

SOBRE A OCORRÊNCIA DE UMA VARIANTE DE *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* FERMENTADORA DA LACTOSE*

Gil Vital Alvares PESSÓA**

RIAL-A/381

PESSÓA, G.V.A. — Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora da lactose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 13-28, 1973.

RESUMO: É descrita uma variante de *Salmonella typhimurium* lactose-positiva, que ocorreu espontaneamente e em número elevado de casos no município de São Paulo, S.P. É sugerida modificação dos métodos de isolamento e identificação presuntiva de enterobactérias, com a introdução de técnicas que não sejam exclusivamente baseadas na fermentação da lactose.

DESCRITORES: *Salmonella typhimurium*, variante; *Enterobacteriaceae*; lactose, fermentação.

1. INTRODUÇÃO

Na caracterização bioquímica das enterobactérias, a fermentação da lactose sempre foi considerada marco divisor para sua diferenciação.

A quase totalidade dos meios de cultivo usados para o isolamento de enterobactérias contém esse carboidrato, cuja fermentação caracteriza as colônias consideradas como de bactérias não patogênicas. Também, a grande maioria dos meios empregados na identificação presuntiva inclui a lactose em sua composição, e a acidificação deste carboidrato orienta o procedimento técnico a ser seguido.

Nesse sentido, EDWARDS & EWING¹⁰ afirmam textualmente: “nos tubos de ágar tríplice-açúcar-ferro, incubados durante a noi-

te, aqueles que apresentam reação ácida total podem ser eliminados, uma vez que contém bactérias que fermentam rapidamente lactose e/ou sacarose. Tais microrganismos não são *Shigella* ou *Salmonella*”. Acrescentam os mesmos autores: “as culturas de *Proteus* são assim eliminadas e os tubos restantes de ágar-tríplice-açúcar-ferro estão prontos para serem examinados para verificação da presença de *Shigella*, *Salmonella* ou bactérias do grupo *paracolon*”. Também referem poder-se admitir que certas amostras de *Salmonella* fermentam lactose, mas são extremamente raras e, para fins práticos, podem ser imediatamente excluídas do gênero.

Descrições de comportamento anômalo de cepas do gênero *Salmonella* em relação à fermentação da lactose são escassas e pouco esclarecedoras.

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia) para obtenção do título de Doutor em Medicina, São Paulo, S.P., 1972.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

Em 1907, TWORT⁴⁶, ao estudar a fermentação de açúcares pelas bactérias do grupo coliforme, obteve variantes lactose-positivas de bacilo tífico após longos períodos de incubação em água peptonada lactosada.

KAUFFMANN²⁰, ao analisar o comportamento anômalo de certas cepas de *Salmonella*, afirma que a grande maioria dessas bactérias pertencentes aos subgêneros I, II e IV não ataca a lactose mesmo após 30 dias de incubação a 37°C. No entanto, assinala exceções a essa regra, citando algumas variantes nas quais esse caráter havia sido induzido artificialmente e citando o achado unicamente de uma cepa de *Salmonella* que possui esse caráter de rápida fermentadora da lactose ao ser isolada.

KAUFFMANN²² cita ainda uma variante de *Salmonella anatum* fermentadora da lactose, variante essa que foi obtida de uma cultura lactose-negativa após 22 dias de incubação em meio contendo lactose.

Diversas variantes de salmonelas fermentadoras da lactose foram descritas por KRISTENSEN^{23, 24}, obtidas após períodos muito grandes de incubação — 44 até 211 dias — em meios contendo grande quantidade de lactose, variantes essas, portanto, também induzidas artificialmente.

SELIGMANN & SAPHRA³⁹ isolaram do líquido cefalorraquidiano de uma criança de seis meses uma bactéria lactose-positiva, referindo ser ou um coliforme com estrutura antigênica de *Salmonella newington* ou uma *Salmonella* fermentadora da lactose; KAUFFMANN²⁰ identifica essa amostra como *Salmonella newington*.

FALCOW & BARON¹³ identificaram uma *Salmonella typhi* também fermentadora da lactose e admitiram-na como possível exemplo de hibridização *in vivo*. Essa cepa foi isolada de um paciente com gastroenterocolite.

KUNZ & EWING²⁵ também referem caso de febre tifóide adquirida por um lavador de vidraria de laboratório, causada por uma *Salmonella typhi* na qual havia sido induzida a capacidade de utilizar a lactose.

BULMASH *et alii*⁵ referem uma cepa de *Salmonella tennessee* lactose-positiva isolada de fezes e estudam seu comportamento em relação à produção de H₂S no meio ágar triplice-açúcar-ferro.

GONZALEZ¹⁵ relata o isolamento de uma bactéria fermentadora rápida de lactose e sacarose, proveniente do sangue e de restos placentários de paciente que falecera pouco tempo após abortamento espontâneo; a mesma bactéria foi isolada, após necrópsia, do sangue e do útero, sendo posteriormente identificada como *Salmonella tennessee*.

EASTERLING *et alii*⁸, ao estudarem a natureza da capacidade fermentadora da lactose de cepas de salmonelas obtidas de casos clínicos, referem-se apenas a: *Salmonella tennessee* (quatro cepas de quatro localidades diferentes), *Salmonella anatum* (uma cepa), *Salmonella typhimurium* (uma cepa) e *Salmonella senftenberg* (uma cepa).

Em 1970, MARTIN³³ reafirma o conceito anterior, exposto por EDWARDS & EWING¹⁰, ou seja, os tubos de ágar triplice-açúcar-ferro que apresentam reação ácida global podem ser desprezados porque contêm bactérias que fermentam rapidamente a lactose ou a sacarose, não se tratando, portanto, de *Shigella* ou *Salmonella*.

Nosso interesse pelo assunto decorreu de observação ocasional em maio de 1971, quando, semeando urina diretamente em placas de ágar eosina-azul de metileno, obtivemos colônias que tinham o aspecto característico das do grupo *coli*; ao serem transferidas para o meio de identificação presuntiva, meio de Rugai (RUGAI & ARAUJO³⁵), determinaram neste último reações do grupo *Citrobacter-Arizona-Salmonella*. Nas provas bioquímicas de rotina, utilizadas para identificação, a cultura apresentou comportamento típico de *Salmonella*, exceto a fermentação rápida da lactose. Essa bactéria comportou-se sorologicamente como *S. typhimurium*. Concomitantemente, houve o achado de mais nove cepas, sete de fezes, uma de urina e uma de líquido cefalorraquidiano, no curto período de quinze dias, todas com o mesmo caráter de rápida fermentação da lactose.

Essas culturas foram enviadas ao Prof. W. M. Ewing, do Center for Disease Control, Atlanta, E.U.A., para confirmação diagnóstica, sendo classificadas pelo Dr. George J. Hermann, assistente-chefe da Unidade de Enterobacteriologia, como *Salmonella typhimurium* variedade *copenhagem* lactose-positiva.

A partir de então, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz — onde esta

pesquisa foi conduzida — procedemos ao isolamento sistemático das colônias de bactérias fermentadoras da lactose, visando a obter elementos para verificação da extensão do fenômeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras examinadas

Foram examinadas 11.438 amostras, no período de maio de 1971 a abril de 1972, sendo:

a) 2.792 amostras de fezes recebidas para coprocultura, procedentes da região da Grande São Paulo:

- 1.037, de hospital de moléstias transmissíveis;
- 624, de dois hospitais pediátricos;
- 232, de clínica pediátrica de hospital geral;
- 529, de centros de saúde;
- 370, de outras procedências.

b) 2.679 de líquido cefalorraquidiano recebidas para cultura bacteriológica, em sua grande maioria de hospital de moléstias transmissíveis, São Paulo, SP.

c) 3.724 amostras de sangue recebidas para hemocultura, procedentes da região da Grande São Paulo:

- 3.672, de hospital de moléstias transmissíveis;
- 14, de dois hospitais pediátricos;
- 14, de dois hospitais gerais;
- 10, de centros de saúde;
- 14, de outras procedências.

d) 1.304 amostras de usina recebidas para cultura, procedentes da região da Grande São Paulo:

- 481, de hospital de moléstias transmissíveis;
- 334, de hospital pediátrico;
- 245, de centros de saúde;
- 244, de outras procedências.

e) 337 exsudatos recebidos para cultura, procedentes da região da Grande São Paulo:

- 27, de hospital de moléstias transmissíveis;
- 4, de hospital pediátrico;
- 200, de centros de saúde;
- 106, de outras procedências.

f) 259 secreções purulentas recebidas para culturas, procedentes da região da Grande São Paulo:

- 171, de hospital de moléstias transmissíveis;
- 34, de hospital pediátrico;
- 5, de centros de saúde;
- 49, de outras procedências.

g) 300 culturas de *Salmonella* sp. recebidas para tipagem:

- 76, de escola de medicina de São Paulo, SP;
- 73, de duas instituições científicas de Ribeirão Preto, SP;
- 52, de escola de ciências biológicas de Botucatu, SP;
- 40, de instituto científico de Campinas, SP;
- 34, de instituição científica de Araraquara, SP;
- 8, de indústria de laticínios;
- 17, de outras procedências.

h) 43 culturas de *Salmonella* sp. lactose-positivas recebidas para confirmação diagnóstica:

- 39, de dois hospitais de São Paulo, SP;
- 4, de outras procedências.

2.2 Técnicas de cultura e identificação

2.2.1 Coproculturas

As fezes foram suspensas em solução salina glicerinada e em caldo selenito. A seguir, as amostras de fezes suspensas em glicerina foram semeadas em placas dos meios de ágar SS e em ágar eosina-azul de metileno, com bastão de vidro em L; as do caldo selenito, após 18-24 horas, a 37°C, transplantadas em ágar verde brilhante modifi-

cado* e em ágar eosina-azul de metileno, também espalhadas na superfície do meio com bastão de vidro em L.

As colônias foram transferidas para meio de Rugai e, após 18-24 horas a 37°C, as culturas apresentando ápice alcalino, acidificação da base (com ou sem formação de gás) e produção de H₂S foram submetidas às seguintes provas:

- 1) descarboxilação da lisina;
- 2) crescimento em meio com cianeto de potássio;
- 3) utilização do malonato.

As culturas que produziram descarboxilação da lisina, não cresceram em presença de cianeto de potássio e não utilizaram o malonato foram identificadas sorologicamente.

2.2.2 Hemoculturas

Sangue colhido no volume de 10 ml em 100 ml de caldo infusão cérebro-coração (Brain heart infusion**), citratado. As culturas foram examinadas durante cinco dias e transplantadas em ágar sangue de carneiro e meio de ágar ácido-rosólico. Colônias lactose-negativas e/ou lactose-positivas, no último meio foram transferidas para o meio de Rugai, procedendo-se em seguida às identificações bioquímica e sorológica, como citado no item 2.2.1.

2.2.3 Culturas de líquido cefalorraquidiano

O material centrifugado foi semeado nos meios ágar sangue de carneiro, ágar chocolate e ágar triptose-soja (Tripticase soy agar**).

As colônias isoladas foram identificadas como citado no item 2.2.1.

2.2.4 Cultura de urina

O método empregado foi o mesmo utilizado no diagnóstico das infecções urinárias, a saber: urina obtida por colheita asséptica

semeada nas diluições de 1:100 e 1:10.000, em quantidades de 0,1 ml, nos meios de ágar eosina-azul de metileno e ágar sangue de carneiro. As colônias suspeitas foram identificadas como citado em 2.2.1.

2.2.5 Culturas de exsudatos e secreções purulentas

O material colhido com assepsia foi semeado em caldo glicosado e o crescimento ressemeado em ágar sangue de carneiro e em ágar eosina-azul de metileno. As colônias suspeitas foram identificadas como no item 2.2.1.

2.2.6 Culturas de *Salmonella* sp. recebidas para tipagem

O procedimento seguido foi o mesmo de 2.2.1 todas as vezes em que se tratava de cultura pura. Quando necessário, foi feito o reisolamento em placas de ágar eosina-azul de metileno.

2.2.7 Culturas de *Salmonella* sp. lactose-positivas recebidas para confirmação diagnóstica

O procedimento seguido foi o mesmo de 2.2.6.

2.2.8 Identificação bioquímica

Foram utilizadas, na caracterização bioquímica, as seguintes provas:

1) Identificação presuntiva no meio de RUGAI & ARAUJO²⁵, que permite a verificação simultânea das reações***:

- a) fermentação da sacarose;
- b) fermentação da glicose;
- c) produção de gás;
- d) produção de H₂S;
- e) produção de indol;
- f) desaminação do L-triptofano;
- g) hidrólise da uréia.

As alterações que ocorrem nesse meio acham-se sumariadas na tabela I:

* Brilliant green agar, modified, Oxoid CM 329. Oxoid Limited, London, S. E. 1.

** Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U. S. A.

*** Atualmente, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P., é utilizada modificação deste meio (PESSOA & SILVA²⁴).

TABELA 1

Aspecto das enterobactérias no meio de Rugai

Meio de Rugai	tampão	ápice	base
Família <i>Enterobacteriaceae</i>			
Tribo <i>Escherichieae</i>	vermelho ou inalterado	azul ou amarelo	amarela com ou sem gás
Tribo <i>Edwardsielleae</i>	vermelho	azul	amarela com fundo preto e gás
Tribo <i>Salmonelleae</i>	inalterado	azul ou amarelo	amarela com fundo preto e gás
Tribo <i>Klebsielleae</i>	inalterado	amarelo ou azul	amarela com muito gás
Tribo <i>Proteeae</i>	inalterado ou vermelho	verde	azul com ou sem fundo preto; ou, amarela com ou sem gás

Vermelho — produção de indol
 Amarelo — reação de acidificação
 Azul — reação de alcalinização
 Verde — desaminação de L-triptofano
 Preto — produção de H₂S

2) descarboxilação de aminoácidos (lisina e ornitina), pelo método de FALCOW¹²;

3) crescimento em presença de cianeto de potássio (KCN), pelo método de EDWARDS & FIFE¹¹;

4) utilização do malonato, segundo LEIPSON²⁶;

5) utilização do citrato, segundo SIMMONS¹⁰;

6) verificação da motilidade e da fermentação do manitol, segundo LE MINOR²⁵;

7) fermentação da lactose, sacarose, arabinose, trealose, xilose, ramnose, dulcitol, inositol, glicerol, adicionados ao ágar base-vermelho-fenol;

8) pesquisa da beta-galactosidase, segundo LE MINOR & HAMIDA²⁷.

2.2.9 Identificação sorológica

A identificação sorológica foi realizada através de reações de aglutinação em placas de vidro quadriculadas, em caixa de Huddleson, utilizando:

- soros polivalentes somáticos e flagelares;
- soros específicos somáticos (grupo específicos);
- soros flagelares (tipo-específicos).

2.3 Antibiograma

Em 172 cepas foi determinada a sensibilidade a antibióticos, utilizando-se, como meio de cultura o ágar D.S.T. (Diagnostic sensitivity test agar²⁸).

* Oxoid.

A maioria dos discos impregnados com antibióticos foi preparada segundo a técnica que vem descrita em FAVA NETTO¹⁴, BAUER *et alii*⁴ e em The Dispensatory and Physician's Pharmacology⁷. Somente os de gentamicina e de sulfametoxazol-trimetoprim não foram por nós preparados.

2.4 Meios de cultura utilizados

- 1) Solução de glicerina-cloreto de sódio tamponada (SACHS³⁶);
- 2) Caldo selenito (LEIFSON²⁷);
- 3) Ágar eosina-azul de metileno (HOLT-HARRIS & TEAGUE¹⁷, e LEVINE³⁰);
- 4) Ágar SS³²;
- 5) Ágar * verde brilhante³¹;
- 6) Ágar ácido rosólico (CALAZANS & PESTANA⁶), modificado na Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz;
- 7) Meio de Rugai (RUGAI & ARAUJO³⁵);
- 8) Meio para fermentação de carboidratos;
- 9) Meio de KCN (EDWARDS & FIFE¹¹);
- 10) Meio de citrato de sódio (SIMMONS⁴⁰);
- 11) Meio de acetato de sódio (TRABULSI & EWING⁴⁵);
- 12) Meio de gelatina⁷;
- 13) Meio para teste da descarboxilase da lisina e da ornitina e desidrolase da arginina (FALKOW¹²);
- 14) Meio de malonato de sódio (LEIFSON²⁶);
- 15) Meio de manitol-motilidade²⁸;
- 16) Pesquisa da beta-galactosidase — O.N.P.C. (LE MINOR & HAMIDA²⁹);
- 17) Meios de ágar sangue de carneiro e de ágar chocolate.

2.5 Caracterização genética

Inicialmente foram enviadas três das linhagens em estudo** ao Prof. L. Le Minor, do Instituto Pasteur, em Paris que, após comunicar-nos suas conclusões, solicitou maior

número de amostras. Foram-lhe então remetidas mais 148 amostras liofilizadas de nossa coleção, igualmente analisadas geneticamente pelo mesmo autor.

3. RESULTADOS

De 11.438 amostras estudadas, foram identificadas 984 salmonelas, das quais 601 classificadas como *Salmonella typhimurium*.

Dessas 601 cepas de *Salmonella typhimurium*, 313 eram fermentadoras da lactose (tabelas 2 e 3).

TABELA 2

Amostras de *S. typhimurium* isoladas no período de maio de 1971 a abril de 1972

Material	Lactose+	Lactose-
Fezes	227	109
Líquido cefalorraquidiano	30	24
Sangue	6	5
Urina	6	3
Secreções purulentas	1	—
Exsudatos	—	1
Total	270	142

TABELA 3

Amostras de *Salmonella sp. lactose-positiva* recebidas para tipagem e classificadas como *S. typhimurium*

Material	Número
Fezes	7
Líquido cefalorraquidiano	9
Sangue	21
Urina	3
Secreções purulentas	3
Total	43

Dentre outras 300 cepas de salmonelas recebidas para tipagem não foram encontradas amostras fermentadoras da lactose, tendo sido identificadas 146 como *Salmonella typhimurium*.

Com referência à distribuição das *Salmonella typhimurium* lactose-positivas isoladas em relação à idade dos pacientes e ao tipo de material, os dados constam da tabela 4.

* Brilliant green agar, modified, Oxoid CM 329. Oxoid Limited, London, S.E.1.

** Denominadas Wagner J. Alciola, 172668 e 1089.

TABELA 4

Distribuição das *S. typhimurium* lactose-positiva isoladas, em relação aos grupos etários e ao material de origem

Idade \ Salmonelas isoladas	Material					Total
	Sangue	L.C.R.	Fezes	Urina	Secreções purulentas	
0 — 1 mês	9	7	35	1	1	53
1 mês — 3 meses	4	10	33	1	3	51
3 meses — 6 meses	5	15	62	2	—	84
6 meses — 9 meses	—	—	26	2	—	28
9 meses — 1 ano	—	—	13	—	—	13
1 ano — 2 anos	3	2	33	2	—	40
2 anos — 3 anos	1	—	12	1	—	14
3 anos — 4 anos	—	—	7	—	—	7
4 anos — 5 anos	—	—	4	—	—	4
5 anos — 10 anos	—	—	6	—	—	6
10 anos — 15 anos	—	—	2	—	—	2
15 anos — 20 anos	—	—	—	—	—	—
20 anos — 25 anos	—	—	1	—	—	1
mais de 25 anos	—	—	1	—	—	1
Total	22	34	235	9	4	304*

* O n.º 304 refere-se às amostras de fezes de pacientes cuja idade foi possível estabelecer, o que não sucedeu em 9 dos 313 casos estudados.

Em seis pacientes, a bactéria foi isolada simultaneamente de:

- fezes e sangue 2 casos
- sangue e líquido cefalorraquidiano 2 casos
- sangue e secreção purulenta 2 casos

Todas as amostras isoladas apresentaram, exceção da fermentação da lactose, o comportamento bioquímico habitual da *Salmonella typhimurium* (tabela 5).

Em relação à sensibilidade aos antibióticos, as linhagens estudadas, em número de 172, apresentaram o comportamento expresso na figura 1 (pág. seguinte).

As tentativas de “curar” os plasmídeos F⁻lac⁺ pela ação das drogas brometo de etídio e acridina orange falharam.

Algumas bactérias mostraram resistência simultânea à ampicilina, estreptomina, canamicina, cloranfenicol e sulfamida; essa resistência também não foi possível ser “curada” pelo brometo de etídio. Assinalaram-se alguns segregantes lactose-negativos e beta-

TABELA 5

Comportamento bioquímico das cepas de *Salmonella typhimurium* lactose-positiva

Provas	Resultados
Melo de Rugai:	
Fermentação da sacarose	—
Fermentação da glicose	AG
Produção de H ₂ S	+
Produção de indol	—
Desaminação de L-triptofano	—
Hidrólise da uréia	—
Descarboxilação da lisina	+
Descarboxilação da ornitina	+
Crescimento em KCN	—
Utilização do malonato	—
Utilização do citrato de Simmons	+
Utilização do acetato de sódio	+
Motilidade	+
Fermentação da glicose	AG
Fermentação da lactose	AG
Fermentação da sacarose	—
Fermentação do manitol	+
Fermentação do dulcitol	+
Fermentação da arabinose	+
Fermentação do inositol	+
Fermentação da trealose	+
Fermentação da xilose	+
Fermentação da ramnose	+
Fermentação do glicerol	+
Liquefação da gelatina	—

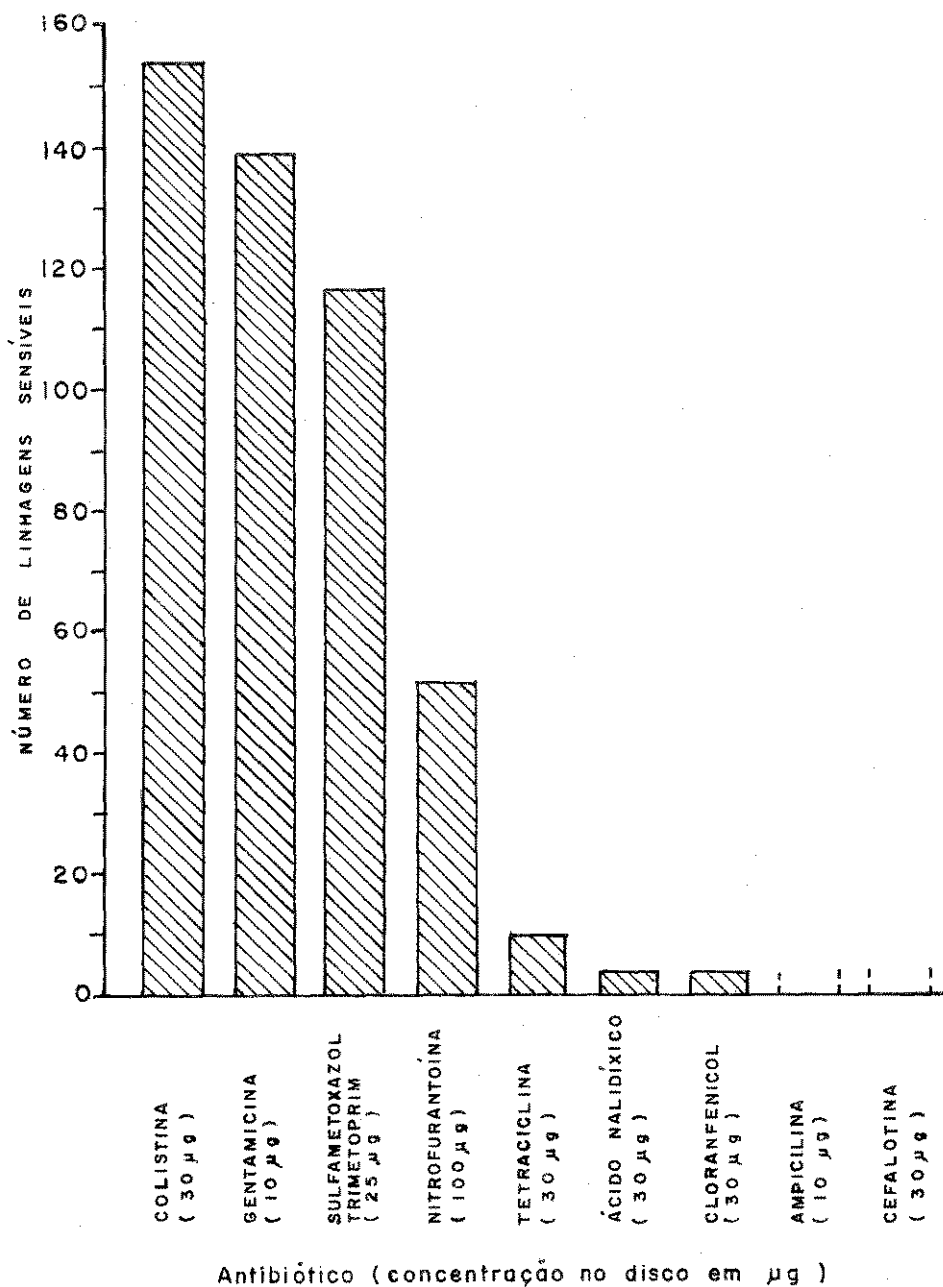


Fig. 1 — Relação entre antibióticos e número de linhagens sensíveis.

galactosidase-negativos. Por cruzamento com *E. coli* F⁻, conseguiu-se transferir unicamente as resistências à ampicilina ou à associação ampicilina-sulfamida. Subseqüente conjugação com *E. coli* H fr resultou em clones resistentes que perderam a capacidade de absorver o fago MS 2.

4. DISCUSSÃO

No fim do século passado já era evidente que algumas espécies de *Salmonella* estavam associadas mais comumente com febres entéricas humanas, enquanto outras eram sempre relacionadas a infecções específicas de outros animais. No entanto, o isolamento de espécies com características muito semelhantes numa variedade de condições mórbidas no homem e em muitas espécies de animais determinou um grau de confusão raramente igualado nos anais da bacteriologia (EDWARDS⁹).

Os pesquisadores do Instituto de Higiene da Universidade de Kiel (1908-1923)², através de provas de patogenicidade em animais, dividiram as salmonelas em dois grupos:

Grupo I — espécies adaptadas ao parasitismo humano

Grupo II — espécies patogênicas para animais

A patogenicidade e a epidemiologia de cada grupo são distintas. Assim, as salmonelas adaptadas ao homem produzem quadros geralmente graves, manifestando-se em geral como casos isolados, sendo a fonte de infecção o próprio homem o qual, com relativa freqüência, se torna portador. Quando o homem é infectado pelas salmonelas de origem animal, o que ocorre quase sempre por ingestão de alimentos dessa origem, manifesta-se um quadro entérico agudo com mortalidade baixa, o doente não se tornando portador.

Para os animais, principalmente os jovens, o que se observa é o inverso: processo infeccioso sistêmico muito semelhante ao das formas tíficas, com ou sem localização intestinal e alta mortalidade; com freqüência os sobreviventes tornam-se portadores de germes.

Grande impulso na identificação e diferenciação antigênica dessas bactérias foi dado pelos trabalhos pioneiros de SCHÜTZE³⁸, em 1920, prosseguidos por WHITE⁴⁹, em 1929 e por KAUFFMANN²¹, em 1930, mostrando que esses germes possuem um mosaico antigênico, seja no corpo ou nos flagelos, que permite a sua diferenciação em tipos sorológicos distintos, com o emprego de anti-soros devidamente preparados.

Com o objetivo de alcançar um método que permitisse melhor caracterização do grupo *Salmonella*, em 1934 o Subcomité de Salmonelas do Comité de Nomenclatura da Sociedade Internacional de Microbiologia³⁷ estabeleceu que a classificação seria baseada no esquema taxonômico apresentado por Kauffmann em 1931, que é uma continuação dos trabalhos pioneiros de Schütze, White, Scott e outros (Esquema de Kauffmann-White). A maneira de representar a estrutura antigênica é feita de acordo com o método de Kauffmann, onde os grupos são representados por letras maiúsculas, o antígeno termo estável "O" por algarismos romanos, o antígeno "H" específico por letras minúsculas e o antígeno "H" inespecífico por números arábicos. Esse Subcomité reconheceu as 44 espécies que estavam relacionadas no esquema de Kauffmann-White. Este esquema foi planejado de modo a tornar possível acrescentar aos grupos somáticos conhecidos qualquer salmonela que apresentasse uma combinação diferente de antígenos flagelares, bem como para possibilitar a criação, quando necessário, de novos grupos somáticos com relações antigênicas comuns à espécie.

HORMAECHE *et alii*¹⁸, em 1936, utilizando esse critério para classificação das salmonelas, demonstraram que o homem na primeira infância é extremamente sujeito à infecção por essas bactérias, para isso bastando que entre em contato com pequena quantidade de germes. No caso particular das crianças, a patogenia da infecção é semelhante à dos animais jovens. A criança, sobretudo no seu primeiro ano de vida, tem uma sensibilidade muito maior que o adulto para as salmonelas de origem animal, comportando-se a espécie humana de maneira semelhante a quase todos os animais, isto é, os jovens são muito mais sensíveis, podendo apresentar com maior freqüência localizações extra-intestinais, sem quadro entérico (Doutrina de Montevideú).

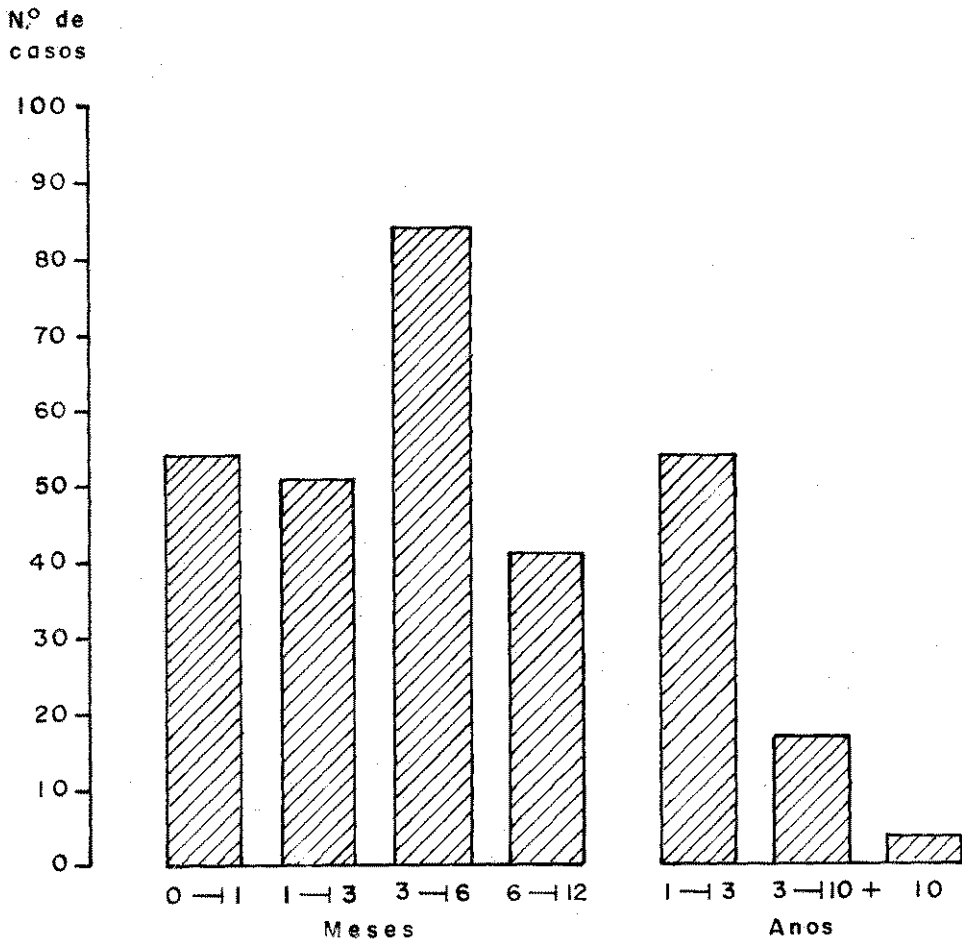


Fig. 2 — Relação entre o número de casos de *Salmonella typhimurium* lactose-positiva e grupos etários.

Analisando-se a distribuição dos casos de infecção por *Salmonella typhimurium* lactose-positivas, de nossa casuística, em relação aos grupos etários (fig. 2 e 3), verifica-se que é no grupo de 0-6 meses que se encontra o maior número de casos, praticamente dois terços da amostra estudada. Este fato está de acordo com o que descreveram os autores uruguaios; no entanto, esta distribuição etária é de certa forma *sui generis*, em desacordo com o que em geral é verificado, ou seja, que a incidência de salmoneloses é maior após os seis meses de idade. HORMACHE *et alii*¹⁹, estudando as diarréias infantis no período de 1942 a 1947 em hospitais de Montevidéu, assinalaram incidência va-

riando em torno de 33% no grupo etário de 0-6 meses. Já TAUNAY *et alii*⁴³, investigando a diarréia infantil por *Escherichia coli* do grupo enterite infantil, encontraram, em 37 coproculturas, apenas duas positivas para salmonelas. Estes autores estudaram, na mesma publicação, um grupo de 159 prematuros ou recém-nascidos com menos de 30 dias, dos quais 138 eram portadores de gastroenterite aguda, não isolando de nenhum desses pacientes enterobactérias do gênero *Salmonella*. Os achados do presente estudo contrastam de maneira flagrante com as observações desses autores, tendo sido encontrados 53 casos no grupo etário de 0-1 mês (fig. 3).

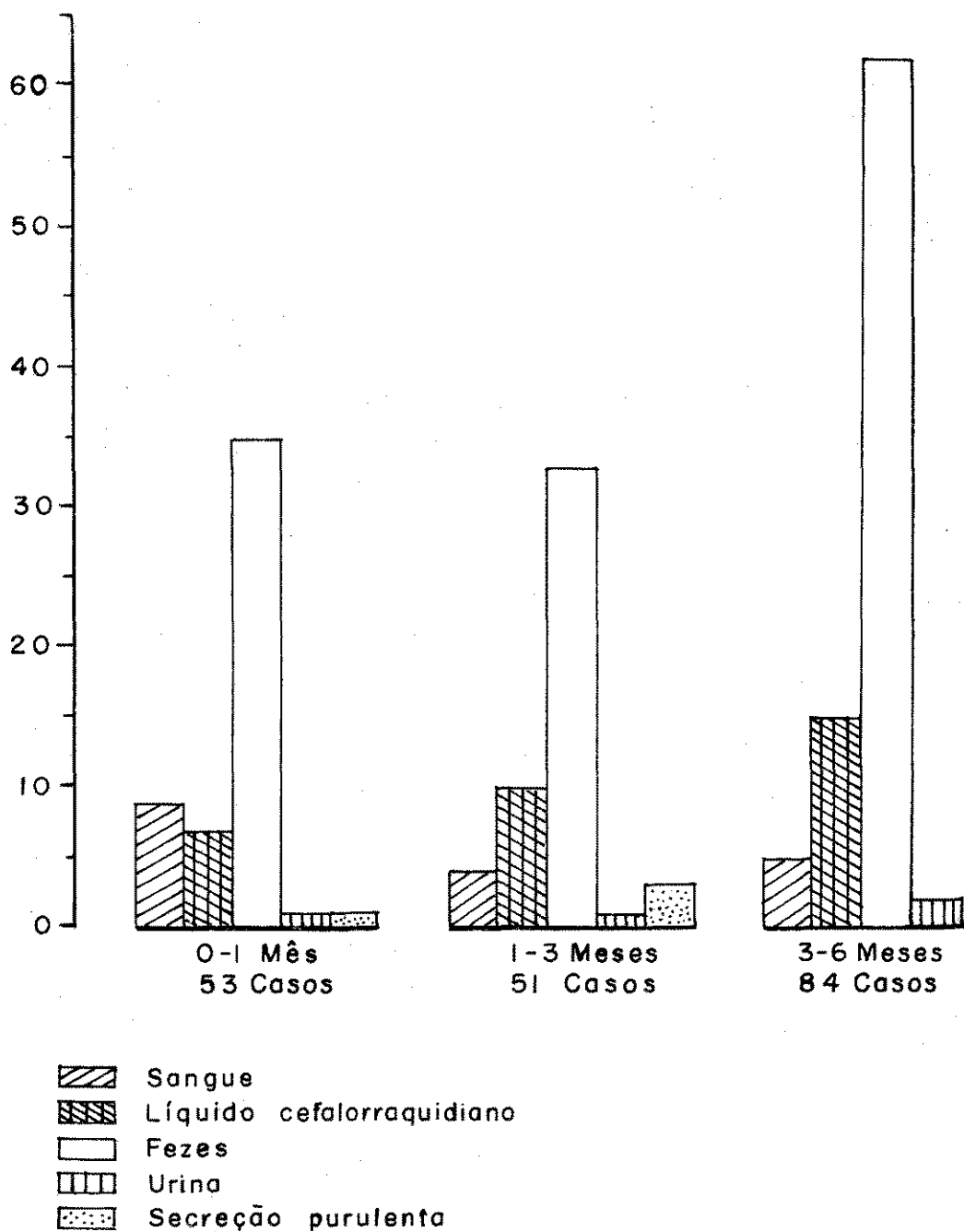


Fig. 3 — Distribuição dos casos de *Salmonella typhimurium* nos grupos etários de 0 a 6 meses.

Com referência à localização extra-enterica (tabela 4) deve ser acentuada a alta frequência verificada especialmente no grupo de 0-6 meses (58 de 69 casos).

Também é marcante a verificação de mortalidade de 92% das crianças com localização meníngea.

Esses dados não permitem pôr em dúvida a patogenicidade da variante em estudo, não só pelo seu poder invasor, como pela alta letalidade que provocou.

A continuarem esses achados, estaria indicada a modificação das técnicas da rotina bacteriológica, com a exclusão da lactose dos meios de isolamento, diferenciais e seletivos, pois o aspecto da colônia é idêntico ao da dos germes do grupo fermentadora lactose.

Das 300 cepas que nos foram enviadas para tipagem, não foi encontrada nenhuma *Salmonella typhimurium* variante lactose-positiva. Provavelmente a razão de tal fato decorre da sistemática habitual de se usarem meios de cultura diferenciais e diferenciais seletivos que contêm lactose e métodos de identificação presuntivos utilizando também este carboidrato.

Mesmo em se isolando muitas colônias, como é o caso específico da pesquisa de *E. coli* G.E.I., essas variantes passariam despercebidas, uma vez que a rápida acidificação da lactose impediria a visualização da produção de H_2S , sendo a colônia identificada como coliforme. Esse fato foi bem demonstrado por VERON & GASSER⁴⁷, ao estudarem a produção de H_2S por enterobactérias; referem que, apesar de o mecanismo íntimo num meio tão complexo ser de difícil determinação, admite-se para fins práticos que a aparente ausência de H_2S é consequência da fermentação rápida da lactose com acidificação do meio. Nessas condições, parte do sulfeto metálico passa novamente a solubilizar-se, de tal maneira que o abaixamento de uma unidade no pH do meio determina aumento de cerca de 100 vezes na solubilidade do sulfeto.

O acerto dessa observação foi comprovado sempre que utilizamos simultaneamente o tríplex açúcar-ferro^{16, 41} e o meio de Kligler³, comparativamente ao meio de Rugai. Obedecendo à metodologia convencional, todos os tubos contendo tríplex açúcar-ferro ou meio

de Kligler seriam descartados ou, quando muito, sujeitos a identificação ulterior apenas orientada para o grupo coliforme.

A tendência de correlacionar a não patogenicidade de uma enterobactéria à sua capacidade de fermentar lactose já se encontra arraigada no raciocínio bacteriológico.

Assim é que TWORT⁴⁶, em publicação sobre a fermentação de açúcares por bactérias do grupo coli-tífico, sugere que um microrganismo patogênico pode ser alterado de tal modo até dar reações fermentadoras de um membro não patogênico do mesmo grupo. Seria então possível a certas bactérias patogênicas do grupo coli-tífico alterarem de tal forma suas características que as tornariam irreconhecíveis.

KAUFFMANN²², em relação a uma variante de *Salmonella anatum* por ele estudada, considerou-a como pertencente ao grupo *Salmonella* porque no seu entender: "Salmonellas são bactérias Gram-negativas, cuja estrutura antigênica permite o enquadramento no esquema de Kauffmann-White".

Já SELIGMANN & SAPHRA³⁹, tendo isolado uma bactéria rápida fermentadora da lactose de um caso fatal de meningite, com provas de patogenicidade em animais e tendo demonstrado sua perfeita identidade antigênica com *Salmonella newington*, não ficaram convencidos de sua classificação por ser fermentadora rápida daquele carboidrato.

KUNZ & EWING²⁵, ao analisarem caso de febre tifóide decorrente de contaminação em laboratório por uma *Salmonella typhi* na qual o caráter de rápida fermentadora de lactose fora induzido artificialmente, chamam atenção para o fato de essa bactéria ser ainda patogênica, necessitando portanto ser manuseada com cuidado. Alertam para a necessidade de se complementarem os processos clássicos de isolamento de patogênicos entéricos com processos seletivos outros, além da fermentação da lactose, tendo em vista que, no caso citado, a bactéria poderia ter se disseminado pela comunidade em casos secundários ou como formas subclínicas e o agente patogênico passar despercebido.

De maio de 1971 a abril de 1972, o número de *S. typhimurium* isoladas na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz correspondeu a 64% das cepas do gênero *Salmonella* classificadas, sendo que a varie-

dade lactose-positiva (tabela 2) representou 65% das amostras isoladas daquele sorotipo.

É provável que a implantação dessa variante em nosso meio tenha ocorrido em maio de 1971, uma vez que o meio de Rugar já vinha sendo usado havia três anos e deveria ela ter sido encontrada naqueles casos em que se procurava isolar *E. coli* G.E.I.

TAUNAY⁴², analisando a prevalência dos sorotipos de salmonelas de origem animal no município de São Paulo em um período de 17 anos (1950-1966), encontrou *Salmonella typhimurium* em apenas 11,12% de todos sorotipos isolados. Essa porcentagem permaneceu praticamente inalterada até 1968, a partir de quando a *S. typhimurium* passou a ser o sorotipo mais freqüente, sendo de 48% em 1968, 85% em 1969 e 40% em 1970. Esta alteração está relacionada com o aparecimento de um surto epidêmico por *S. typhimurium*, descrito por TAUNAY *et alii*⁴⁴, ocorrido de outubro de 1968 a dezembro de 1969 em três hospitais do município de São Paulo que dão atendimento a crianças portadoras de infecção aguda. A mesma bactéria foi isolada do pó de varredura de enfermarias desses hospitais.

O número de casos de infecção pela salmonela ora em estudo, preponderando num grupo etário constituído por recém-nascidos e lactentes nos primeiros seis meses de vida, quando a criança não tem contato direto com o solo e recebe melhores cuidados higiênicos, faz pensar tratar-se de surtos epidêmicos nosocomiais onde outros fatores de transmissão estão presentes.

Já que *Salmonella typhimurium* normalmente não fermenta lactose, esse comportamento bioquímico anômalo apresentado pelas nossas linhagens poderia ser explicado pela presença de um fator F de fertilidade transportando o gene responsável pela fermentação da lactose, denominado F-lac⁺.

Normalmente, população contendo F-lac⁺ mostra colônias segregantes lactose-negativa por "perda" espontânea do plasmídeo F-lac⁺. Com freqüência, ao transplantarmos um clone de *Salmonella typhimurium* lactose-positiva, encontrávamos uma pequena proporção de colônias não fermentadoras da lactose. A análise dessas colônias demonstrou serem elas beta-galactosidase-negativas.

O único fato em aparente desacordo foi a impossibilidade de aumentar a freqüência

de colônias segregantes através da "cura" pelos agentes brometo de tídio e acridina orange e da não transferibilidade do fator F-lac⁺.

No entanto, a ocorrência simultânea de fatores R de resistência múltipla a drogas (ampicilina, estreptomicina, canamicina, clo-ranfenicol e sulfamida), fato esse comprovado através de transferência de duas delas, ampicilina ou associação ampicilina-sulfamida, para *E. coli* F- e a transferência ulterior dessas duas resistências para linhagens de *E. coli* Hfr inibindo a ação do fago MS2, fez supor que esses fatores de resistência a drogas são do tipo fi⁺.

Analisando o comportamento de uma célula contendo os fatores R e F (WATANABE⁴⁸), verifica-se que o fator R pode ser classificado em fi⁺ e fi⁻ (fi = inibição da fertilidade), de acordo com a supressão ou não do fator F.

Se uma célula F⁺ é infectada com o fator Rfi⁺, cessa a função do F pois o fator Rfi⁺ deve produzir um repressor que limita o aparecimento das pontes de conjugação ou F-pilli. Por outro lado, o repressor produzido por um fator Rfi⁺ não atua em células contendo o fator Rfi⁻, pois existem células Rfi⁺ e Rfi⁻. Se uma célula F⁺ é infectada por um fator Rfi⁻, a função F não se altera.

A ausência da inibição de fertilidade dos fatores Rfi⁻ sugere duas possibilidades: que os fatores Rfi⁻ não produzem um repressor da formação de F-pillus, ou que eles podem produzir um repressor para a formação de pillus que não atua sobre o fator F. É conhecido que fatores Rfi⁻ também dão origem a culturas HFT (alta freqüência de transferência) da mesma maneira que os fatores Rfi⁺, indicando isto que os fatores Rfi⁻ também adquirem alta transmissibilidade temporária após sua transferência para novos hospedeiros.

Assim, pode-se inferir que fatores Rfi⁻ produzem um repressor que atua somente sobre eles próprios e não sobre o fator F.

O repressor produzido pelos fatores Rfi⁺ não atua sobre os fatores Rfi⁻, e vice-versa, desde que fatores Rfi⁺ e Rfi⁻ não se inibem quando abrigados numa mesma célula.

A introdução de fatores Rfi⁺ em células F⁺ ou F-lac⁺ resulta em grande redução da capacidade de transferir o fator F, ou F-lac⁺,

enquanto que a frequência de transferência da linhagem H fr é reduzida a 1% ou menos do seu valor normal. Além do mais, essa inibição funcional ocasionada pela penetração de fatores R fi⁺ é acompanhada pela incapacidade de a bactéria receptora adsorver fagos de RNA, específicos para células que apresentam reação sexual masculina ("male-specific-phages"), como é o caso de MS 2.

Assim estaria explicada a não transferibilidade do fator F lac⁺ da *Salmonella typhimurium* em estudo, através do mecanismo de repressão do fator R fi⁺.

5. CONCLUSÕES

O número elevado de achados de *S. typhimurium* lactose-positivas em período relativamente curto, bem como o aparecimento natural dessa variante em nosso meio, está em desacordo com a literatura que nos foi possível consultar, onde a constatação de variantes de salmonelas rápidas fermentadoras da lactose corresponde apenas a casos isolados ou obtidos artificialmente através de manipulação laboratorial.

O número de casos clínicos com localização extra-enterica mostra o caráter invasor dessa variante.

Tendo em vista a alta frequência da salmonela em estudo no grupo etário de 0—6 meses, mais especificamente de 0—1 mês, pode-se presumir que sua origem tenha sido nosocomial, principalmente pelo fato de que a maioria de nossos hospitais pediátricos, além de normalmente superlotados, sofre uma rotação intensa de pacientes.

O caráter lactose-positiva das linhagens de *S. typhimurium* provavelmente poderá decorrer da presença de um plasmídeo F—lac⁺, conforme sugerem evidências genéticas. Essas células apresentam associações com um fator R—fi⁺ que transferta resistência múltipla a drogas (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, canamicina e sulfamida).

Do ponto de vista laboratorial, conclui-se sobre a necessidade já inadiável de serem modificados os métodos convencionais de isolamento e de diagnóstico presuntivo das enterobactérias, com a introdução de outras técnicas que não sejam exclusivamente baseadas na fermentação da lactose.

RIAL-A/381

PESSÓA, G.V.A. — Occurrence of a lactose-positive variant of *Salmonella typhimurium*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 13-28, 1973.

SUMMARY: An outbreak due to a lactose-positive variant of *Salmonella typhimurium* occurred in 1971 in São Paulo city, Brazil, is described. Modification of the standard procedures for isolation and presumptive identification of enterobacteria, introducing techniques other than those based exclusively in lactose fermentation is suggested.

DESCRIPTORS: *Salmonella typhimurium*, variant; *Enterobacteriaceae*; lactose, fermentation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — *Standard methods for the examination of water and sewage*. 9th ed. New York, A.P.H.A., 1946. p. 186.
2. ASSUMPTÃO, L. — Considerações gerais sobre as salmoneloses humanas e a constituição antigênica das salmonelas. *Bolm Inst. Hig.* (São Paulo), 75: 2-20, 1942.
3. BAILEY, S.F. & LACY, G.R. — A modification of the Kligler lead acetate medium. *J. Bact.*, 13: 183-9, 1927.
4. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. clin. Path.*, 45: 493-6, 1966.
5. BULMASH, J.M.; FULTON, M. & JIRON, J. — Lactose and sulfide reactions of an aberrant *Salmonella* strain. *J. Bact.*, 89: 259, 1965.

6. CALAZANS, S.C. & PESTANA, B.R. — Emprego do ácido rosólico no isolamento e identificação dos bacilos do grupo coli-typhico-dysenterico em meios sólidos. *Mems Inst. Butantan*, 7: 285-302, 1932.
7. The DISPENSATORY and Physicians' Pharmacology. 26th ed. Philadelphia, Lippincott, c1967.
8. EASTERLING, S.B.; JOHNSON, E.M.; WOHLTHIETER, J.A. & BARON, L.S. — Nature of lactose-fermenting *Salmonella* strains obtained from clinical sources. *J. Bact.*, 100: 35-41, 1969.
9. EDWARDS, P.R. — *Salmonella* and salmonellosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 66: 44-53, 1956.
10. EDWARDS, P.R. & EWING, W.R. — *Identification of enterobacteriaceae*. 2nd ed. Minneapolis, Burgess publ., c1962.
11. EDWARDS, P.R. & FIFE, M.A. — Cyanide media in the differentiation of enteric bacteria. *Appl. Microbiol.*, 4: 46-8, 1956.
12. FALKOW, S. — Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of *Salmonellae* and *Shigellae*. *Am. J. clin. Path.*, 29: 598-600, 1958.
13. FALKOW, S. & BARON, L.S. — Episomic elements in a strain of *Salmonella typhosa*. *J. Bact.*, 84: 581-9, 1962.
14. FAVA NETTO, C. — Antibiograma. In: LACAZ, C.S. — *Antibióticos*. São Paulo, Prociencx, 1965. p. 195-213.
15. GONZALES, A.B. — Lactose-fermenting *Salmonella*. *J. Bact.*, 91: 1661-2, 1966.
16. HAJNA, A.A. — Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. *J. Bact.*, 49: 516-7, 1945.
17. HOLT-HARRIS, J.E. & TEAGUE, O. — A new culture medium for the isolation of bacillus typhosus from stools. *J. infect. Dis.*, 18: 596-600, 1916.
18. HORMAECHE, E.; PELUFFO, C.A. & ALEPPO, P.L. — Nueva contribución al estudio etiológico de las "diarreas infantiles de verano". Las "Salmonellas" en las enterocolitis de la infancia. *Archos urug. Med. Chirurg.*, 9: 113-62, 1936.
19. HORMAECHE, E.; PELUFFO, C.A.; SURRECO, N.L. & ALEPPO, P.L. — Nuevos estudios sobre las diarreas infantiles de origen infeccioso. *An. Inst. Hig. Montevideo*, 1: 33-45, 1947.
20. KAUFFMANN, F. — *The bacteriology of enterobacteriaceae: collected studies of the author and his co-workers*. Copenhagen, Munksgaard, 1966. 400 p.
21. KAUFFMANN, F. — Die Technik der Typenbestimmung der typhus-Paratyphus Gruppe. *Zentbl. Bakt. ParasitsKde*, Abt. 1. Orig., 119: 152-60, 1930.
22. KAUFFMANN, F. — Über eine lactospaltende *Salmonella*-Variante sowie die Definition der *Salmonella*-Gruppe. *Z. Hyg. InfectkKrankh.*, 119: 352-5, 1937.
23. KRISTENSEN, M. — Mutative bacterial fermentation (8th Communication). *Acta path. microbiol. scand.*, 36: 576-80, 1955.
24. KRISTENSEN, M. & BOJLÉN, K. — Vergärungsmässig definierte Typen des Paratyphus B-Bazillus. *Zentbl. Bakt. ParasitsKde* (Orig.), 114: 86-108, 1929.
25. KUNZ, L.J. & EWING, W.H. — Laboratory infection with a lactose-fermenting strain of *Salmonella typhi*. *J. Bact.*, 89: 1629, 1965.
26. LEIFSON, E. — The fermentation of sodium malonate as a means of differentiating *Aerobacter* and *Escherichia*. *J. Bact.*, 26: 329-30, 1933.
27. LEIFSON, E. — New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. *Am. J. Hyg.*, 24: 423-32, 1936.
28. LE MINOR, L. — *Le diagnostic de laboratoire des entérobactéries*. 3ème ed. St. Mandé, Seine, Tourelle, 1967.
29. LE MINOR, L. & BEN HAMIDA, F. — Avantages de la recherche de la B-galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. *Annls Inst. Pasteur* (Paris), 102: 267-77, 1962.

30. LEVINE, M. — Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. *J. infect. Dis.*, 23: 43-7, 1918.
31. MANUAL of culture media ingredients and other laboratory services. 3th ed. London, Oxoid, 1971.
32. MANUAL of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9th ed. Detroit, Michigan, Difco Laboratories, c1953.
33. MARTIN, W.J. — Enterobacteriaceae. In: BLAIR, J.E.; LENNETTE, E. H. & TRUANT, J.P., ed. — *Manual of clinical microbiology*. Bethesda, Md., Am. Soc. Microbiol., 1970. p. 157.
34. PESSOÁ, G.V.A. & SILVA, E.A.M. — Meios de Rugai e lisina — motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 97-100, 1972.
35. RUGAI, E. & ARAUJO, A. — Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 79-83, 1968.
36. SACHS, A. apud EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — *Identification of enterobacteriaceae*. 2nd. ed. Minneapolis, Burges publ., 1962.
37. SALMONELLA Subcommittee of Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. The genus *Salmonella* Lignières, 1900. *J. Hyg. (Cambridge)*, 34: 333-50, 1934.
38. SCHÜTZE, H. — The paratyphoid B group. *Lancet*, 1: 93-7, 1920.
39. SELIGMANN, E. & SAPHRA, I. — A coliform bacterium with complete antigens of *Salmonella newington*. *J. Immun.*, 54: 275-282, 1946.
40. SIMMONS, J.S. — A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. infect. Dis.*, 39: 209-14, 1926.
41. SULKIN, S.E. & WILLETT, J.C. — A triple sugar-ferrous sulfate medium for use in identification of enteric organisms. *J. Lab. clin. Med.*, 25: 649-53, 1940.
42. TAUNAY, A.E. — Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de S. Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 43-69, 1968.
43. TAUNAY, A.E.; MARTINS, H.; TOPOROWSKI, J.; TOLEDO, L.A. & PEIXOTO, E.S. — Investigações laboratoriais sobre a enterite infantil por *E. coli* G.E.I.. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 18: 45-81, 1958.
44. TAUNAY, A.E.; NOVAES, J.R.C. & PESSOÁ, G.V.A. — Infecções por enterobactérias no município de São Paulo. Provável disseminação por via aérea. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 113-6, 1971.
45. TRABULSI, L.R. & EWING, W.H. — Sodium acetate medium for the differentiation of *Shigella* and *Escherichia* cultures. *Publ. Hlth Lab.*, 20: 137-40, 1962.
46. TWORT, F.W. — The fermentation of glucosides by bacteria of the Typhoid-coli group and the acquisition of new fermenting powers by *Bacillus dysenteriae* and other microorganisms. Preliminary communication. *Proc. R. Soc. (Serie B)*, 79: 329-36, 1907.
47. VÉRON, M. & GASSER, F. — Sur la détection de l'hydrogène sulfuré produit par certaines entérobactériacées dans les milieux dits de diagnostic rapide. *Annls Inst. Pasteur (Paris)*, 105: 525-34, 1963.
48. WATANABE, T. — Transferable drug resistance: the nature of the problem. In: WOLSTENHOLM, G.E. W. & O'CONNOR, M., ed. — *Bacterial episomes and plasmids*. London, Churchill, 1969. p. 81.
49. WHITE, B.P. — The salmonella group. In: INGLATERRA, Medical Research Council — *A system of bacteriology in relation to medicine*. London, Stationery off., 1929. v. 4, p. 86-158.

Recebido para publicação em 25 de maio de 1973.