e um sôro preparado com êsse germe foi capaz de aglutinar todos os bacilos disentéricos que haviam sido aglutinados pelos extratos fecais.

2) *Anticorpos sanguíneos* — A presença de aglutininas específicas no sangue de doentes com disenteria bacilar foi verificada por SHIGA (1898) quando iniciou seus estudos sôbre a etiologia bacteriana das disenterias. A conclusão a que se chega todavia, consultando a literatura sôbre o assunto, é do pouco valor do método como meio diagnóstico.

FELSEN (1945), em apanhado que fêz sôbre o valor das aglutininas sanguíneas, chega a conclusões que, a nosso ver, são contraditórias, a saber: 1) a presença de aglutininas não é constante durante ou após um ataque pelo bacilo disentérico; 2) soros de indivíduos normais podem aglutinar bacilos disentéricos em diluições baixas; 3) a ausência de aglutininas em contrôles normais e sua presença na maioria dos casos de disenteria aguda ou crônica, torna seu achado de considerável valor diagnóstico; 4) a presença de um título diagnóstico não indica necessariamente shiguelose ativa (porque o paciente pode ter tido infecção prévia) nem sua ausência afasta a infecção; 5) como uma reação de Wassermann negativa no caso da sífilis ou uma reação de Widal positiva num convalescente de febre tifóide, o título aglutinante deve ser analisado juntamente aos dados clínicos do caso.

Recentemente, NETER e col. (1952) preconizaram o emprêgo da hemaglutinação para pesquisa de anticorpos sanguíneos nas shigueloses. Sendo reação mais sentível e específica, possibilitaria o diagnóstico da infecção por meio de prova de fácil execução. Grande número de trabalhos recentes têm demonstrado o seu valor como método diagnóstico para muitas moléstias infecciosas.

A presente investigação foi realizada em três grupos de indivíduos:

1.º) Pacientes com enterocolite crônica, submetidos a exames repetidos de fezes colhidas por técnicas diferentes. Em muitos destes foi feita a pesquisa de aglutininas sanguíneas e em alguns, a de coproaglutininas. Este grupo constituiu o objeto da principal parte deste trabalho, isto é, a comparação dos diferentes métodos de colheita de fezes e o valor da repetição de exames.

2.º) Acreditamos ser de interesse, para avaliação da incidência dos vários tipos de bacilos disentéricos existentes em São Paulo, apresentar os resultados de alguns milhares de culturas de fezes (5.916 exames) provenientes de pacientes com shigelose aguda ou crônica.

3.º) Inquérito bacteriológico sobre a incidência de enterobactérias patogênicas na população de um município do Estado de São Paulo. Julgamos que os informes fornecidos neste estudo são de grande interesse, por se tratar do único inquérito realizado, em nosso meio, em amostras colhidas ao acaso.

I — CULTURA DE FEZES E MÉTODOS DE COLHEITA DE MATERIAL

Em 123 indivíduos, todos com história de enterocolite crônica, na grande maioria dos quais fizemos 4 culturas de fezes em dias diferentes, num total de 2.628 culturas, obtivemos material para cultura pelas seguintes técnicas: a) fezes eliminadas naturalmente; b) por colheita direta na ampola retal mediante "swab"; c) por aspiração e d) por raspagem da mucosa retal.

A técnica usada para o "swab" foi a de HARDY e WATT (1944), que consiste em introduzir no reto estilete de arame com a ponta encastuada em algodão, dentro de um tubo de borracha com a extremidade distal (que entra em contato com a ampola retal) cortada obliquamente. O tubo, depois de lubrificado externamente, é introduzido até a metade, na ampola retal. Puxa-se o tubo alguns centímetros, mantendo-se firme o estilete. Este entra em contato com a mucosa retal e, por movimentos de tração e rotação, colhe material para exame. Introduce-se novamente o estilete dentro do tubo de borracha, retira-se o tubo e separa-se o estilete, que é usado para semeadura direta nas placas de cultura.

Para aspiração, a técnica adotada foi a de FELSEN (1938), que emprega tubo longo de vidro de parede capilar interna, apresentando extremidade distal angulada, precedida de uma dilatação ampular, suficiente para reter 2 a 3 gotas líquidas. Na outra extremidade do tubo há uma pêra de borracha com orifício, de modo que sua compressão não provoca a expulsão de ar ou fluido do tubo. Tapando-se o orifício da pêra, a sucção é produzida por diminuição da pressão dentro do tubo e êste, depois de fervido, conserva na dilatação ampular algumas gotas de água. Introduzido pelo sigmoidoscópio, sua extremidade distal é posta em contato com a mucosa, sob visão direta do observador. As gotas de água são projetadas sôbre a mucosa, praticando-se, imediatamente, a sucção do exsudato mucoso. Quando existem pequenas quantidades de muco, sangue ou pus, são aspiradas com o conteúdo da cripta. O material aspirado é semeado diretamente nas placas de cultura.

Na raspagem, usamos cureta de cabo longo introduzida pelo sigmoidoscópio e praticamos, a seguir, a raspagem da mucosa retal nos pontos visibilizados pelo sigmoidoscópio. O material, assim obtido, foi semeado diretamente nas placas de cultura.

O tempo médio entre a primeira e a última colheita foi, em geral, de 12 dias, período durante o qual os pacientes não foram tratados por agentes quimioterápicos ou por antibióticos.

Fezes colhidas naturalmente foram emulsionadas em glicerina e meio de Leifson, antes de levadas ao laboratório.

Cultura das fezes — Tôdas as culturas foram realizadas usando-se sempre a mesma técnica, que em linhas gerais foi a seguinte: como meios de isolamento empregamos uma placa de meio ágar SS e de Holt-Harris-Teague e como meio de enriquecimento, o Selenito F, também passado para uma placa de ágar SS e de Holt-Harris-Teague. No caso de colheita direta no intestino, não foi utilizado qualquer meio de enriquecimento, limitando-se o exame à semeadura direta em placas. Tôdas as colônias suspeitas foram repicadas para um tubo de tríplice açúcar modificado que, além da viragem própria do meio, nos informa sôbre a produção de gás sulfídrico e desdobramento de uréia. A identificação foi baseada nas propriedades morfológicas do germe, complementada por provas sorológicas e tipagem final mediante sôros monovalentes tipo-específicos. A nomenclatura usada é a aconselhada pelo Comitê Internacional de Enterobactérias e foi proposta no V Congresso Internacional de Microbiologia realizado no Rio de Janeiro em 1950.

RESULTADOS

1.º) *Grupo de pacientes com enterocolite crônica*: Nos 123 pacientes dêste grupo, nos quais realizamos 2.628 culturas, em 42 encontramos uma enterobactéria patogênica.

QUADRO I

	POSITIVO	NEGATIVO
Sh. flexneri tipo 1	2	
" " " 2	12	
" " " 3	3	
" " " 4	1	
" " " 5	1	
Sh. alkalescens	9	
Sh. sonnei	6	
Salmonella sp.	8	
Total	42 (34,1%)	81 (65,9%)

Sendo o nosso objetivo comparar a eficiência de métodos para colheita de material, reproduzimos, no quadro II, todos os exames positivos para os diferentes métodos e a freqüência respectiva de positividade. O quadro II se acha resumido na tabela I.

	Fezes	Swab	Aspiração	Raspado
1.ª série	13 — 30,8%	14 — 33,3%	11 — 26,1%	15 — 35,9%
2.ª série	6 — 14,2%	5 — 11,9%	2 — 4,7%	6 — 14,2%
3.ª série	11 — 26,1%	4 — 9,5%	2 — 4,7%	2 — 4,7%
4.ª série	4 — 9,5%	1 — 2,3%	2 — 4,7%	3 — 7,1%
	34 — 80,6%	24 — 57,0%	17 — 40,2%	26 — 61,9%

Tabela I: Inclui 8 casos positivos para salmonelas. Totais de casos positivos para shiguelas: 26.

QUADRO III

Germe isolado	Colheita	1. ^a série	N.º	%	2. ^a série	N.º	%	3. ^a série	N.º	%	4. ^a série	N.º	%	Total
Sh. flexneri	Fezes	9	18	50,0	1	18	5,5	4	17	23,5	0	17	0,0	79,0%
	Swab	11	19	57,7	2	19	10,5	3	18	16,4	1	18	5,5	89,8%
	Aspiração . .	8	19	42,1	2	19	15,2	0	18	0,0	2	18	11,1	68,4%
	Raspado . . .	13	19	68,4	2	19	10,5	1	18	5,5	1	18	5,5	89,9%
Sh. alkaliscens	Fezes	3	10	33,3	1	10	10,0	1	10	10,0	1	10	10,0	63,3%
	Swab	3	10	33,3	2	10	20,0	1	10	10,0	0	10	0,0	63,3%
	Aspiração . .	3	10	33,3	1	10	10,0	0	10	10,0	0	10	0,0	43,3%
	Raspado . . .	0	10	0,0	0	10	0,0	3	10	33,3	0	10	0,0	33,3%
Sh. sonnei	Fezes	1	6	16,5	0	6	0,0	3	6	50,0	2	6	33,0	99,5%
	Swab	0	6	0,0	1	6	16,5	0	6	0,0	0	6	0,0	16,5%
	Aspiração . .	0	6	0,0	0	6	0,0	1	6	16,5	0	6	0,0	16,5%
	Raspado . . .	0	6	0,0	1	6	16,5	0	6	0,0	1	6	16,5	33,0%
Salmonella sp.	Fezes	0	8	0,0	3	8	37,5	3	8	37,5	2	8	25,0	100,0%
	Swab	0	8	0,0	0	8	0,0	0	8	0,0	0	8	0,0	0,0%
	Aspiração . .	0	8	0,0	0	8	0,0	0	8	0,0	0	8	0,0	0,0%
	Raspado . . .	0	8	0,0	0	8	0,0	0	8	0,0	1	8	12,5	12,5%

A vantagem obtida com o exame de fezes eliminadas naturalmente ficará muito diminuída se deduzirmos os exames positivos para salmonelas porque aqui intervém um fator novo ou seja o método de enriquecimento, que não foi usado para os outros processos.

Analisando o valor de cada um dos diferentes métodos de colheita, em relação para cada um dos grupos de enterobactérias patogênicas isoladas, encontramos variações muito grandes, expostas no quadro III.

Em 12 dos casos positivos o germe foi sempre encontrado, em material colhido por êste ou aquêle método, durante todo o período da verificação. Êstes casos se referem, unicamente, a bacilos disentericos e os resultados estão condensados no quadro IV.

QUADRO IV

	FEZES			"SWAB"			ASPIRAÇÃO			RASPAGEM		
	Pos.	Casos	%	Pos.	Casos	%	Pos.	Casos	%	Pos.	Casos	%
1. ^a . . .	4	12	33,3	5	13	38,4	3	13	23,0	4	13	30,7
2. ^a . . .	2	12	16,6	3	13	23,0	2	13	15,3	4	13	30,7
3. ^a . . .	5	12	41,6	3	13	23,0	0	13	0,0	3	13	23,0
4. ^a . . .	1	12	8,3	0	13	0,0	2	13	15,3	1	13	7,6
	12	12	99,8	11	13	84,4	7	13	53,6	12	13	92,0

II — CULTURAS DE FEZES PROVENIENTES DE PACIENTES COM SHIGUELOSE AGUDA OU CRÔNICA

Exames realizados de 1950 a 1954 para diagnóstico de moléstia entérica de etiologia bacteriana.

Foram feitas 5.916 culturas de pessoas residentes na cidade de São Paulo e arrabaldes. O material para exame nos foi enviado sem sabermos o tempo que mediou entre a emissão das fezes e o início do exame. Nunca recebemos fezes já emulsionadas em líquido conservador e raramente obtivemos dados referentes aos pacientes.

Dado o número elevado de exames feitos, os resultados são indicativos da freqüência de enterobactérias patogênicas para um período de 5 anos num total de 5.916 doentes examinados.

No quadro V estão referidos os germes encontrados nos vários anos. A inclusão de salmonelas foi motivada por representar um dado de interesse, apesar de fugir da finalidade dêste trabalho.

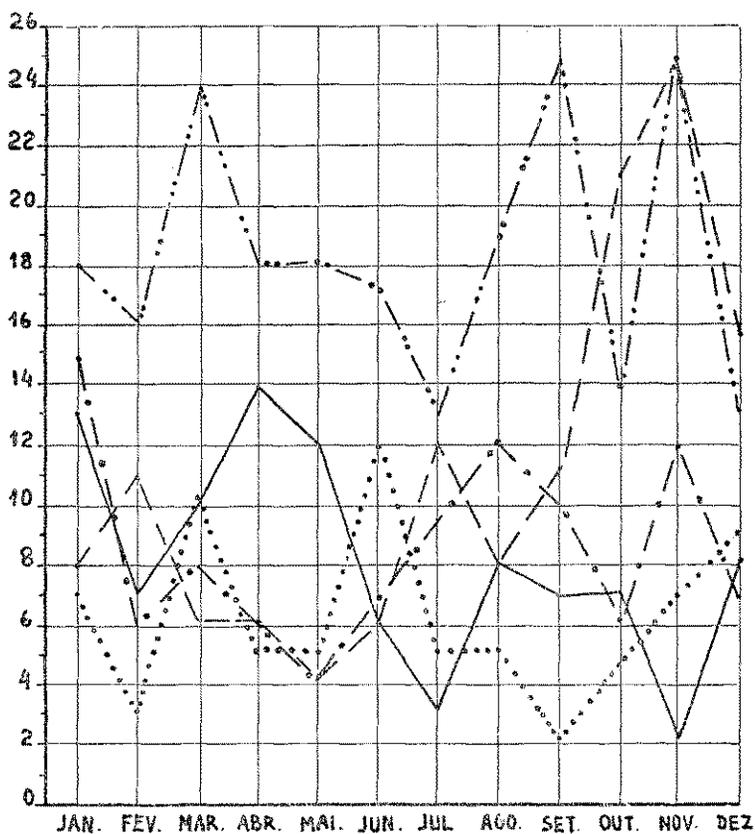
No quadro VI está representada a incidência dêsses germes, distribuída pelos vários meses.

QUADRO V

	1950		1951		1952		1953		1954		Total	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.								
Sh. flexneri tipo 1	5		1		2		1				9	
" " " 2	19		39		36		42		102		238	
" " " 3	9		7		2		3		8		29	
" " " 4	5		3		4		8		5		25	
" " " 5							2		7		9	
" " " 6	3		5				17		27		52	
Sh. boydii " 6							1		1		2	
Sh. sonnei	15		13		14		23		43		108	
Sh. alkalescens	23		25		36		34		17		135	
Sh. dysenteriae tipo 2	2				1		1		8		12	
" " " 3			1				1				2	
" " " 6	5				1		2				8	
" " " 7							1				1	
Sh. dispar	8		3								11	
S. typhi					11		11		20		42	
S. newport	7		3		5		9		12		36	
S. anatum	3		1		3		6		12		25	
S. london	1		1		3		1				6	
S. rostock	1						1				2	
S. typhimurium			1		2		5		5		13	
S. paratyphi B			2				4		1		7	
S. paratyphi A			1				2				3	
S. panama			1				2				8	
S. bredney			1						5		5	
S. montevideo					2		2		2		6	
S. oranienburg					1		7		1		9	
S. derby					1		9		4		14	
S. butantan					1		3		1		5	
S. senftenberg							1		4		5	
S. paratyphi C							3		1		4	
S. havana							1				1	
S. sendai									1		1	
S. brandenburg									1		1	
S. newington									1		1	
S. give	1						1				2	
TOTAL	107	757	108	905	125	920	204	1008	293	1492	837	5082

QUADRO VI

EXAMES REALIZADOS	EXAMES POSITIVOS	%
1950	852	11,03
1951	918	10,23
1952	1.045	9,18
1953	1.083	20,31
1954	1.547	14,80



LEGENDA {

- 1950
- 1951
- 1952
- 1953
- 1954

III — EXAMES DE FEZES REALIZADOS EM AMOSTRA COLHIDA AO ACASO, NA POPULAÇÃO URBANA E RURAL DE UM MUNICÍPIO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

As fezes para exame nos foram enviadas em líquido conservador (solução de glicerina-cloreto de sódio tamponada), mediando o tempo entre a colheita e o exame, aproximadamente, 12 horas. A técnica empregada já foi descrita e as sementeiras em meio de Selenito F foram feitas com a mistura de fezes e solução de glicerina-cloreto de sódio.

Foram feitos 1.552 exames e os resultados estão condensados no quadro VII.

QUADRO VII

	Positivo	Negativo
Sh. flexneri tipo 2	21	
Sh. flexneri " 3	8	
Sh. flexneri " 5	4	
Sh. flexneri " 6	1	
Sh. sonnei	16	
Sh. alkalescens	15	
Sh. dysenteriae tipo 2	1	
S. typhi	4	
Salmonella sp.	6	
Total	76	1476

Para êste grupo, obtivemos dados referentes a idade, sexo e residência. Nos quadros VIII e IX transcrevemos êsses achados divididos por grupos etários, sexo, local de residência e germe encontrado.

QUADRO VIII

Idade	ZONA URBANA				ZONA RURAL				Total	
	Homens		Mulheres		Homens		Mulheres		Pos.	Neg.
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.		
0-1	2	29	0	22	0	11	0	2	2	64
1-5	7	59	1	60	1	23	5	24	14	166
5-10	9	80	5	78	2	30	3	26	19	214
10-20	4	109	3	119	1	47	0	38	8	313
20 ou mais	6	246	24	312	0	94	3	67	33	719
Total	28	523	33	591	4	205	11	157	76	1476

QUADRO IX

GERME ISOLADO	ZONA URBANA										ZONA RURAL										Total
	0-1		1-5		5-10		10-20		20 ou mais		0-1		1-5		5-10		10-20		20 ou mais		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<i>Sh. flexneri</i>	0	0	5	1	3	2	0	1	4	8	0	0	0	4	1	3	0	0	0	2	34
<i>Sh. alkalescens</i> . .	1	0	0	0	2	2	2	1	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	15
<i>Sh. sonnei</i>	1	0	2	0	3	1	1	1	0	4	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	16
<i>Sh. ambigua</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. typhi</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>Salmonella sp.</i> . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4
Total	2	0	7	1	9	5	4	3	6	24	0	0	1	5	2	3	1	0	0	3	76

Pesquisas de anticorpos no sangue — Usamos para pesquisa de anticorpos duas técnicas de aglutinação, uma empregando antígenos bacterianos e a outra, antígenos solúveis, adsorvidos na superfície de hemácias (hemaglutinação). Foi nossa finalidade, além de verificar títulos aglutinantes, comparar o valor dos dois métodos, porque usando a técnica de hemaglutinação seria possível, com um número restrito de provas, como veremos adiante, verificar o mosaico completo de anticorpos, que correspondem aos vários tipos de bacilos disentéricos.

Os soros usados são, na sua maioria, dos doentes nos quais realizamos a série de 4 exames de fezes, incluindo-se, também, uma série de soros desconhecidos que nos foram enviados para diagnóstico de lues.

Antígenos — Para as reações de aglutinação simples, usamos uma amostra de *Sh. flexneri*, tipo 2 e uma *Sh. sonnei* em fase I, provenientes de culturas em meio de ágar comum, suspensas em

salina em concentração equivalente ao número 3 da escala de Mac Farland.

Para sensibilizar hemácias, vários antígenos foram experimentados, todos dando resultados equivalentes. Optamos pelo emprego das culturas em caldo, autoclavadas vinte minutos a 120° C, segundo técnica descrita por NETER e col. (1952), pois permite obtenção de antígenos em maior quantidade, sem outras manipulações complementares.

Sendo fato conhecido que hemácias de vários animais podem adsorver numerosos antígenos diferentes, preparamos antígenos múltiplos com a finalidade de, numa única reação, verificar a presença de vários anticorpos. Para tanto semeamos em garrafa de caldo comum, diferentes tipos de bacilos disentéricos, para aí ter dissolvidos vários antígenos. Preparamos cinco antígenos polivalentes que correspondiam aos 7 tipos de *Sh. dysenteriae*, 6 de *Sh. flexneri*, 7 de *Sh. boydii*, 2 de *Sh. alkalescens* e de *Sh. sonnei*, nas duas fases. Esses antígenos foram verificados com soros-padrões preparados em coelho, constatando-se a exequibilidade do processo.

É indispensável, antes de praticar as sementeiras, verificar se o caldo de cultura não hemolisa as hemácias. A verificação prévia da presença de todos os antígenos desejados foi feita por meio de soros-padrões, o que permite corrigir um antígeno, juntando caldo da cultura do antígeno que porventura falte. Em nosso caso, quando tal fato aconteceu, juntamos 1 cm³ do antígeno em falta (caldo) a 9 cm³ do antígeno polivalente.

Hemácias — Iniciamos nosso trabalho usando hemácias de carneiro. Em seguida foram abandonadas, porque, além de obrigar absorção prévia dos soros, muitas vezes, obtínhamos resultados diferentes, quando usávamos sangue de carneiros diferentes. Por essas razões, preferimos adotar hemácias humanas, do tipo 0, obtidas com assepsia em líquido de Alsever e conservadas em geladeira, sendo consumidas em uma semana.

Sensibilização das hemácias — As hemácias centrifugadas foram lavadas uma vez com salina simples e depois juntadas ao caldo-antígeno na concentração de 1,5%. Banho-maria a 37° C, por 2 horas, sofrendo freqüentes agitações. Centrifugar e lavar três vezes com solução fisiológica e suspender novamente em salina, recompondo a concentração inicial de 1,5%. *Reação propriamente di-*

ta — Juntamos a 0,2 cm³ das várias diluições do sôro a 0,2 cm³ da suspensão de hemácias sensibilizadas, de modo a ter diluição inicial do sôro de 1/50. Incubação em banho-maria, por 2 horas e geladeira até o dia seguinte.

As mesmas diluições foram usadas para as reações de aglutinação com antígenos bacterianos, somente que o volume final sôro-antígeno foi de 1 cm³ e a reação, incubada em estufa a 37° C por 18 horas.

Leitura das reações — Feita com lupa e considerada positiva até a diluição em que eram visíveis grumos de hemácias. Deve-se agitar brandamente os tubos, porque agitações fortes desfazem os grumos das reações de pequena intensidade.

Resultados — Inicialmente foi feito estudo comparativo entre as duas técnicas com 106 soros enviados para diagnóstico de lues, cujos resultados foram os seguintes:

QUADRO X

DILUIÇÃO DO SORO	ANTIGENO BACTERIANO		HEMAGLUTINAÇÃO				
	Sh. flexneri	Sh. sonnei	Sh. flexneri	Sh. sonnei	Sh. boydii	Sh. alkalescens	Sh. dysenteriae
0	17-16%	100-94,2%	29-27,2%	46-43,3%	25-23,6%	39-36,7%	31-29,2%
50	33-31%	3- 2,8%	33-31,1%	36-34,0%	35-33,0%	35-33,0%	32-30,1%
100	36-34%	3- 2,8%	34-32,0%	17-16,0%	34-32,0%	23-21,6%	30-27,9%
200	20-18%	0- 0,0%	10- 9,4%	7- 6,6%	12-11,3%	9- 8,5%	13-12,2%
Total	106	106	106	106	106	106	106

Chama logo atenção que os títulos aglutinantes com hemácias sensibilizadas foram muito semelhantes com quase todos os antígenos, discordando bastante dos resultados obtidos com os antígenos bacterianos.

Repetimos a mesma comparação usando, desta vez, os soros de pacientes com diagnóstico clínico de enterite crônica e os resultados foram os do quadro seguinte.

QUADRO XI

DILUIÇÃO DO SORO	ANTÍGENO BACTERIANO		HEMAGLUTINAÇÃO				
	Sh. flexneri	Sh. sonnei	Sh. flexneri	Sh. sonnei	Sh. boydii	Sh. alkalescens	Sh. dysenteriae
0	10-35,6%	22-91,7%	10-30,3%	25-75,7%	15-45,4%	17-51,5%	10-30,3%
50	6-21,4%	2- 8,3%	0- 0,0%	0-0	0- 0,0%	0- 0,0%	0- 0,0%
100	5-17,8%	0-	9-27,2%	5-15,2%	8-24,2%	6-18,1%	10-30,3%
200	7-25,0%	0-	14-42,4%	3- 9,0%	10-30,0	10-30,0%	13-30,3%
Total	28	24	33	33	33	33	33

Novamente aparece o mesmo fato, hemaglutinação positiva para o mosaico antigênico em títulos muito semelhantes, mostrando a pouca especificidade da reação.

Comparando os dois tipos de reação, usando soro de pacientes de cujas fezes havíamos isolado *Sh. flexneri*, comprovamos que, realmente, a reação de hemaglutinação, além de pouco sensível, não é específica.

QUADRO XII

	ANTÍGENO BACTERIANO		HEMAGLUTINAÇÃO	
0	1	12,5%	4	50 %
50	0	0,0%	0	0,0%
100	1	12,5%	2	25,0%
200	6	75,0%	2	25,0%

Resta a possibilidade de tais resultados serem devidos ao tipo de antígeno usado (antígeno polivalente). Para afastar essa hipótese, em 4 soros de doentes portadores de *Sh. flexneri*, sensibilizamos hemácias, separadamente, com antígenos correspondentes a *Sh. flexneri* (6 tipos), *Sh. boydii* (7 tipos), *Sh. dysenteriae* (7 tipos) e os resultados confirmaram os já conhecidos; os soros aglutinaram as hemácias sensibilizadas com qualquer dos antígenos.

Assim sendo, devemos considerar, para efeito diagnóstico, unicamente os resultados das aglutinações bacterianas, indagando de seu

valor como método de diagnóstico de shiguelose crônica. No quadro XIII estão transcritos os resultados.

QUADRO XIII

DILUIÇÕES	Antígeno <i>flexneri</i>		Antígeno <i>sonnei</i>		Ant. <i>alkalescens</i>	
0	8	10 %	39	67,2%	4	33,3
40	10	12,5%	8	13,8%	1	8,3
80	15	18,5%	9	15,5%	2	16,6
160	19	23,7%	0	0,0%	3	25,0
320	16	20,0%	1	1,7%	0	0,0
640	12	15,0%	1	1,7%	2	16,6
Total	80		58		12	

Dos 80 soros verificados com antígeno *flexneri*, em 20, o germe foi isolado das fezes.

Dos 58 soros testados com antígeno *sonnei*, em 3, o germe foi encontrado nas fezes e dos 12 soros testados com antígeno *alkalescens*, em 7, o germe foi assinalado nas fezes. Os exames realizados com estes soros estão relacionados no quadro XIV.

QUADRO XIV

DILUIÇÕES	Antígeno <i>flexneri</i>		Antígeno <i>sonnei</i>		Ant. <i>alkalescens</i>	
0	0		0	0,0%	0	
40	1	5%	0	0,0%	0	0,0%
80	0		2	66,6%	3	35,0%
160	2	10%	0	0,0%	3	22,5%
320	7	35%	0	0,0%	0	0,0%
640 ou +	10	50%	1	33,3%	2	22,5%
Total	20		3		8	

Se analisarmos os resultados obtidos com antígeno *Flexner*, relacionando com os exames de fezes, verificamos que, nos 80 soros examinados, em 85% dos em que o título foi de 1/160 ou mais, o germe foi encontrado nas fezes. Se incluírmos mais um caso em que o germe foi isolado uma semana antes da série de exames e cujo título aglutinante era de 1/640, verificamos que títulos aglutinantes 1/160 ou mais estavam certamente ligados à shiguelose *Flexner* em 91,6% dos casos.

Seria ousado tentar tirar conclusões referentes aos títulos aglutinantes anti-*sonnei* e anti-*alkalescens*, em vista do número muito reduzido de casos que nos foi dado analisar.

Coproaglutininas — A técnica usada foi a de PREDCHENSKY e col. (1940) e consistiu em emulsionar as fezes em salina, na proporção de 1:5. Agitação forte até completa homogeneização. Filtrar em papel de filtro e usar o filtrado.

Colocar uma gôta do extrato fecal filtrado sobre placa de vidro e juntar uma gôta de suspensão de germes em salina, proveniente de cultura em ágar de 18 horas. Misturar bem e verificar aglutinação.

De 10 extratos fecais, todos provenientes de pacientes com shiguelose *Flexner*, não obtivemos nenhuma aglutinação positiva. Tentamos a concentração do coproanticorpo, precipitando os extratos fecais com solução saturada de sulfato de amônio e, a seguir, dialisando o precipitado para retirar o sulfato de amônio. Recomposto o teor eletrolítico da solução, repetimos as reações, também com resultados negativos.

COMENTARIOS

Empregando o teste χ^2 ao nível de 5% de probabilidade e excluindo os exames positivos para *Salmonella* (quadro I), para comparar as várias técnicas de colheita, verificamos: 1) as diferenças entre as técnicas que deram o maior e o menor número de isolamentos positivos, não são significativas ($\chi^2 = 1,8$); 2) para a totalidade de isolamento de enterobactérias patogênicas, não existem diferenças significantes entre o exame das fezes eliminadas naturalmente, o método do "swab" ou da raspagem ($\chi^2 = 1,9$); 3) o método da aspiração mostrou-se inferior às outras técnicas, acusando a comparação entre resultados de fezes passadas e aspiração um valor de $\chi^2 = 6,2$.

Comparando a técnica de colheita para os vários tipos de *Shigella* encontrados, não verificamos diferenças significativas no grupo *Flexner* ($x^2 = 0,01$) e no grupo *alkalescens* ($x^2 = 0,1$). No entretanto, para *Shigella sonnei*, essas diferenças foram significantes ($x^2 = 8,1$, comparação entre exames de fezes de aspiração ou "swab").

Assim sendo, não nos parece indicado o emprêgo de métodos de colheita diretamente da mucosa intestinal que, além do uso de aparelhagem especial, não trazem vantagem no isolamento de enterobactérias patogênicas. O maior número de resultados positivos, pela repetição dos exames, foi devido não à técnica de colheita mas sim à repetição do exame.

No quadro V constatamos que a maioria dos tipos de bacilos disenterícos até agora descritos, existe em São Paulo, predominando em todos os anos, aliás como se verifica em outros países, *Shigella flexneri* e, neste grupo, o tipo 2. Nem uma só vez foi isolada *Shigella dysenteriae* tipo I e a distribuição pelos diferentes meses (quadro VI), mostra o germe encontrado, quase na mesma proporção, em todos os meses do ano, se considerarmos a média de todos os anos observados. No grupo examinado ao acaso, nota-se incidência muito alta de enterobactérias patogênicas: 76 em 1476 ou seja, 4,47%. As diferenças encontradas entre os vários grupos etários não são de ordem a permitir qualquer conclusão e mesmo as diferenças grandes entre homens e mulheres com 20 anos ou mais ($x^2 = 1,9$) não são significantes. No entretanto, se êsses exames tivessem sido realizados em condições ótimas, ou pelo menos, se fôsse repetida uma série de exames em períodos diferentes, a incidência provavelmente teria sido maior, mostrando a possibilidade grande de disseminação da moléstia, pois, como é sabido, o contágio se faz de homem para homem. As diferenças entre população urbana e rural também não são de ordem a permitir qualquer conclusão, indicando, unicamente, igualdade entre os dois achados.

Quanto à pesquisa de anticorpos sanguíneos, o método, por nós idealizado, de antígenos múltiplos, se mostrou pouco sensível e inespecífico. Acreditamos que modificação da técnica de preparação do antígeno possa vir a ser processo de diagnóstico de grande auxílio e é o que estudamos no momento. Quanto às reações com antígenos bacterianos, julgamo-las processo de valor diagnóstico, principalmente nos casos de shiguelose por *Shigella flexneri* (quadro XIV).

Títulos aglutinantes acima de 1/160 na grande maioria das vezes devem estar ligados a *Shigella flexneri*, naturalmente não esquecendo

a possibilidade de outras enterobactérias, não do grupo *Shigella* (EWING e col., 1953), serem as responsáveis pelo aparecimento de títulos sanguíneos. A pesquisa de coproanticorpos mostrou-se inteiramente falha com a técnica que empregamos, não sendo indicada para os casos de enterocolites crônicas.

RESUMO

Se o diagnóstico das shigeloses e das salmoneloses agudas não representa maior problema para o clínico e o laboratorista, uma vez que a sintomatologia é típica e o germe facilmente encontrado nas fezes, o mesmo não acontece nas formas crônicas, nas quais, além de não ser característica a sintomatologia, o agente causador é algumas vezes dificilmente assinalado à coprocultura.

Os AA., no presente trabalho relatam os achados de bacilos disenterícos e de salmonelas num total de 5.918 exames realizados de 1950 a 1954, dos quais 836 positivos. Examinaram amostra da população de um município de São Paulo (Itatiba), colhida ao acaso na zona urbana e rural. De 1.476 pessoas examinadas, em 4,47% foram encontradas enterobactérias patogênicas. As diferenças entre a população urbana e rural não são de ordem a permitir qualquer conclusão.

Com o fito de comparar a influência de diferentes métodos de colheita de fezes nos resultados dos exames, estudaram particularmente 123 indivíduos, todos com história de enterocolite crônica. Na grande maioria deles, fizeram 4 séries de exames em dias diferentes, usando as seguintes técnicas:

- a) fezes colhidas naturalmente;
- b) colheita direta na ampola retal ("swab");
- c) aspiração;
- d) raspagem da mucosa retal.

Para êsses 123 indivíduos, ao todo foram feitas 2.628 culturas, sendo que em 42 delas, o A.A. encontraram alguma enterobactéria reconhecidamente patogênica.

Empregando o teste χ^2 ao nível de 5% de probabilidade, para comparar as várias técnicas de colheita, concluem não existir vantagem em empregar métodos de colheita diretamente da mucosa intestinal que, além de exigir aparelhagem especial, dão resultados in-

feriores ao exame de fezes colhidas naturalmente. A repetição do exame é de maior valor que a colheita direta na ampola retal.

Pesquisaram, também, aglutininas sanguíneas usando germes mortos como antígenos; resultados satisfatórios foram obtidos nos casos de shiguelose por *Shigella flexneri*. Nestes, o título aglutinante acima de 1/160 na grande maioria das vezes correspondia ao achado do germe nas fezes.

A pesquisa de coproanticorpos, com a técnica que empregaram, deu resultados inteiramente falhos.

S U M M A R Y

Although the diagnosis of shigellosis and acute salmonellosis does not represent a great problem for the clinician or for the laboratory worker because symptomatology is typical and the germ easily found in faeces, the same does not happen with the chronic form, in which the causative agent can hardly be depicted by stool culture, and the symptomatology is not characteristic.

In this paper the authors present the results of 5.918 faeces examinations performed from 1950 to 1954 which yielded 836 results positive for dysenteric bacilli and salmonellas. In a city of the State of São Paulo, Itatiba, 4,47% of 1.476 stool cultures were positive for pathogenic enterobacterias. Unfortunately, a conclusion could not be reached regarding a difference in incidence between urban and rural populations.

The AA. tested several technics of faeces colletion in 123 cases of chronic enterocolitis. In most cases four serial samplings were made at different days, using the following techniques:

- a) faeces passed naturally
- b) anal swab
- c) aspiration
- d) scooping of the rectal mucosa

In 123 patients there were made 2.268 cultures of which 42 yielded pathogenic enterobacterias.

By using the Chi Square test with 5% probability in order to compare the several sampling technics, it was concluded that the employment of those consisting in the direct colletion from the intestinal mucosa does not bring any advantage for the isolation of pa-

thogenic enteric bacteria, despite the use of specialized instruments. Repeated collection proved more useful than direct collection from the rectal ampulla.

Blood agglutinins were searched by employing dead germs as antigens. Excellent results were obtained in the shigellosis cases caused by *Shigella flexneri*. In these cases, an agglutinating titer higher than 1/160 usually corresponded to the isolation of the germ from the faeces. The technic of coproantibodies titration employed yielded uncertain results.

BIBLIOGRAFIA

- ASSIS, A. de — 1935 — Shigeloses crônicas. *Arch. Bras. Med.* 25 (3): 133.
- ASSIS, A. de — 1937 — Contribuição ao estudo das infecções crônicas por bacilos disentéricos. *Arq. Hig.* 7 (1): 9-26.
- BARKSDALE, W. L., GHODA, A. e OKABLE, K. — 1951 — Coproagglutinins in ulcerative colitis. *Jorn. Inf. Dis.* 89: 47-57.
- BOYD, J. S. K. — 1940 — The laboratory diagnosis of bacillary dysentery. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33 (6): 553-571.
- BURROWS, W., ELLIOT, M. E. e HAVENS, T. — 1947 — The excretion of coproantibody in experimental enteric cholera in the Guinea pig. *Journ. Inf. Dis.* 81: 261-281.
- DAVIES, A. — 1922 — An investigation into the serological properties of dysentery stools. *The Lancet* 2 (2): 1009-1012.
- EWING, W. H. — 1953 — Sorological relationships between *Shigella* and Coliform cultures. *Journ. Bacteriol.* 66: 333-340.
- FELSEN, J. — 1938 — Crypt aspiration: Spray culture method for the isolation of *B. dysenteriae*. *Journ. Lab. Clin. Med.* 23: 630-632.
- FELSEN, J. — Bacillary dysentery, colitis and enteritis. W. B. Saunders Comp. Philadelph and London; 1945.
- GALTON, M. M., HARDY, A. V. e MITCHELL, R. B. — 1950 — The public health laboratory diagnosis of enteric infections. *Am. Journ. Trop. Med.* 30 (1): 77-90.
- GONZÁLEZ, L. M., ARBONA, G. e FERNÓS, J. — 1950 — Studies in bacillary dysentery. Failure to detect coproantibodies in patients with bacillary dysentery (Flexner). *Journ. Inf. Dis.* 87: 194-200.
- HARDY, A. V. e WATT, J. — 1944 — Newer procedures in laboratory diagnosis and therapy in the control of bacillary dysentery. *Am. Journ. Publ. Health* 34 (1): 503-509.
- HARDY, A. V. e GALTON, M. M. — 1955 — The role of food processing plants in the dissemination of *Salmonella*. *Am. Journ. Trop. Med. Hyg.* 4 (4): 725-730.
- HORMAECHE, E. e SURRACO, N. L. — 1941 — Estudios sobre el valor de los metodos de aislamiento de *Salmonellas* y *Shigellas*. *Puerto Rico Health Bul.* 5: 329-344.
- KAUFFMANN, F. — Enterobacteriaceae. Copenhagen, Ejnar Munksgaard, 1951.

NETER, E., BERTRAM, L. F., ZAK, D. A., MURDOCK, M. R. e ARBESMAN, C. E. 1952 — Studies on hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* antisera. *Journ. Exp. Med.* 96: 1-15.

PESTANA, B. R. e FARACO, M. J. — 1940 — Do emprego do meio de agar-desoxycholato de sodium-citrato (Leifson) para isolar bacilos disentéricos. *An. Paul. Med. Cir.* 40 (2): 307-314.

PREDCHENSKY, S. e MOROZ, O. — 1940 — A method for early and rapid diagnosis of dysentery. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.* 7: 3-11.

SHIGA, K. — 1898 — Ueber den Dysenteriebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Centr. f. Bakteriol., 1. Abt. Orig.* 24: 817-828.

SILLIKER, J. H., RITTENBERG, S. C. e GOODLOW, R. J. — 1952 — Coproantibody detection in the diagnosis of enteric infections. *Am. Journ. Clin. Path.* 22 (2): 1018-1023.

TAUNAY, A. E. — 1951 — Bacteriologia das shigeloses. *Rev. Inst. A. Lutz* 11: 49-102.

THOMAS, M. E. M. — 1954 — Disadvantages of the rectal swab in diagnosis of diarrhoea. *Brit. Med. Journ.* 2 (1): 394-396.

THOMSEN, S. — 1945 — The numbers of pathogenic bacilli in faeces in intestinal diseases. *Journ. Hy.* 53 (2): 217-224.