

Contribución al estudio de *Salmonella Paratyphi B*

POR EL JEFE DE TRABAJOS PRÁCTICOS DE BACTERIOLOGÍA

DR. JOSÉ JULIO MONTEVERDE

Kristensen y Kauffmann (1) señalaron la existencia de cepas de *S. paratyphi B* que tenían la propiedad de fermentar el tartrato de sodio dextrógiro. A diferencia de las *S. paratyphi B* típicas, que se caracterizan por ser tartrato de sodio dextrógiro negativas, producir barrera mucosa y originar cuadros clínicos similares a las tifoideas, estas cepas *S. paratyphi B* tartrato de sodio dextrógiro positivas, presentarían como propiedades más salientes las de no producir barrera mucosa y originar cuadros clínicos de enteritis en sujetos predispuestos y además, desde el punto de vista serológico, diferencias representadas en la variedad Java que posee una sola fase flagelar (IV. V. b.—.)

Es interesante mencionar que las *S. paratyphi B* tartrato de sodio dextrógiro positivas, matan al ratón cuando se las suministra *por os* siguiendo la técnica clásica, hecho este que las separaría de la mayoría de las salmonelas de origen animal.

Las comprobaciones precedentes harían suponer, que aquellas bacterias consideradas provisoriamente como *S. paratyphi B* tartrato de sodio dextrógiro positivas, formarían un grupo intermedio entre las *S. paratyphi B* típicas (tartrato de sodio dextrógiro negativas y productoras de barrera mucosa) y *S. typhi murium* (tartrato de sodio dextrógiro positivas y que no producen barrera mucosa).

Estas últimas consideraciones asumen, evidentemente, un interés más bien teórico, pero es innegable que pueden obtenerse derivaciones prácticas importantes de las que la clínica podrá extraer provechosas sugerencias. En este sentido Challinor y Rhodes (2) confirmando observaciones de Brown y colaboradores (3) y que se refieren principalmente a la falta de acción fermentativa sobre el tartrato de sodio dextrógiro por parte de *S. paratyphi B* contra-

riamente a *S. typhi murium* y otras bacterias de las intoxicaciones alimenticias que son tartrato de sodio dextrógiro positivas, sostienen que la citada prueba bio-química presenta un definitivo valor para efectuar diferenciaciones rápidas, sobre todo en aquellos casos en que por serología se comprueba que las bacterias problema se encuentran en fase 2. Con tal fin los mencionados investigadores ensayan una modificación de técnica para evidenciar la fermentación del tartrato de sodio dextrógiro, logrando efectivamente reducir el tiempo de la prueba a un mínimo de 48 horas.

En vista de estas conclusiones y atentos a los resultados de Kristensen y Kauffmann (1) parecería poco probable en el estado actual de nuestros conocimientos, obtener diferencias en base a la utilización del tartrato de sodio dextrógiro sobre aquellas cepas de *S. paratyphi B* que se caracterizan precisamente por fermentarlo.

Ante los contratiempos señalados parecería acertado considerar la posibilidad de obtener diferencias serológicas entre las cepas de *S. paratyphi B* tartrato de sodio dextrógiro positivas y aquellas consideradas como típicas. Sin embargo Kristensen y Kauffmann (1) utilizando el «mirror test» o prueba de la saturación cruzada de las aglutininas, llegaron a la conclusión de que existe completa identidad antigénica, por lo que la diferencia de tipo bioquímico no iría ligada en este caso, a un cambio en la constitución antigénica capaz de ser evidenciado por serología.

Considerando el problema serológico, se ofrece tentadora la investigación de una nueva fase en aquellas cepas aisladas por De Moor y que se denominan *S. paratyphi B* var. java, caracterizadas por ser monofásicas. Sin ser igual, podría apoyarse en parte este criterio en los trabajos que Brunner y Edwards (4) han realizado sobre *S. cholerae suis* y la variedad kuzendorf (esta última eliminada del esquema serológico de Kauffmann-White) en base a los trabajos que previamente había realizado Gard (5), quien usando la técnica recomendada por Wassén (6) logró obtener fases específicas de cepas Kuzendorf. Bruner y Edwards sobre 54 cepas monofásicas lograron aislar de cada una de ellas una nueva fase, las que fueron idénticas a los factores específicos de *S. cholerae suis* (difásicos). Independientemente Hermann (7) no pudo lograr resultados similares. Además podrían citarse los casos de *S. typhi murium* var. binns, *S. typhi sui* var. voldagsen, *S. thomson* var. berlin, y *S. newport* var. puerto rico, que han sido eliminadas como variantes no específicas de *S. typhi murium*, *S. typhi suis*,

S. thompson y *S. newport*, del esquema serológico de Kauffmann-White (13).

Estas breves consideraciones nos han alentado a estudiar las cepas de *S. paratyphi B* existentes en el Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de Montevideo, insistiendo preferentemente en la fermentación del tartrato de sodio dextrógiro, producción de barrera mucosa y el problema de las fases flagelares artificialmente inducidas.

Para dar cumplimiento a nuestros propósitos realizamos la tarea experimental que a continuación se detalla.

PARTE EXPERIMENTAL

Material usado: Para la realización del presente trabajo se emplearon las cepas K 3, K 4, K 5, K 6, K 7 y K 8 de la colección de Kauffmann; CB 88, CB 33 y CB 43¹ aisladas por Hormaeche y Salsamendi (8) de ganglios de cerdos y b 3779, b 1578, 1695, 6068 y b 3470 aisladas de niños en el transcurso de las investigaciones que sobre etiología de las diarreas infantiles de verano han emprendido Hormaeche y colaboradores.

Todas las cepas fueron sometidas previamente a un control morfológico, bio-químico y serológico. Los resultados obtenidos se consignan en los párrafos y cuadros que siguen.

Caracteres morfológicos y tintoriales.

Bastones de 1-2,5 u de largo por 0,3-0,6 de ancho, extremos redondeados. Sin cápsulas ni esporos. Gram negativos. No ácido resistentes. Móviles.

Condiciones generales de cultivo.

Desarrollan con facilidad en los medios usuales. Las colonias se presentan en general con bordes lisos, superficie brillante, transparentes y homogéneas.

En el medio de Kauffmann al tetracionato desarrollan produciendo enturbiamiento uniforme. En el medio de Kristensen y Jürgens crecen formando en 24 horas y a 37 grados C, colonias de bordes lisos y de superficie brillante de 1/2 a 1 mm. de diámetro. El medio vira al rojo.

Estudio serológico previo.

En todos los casos se utilizaron sueros conteniendo factores aglutinantes purificados por saturación. Mencionaremos sólo aquí, por razones de espacio, la técnica seguida en la preparación de los sueros que más se han utilizado.

- Factor I: Cepa inoculada: *S. paratyphi A* (I. II. a.—) calentada a 100 grados C durante 2 horas. Saturado con *S. paratyphi A* var. Durazzo (II. a.—)
- Factor IV: Cepa inoculada: mezcla de *S. paratyphi B* var. odense (IV. b. 1. 2..) y *S. reading* (IV. eh. 1. 5..) ambas calentadas a 100 grados durante 2 horas.
- Factor V: Cepa inoculada: *S. paratyphi B* (IV. V. b. 1. 2...) calentada a 100 grados durante 2 horas. Saturado con *S. typhi murium* var. copenhagen (IV. i. 1. 2.), y con *S. derby* (IV. fg.—)
- Factor b: Cepa inoculada: *S. paratyphi B* (IV. V. b. 1. 2..), en fase 1. Saturado con *S. heidelberg* (IV. V. r. 1. 2..), en fase 2. *S. muenchen* (VI. VIII. d. 1. 2..) en fase 2 y *S. eastbourne* (I. IX. eh. 1. 5..) en fase 2.
- Factor 1. 2. 3.: Cepa inoculada: *S. newport* var. puerto rico (VI. VIII.—. 1. 2. 3). Saturado con *S. kottbus* (VI. VIII. eh. 1. 5.) calentada a 100 grados C durante 2 horas.
- Factor 2: Cepa inoculada: *S. newport* var. puerto rico (VI. VIII.—. 1. 2..). Saturado con *S. kottbus* (VI. VIII. eh. 1. 5..), *S. anatum* (III. X. XXVI. eh. 1. 6..), *S. cholerae suis* var. Kunzendorf (VI. VII.—. 1. 5..) y *S. bredeney* (I. IV. XXVII. ly. 1. 7..), todas las cepas utilizadas para saturar se emplearon en fase 2.
- Factor 3: Cepa inoculada: *S. newport* var. puerto rico (VI. VIII.—. 1. 2. 3). Saturado con *S. paratyphi B* (IV. V. b. 1. 2..), *S. muenchen* (VI. VIII. d. 1. 2..) y *S. anatum* (III. X. XXVI. eh. 1. 6.), todas en fase 2
- Factor 5: Cepa inoculada: *S. cholerae suis* var. kunzendorf (VI. VII.—. 1. 5..). Saturado con *S. virchow* (VI. VII. r. 1. 2..), *S. anatum* (III. X. XXVI. eh. 1. 6..) y *S. carrau* (VI. XIV. XXIV. y. 1. 7..), todas en fase 2.
- Factor 6: Cepa inoculada: *S. anatum* (III. X. XXVI. eh. 1. 6..) en fase 2. Saturado con *S. cholerae suis* var. kunzendorf

(VI. VII.—. 1.5..), *S. muenster* (III.X.XXVI.ch.1.5..), *S. nyborg* (III.X.XXVI.ch.1.7..), estas tres últimas en fase 2 y *S. wichita* (I.XIII.XXIII.d.—).

Factor 7: Cepa inoculada: *S. bredeney* (I.IV.XXVII.lv.1.7..) en fase 2. Saturada con *S. anatum* (III.X.XXVI.ch.1.6..), *S. muenster* (III.X.XXVI.ch.1.5..), *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* (VI.VII.—.1.5..) y *S. typhimurium* (I.IV.V. i.1.2..), todas en fase 2.

Fases flagelares artificialmente inducidas.

De cada una de las cepas en estudio se efectuó un aislamiento sobre agar-lactosa-tornasol contenido en placas de Petri. Luego de 24 horas de incubación a 37 grados C se pescaron 10 colonias. Cada una de estas colonias fué sembrada en un tubo conteniendo agar inclinado. Los tubos se llevaron a 37 grados C por espacio de 24 horas. A partir de cada uno de los cultivos de los tubos de agar se efectuaron suspensiones espesas en suero fisiológico (antígeno). Este antígeno fué probado por el método de aglutinación rápida frente a los sueros I, IV, V, XII, b, 1.2.3..., 2, 3, 5, 6 y 7.

Obtenida la fase 1 de las cepas en estudio y eliminando aquellos antígenos que aglutinaban frente a factores distintos de b, se realizaron siembras en agar gelatinado agregando el suero flagelar homólogo, es decir, siguiendo la técnica aconsejada por Sven Gard (5) que consiste en efectuar, a partir de la colonia «swarming», un nuevo aislando suspendiendo en suero fisiológico una porción de esta y a partir de la suspensión sembrar una placa de agar-lactosa tornasol. Diez colonias de estas fueron sometidas a serología completa probando en todos los casos con los siguientes

factores aglutinantes: I, II, $\frac{\text{III}}{\text{XIX}}$ IV, V, $\frac{\text{VI}}{\text{XIV}}$ VII, VIII, IX, $\frac{\text{IX}}{\text{XIV}}$ X, XI, $\frac{\text{XIII}}{\text{XXII}}$ $\frac{\text{XIV}}{\text{XXV}}$ XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXV, $\frac{\text{XXI}}{\text{XXVI}}$ XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, eh, lw,

z^{10} , z^{12} , gms, fgt, mt, 1.6..., z^4 , en, gm, c, r, enx z z^6 , y, gpu, gp, z^{14} , i, 1.5..., 1.2.3..., 1.7..., a, goq, gq, fg, u, b, x, f, m, h, gst, p, q, w, nz^{15} z^{17} , 2, 5, 6, 7, 3, t, v, s. Obtenida la otra fase (1.2.3..), siguiendo un procedimiento análogo, pero reemplazando el factor b por 1.2.3.. se trató de lograr la reversibilidad. Lograda esta, lo

que se consiguió en todas las cepas a excepción de K5, se efectuó una nueva inducción en agar gelatinado agregando luego los sueros correspondientes a las fases flagelares halladas (*b* y 1.2.3..). Esta última operación se repitió 5 veces consecutivas y fracasamos en nuestro intento de lograr nuevas fases flagelares. El pasaje de H a O es frecuente y es necesario apelar en estos casos a artificios que favorecen la producción de cilias (siembra en caldo a temperatura ambiente o agar blando). En el caso especial de la cepa K5 no pudimos obtener, siguiendo la técnica mencionada, nuevas fases.

Consideraciones sobre el factor 2:

Observando el Cuadro General se puede apreciar que a excepción de la variedad Java, las demás cepas en estudio son aglutinadas frente al suero flagelar 1.2.3., pero en cambio no lo hacen frente al factor flagelar 2. Este fenómeno lo hemos podido apreciar tanto en las cepas normales como en las poseedoras de fase 2 inducida artificialmente.

Nuestros ensayos a este respecto son muy limitados, pero a simple título de información preliminar, referiremos que hemos hecho actuar el suero aglutinante 2 frente a *S. newport* y *S. typhi murium* en fase 2 y hemos podido comprobar aglutinaciones francas.

De verificarse esto, se podría pensar que la preparación del suero flagelar 2 por inoculación de *S. newport* var. puerto rico (VI. VIII.eh.1.2.3..) y su saturación con *S. kottbus* (VI.VIII.eh.1.5.), *S. anatum* (III.X.XXVI.eh.1.6..), *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* (VI. VII.—.1.5..) y *S. bredeney* (I.IV.XXVII.lv.1.7), todas en fase 2, privaría a este suero del factor común con *S. paratyphi B* y que probablemente no es el factor 2, librando en cambio un factor flagelar común a *S. newport* y *S. typhi murium*, por lo que el actual factor 2 debe ser nuevamente estudiado.

Antes de considerar los resultados obtenidos en el curso de nuestras investigaciones es necesario hacer resaltar que el número de cepas estudiadas, quince en total, no permite extender estos comentarios preliminares. A medida que las contribuciones vayan en aumento es probable que nos encontremos en una situación más ventajosa, sobre todo en lo que respecta al número y será entonces llegado el momento adecuado para efectuar consideraciones más amplias.

Las cepas ensayadas se comportaron distintamente frente al tar-

trato de sodio dextrógiro y así hemos podido verificar la presencia de cepas tartrato de sodio dextrógiro positivas y cepas tartrato dextrógiro negativas de *S. paratyphi B*. Las cepas aisladas de ganglios de cerdos como la mayoría de las aisladas de niños por Hormaeche y sus colaboradores, se han comportado como tartrato de sodio dextrógiro positivas. De igual manera la cepa K5 que corresponde a *S. paratyphi B* var. Java tuvo un comportamiento análogo. No hemos podido obtener fermentación del tartrato de sodio dextrógiro por parte de la cepa b 3779.

Hemos podido comprobar una estrecha correlación negativa entre la fermentación del tartrato de sodio dextrógiro y la producción de barrera mucosa. Ninguna cepa tartrato de sodio dextrógiro positiva fué capaz de originar la producción de barrera mucosa.

Uno de los principales objetivos fué la obtención de nuevas fases mediante la utilización de procedimientos artificiales. Hemos insistido en modo preferente sobre la cepa K5, por ser monofásica (IV.V.b.—), tratando de lograr por inducción artificial nuevas fases. Con la técnica que adoptamos no hemos podido lograr la obtención de nuevas fases.

A título informativo, también preliminar, haremos resaltar que durante el curso de nuestra tarea de inducción artificial de las fases flagelares de *S. paratyphi B* y aunque no precisamente con K5 tuvimos algunos resultados tan sugestivos como desconcertantes; verdaderos trastornos antigénicos que pudieron apreciarse por serología utilizando los sueros conteniendo factores aglutinantes puros. De nuestras observaciones deducimos que el fenómeno de la inducción artificial de las fases flagelares, es actualmente oscuro y si bien es cierto que podemos lograr resultados ciertamente prácticos con la aplicación de las técnicas preconizadas con tal fin, no es menos cierto que desconocemos los mecanismos que contribuyen a favorecer o estimular el fenómeno.

Pensamos que el estudio de las fases flagelares inducidas artificialmente es un terreno adecuado para la investigación y presenta un interés sobre el cual creemos innecesario extendernos en complejas consideraciones. Pero si nos mostramos atentos a algunos de los hechos con que contamos actualmente, tal el caso de las fórmulas triangulares y cuadrangulares en donde la inducción artificial juega importante papel, como asimismo la obtención de fases específicas en salmonelas hasta hace poco tiempo consideradas como monofásicas, parece sensato creer que la solución del mecanismo de la inducción «in vitro» o «in vivo» deberá necesaria-

mente traer aparejado un progreso imposible aún de predecir en el estudio serológico de las bacterias del género *Salmonella*.

NOTA DEL AUTOR:

La mayor parte de la tarea experimental del presente trabajo se realizó en la Sección Bacteriología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de Montevideo a cuyo Jefe el Profesor Estenio Hormaeche agradezco sinceramente la elección del tema y la constante ayuda científica prestada.

Este trabajo se completó en el Laboratorio de la Cátedra de Bacteriología del Instituto de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, mayo de 1941.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- a) Quince cepas de *S. paratyphi B.* aisladas de material humano y animal, han sido objeto del presente trabajo experimental. Se estudiaron los caracteres morfológicos, bioquímicos y serológicos, dando preferente atención a la acción fermentativa sobre el tartrato de sodio dextrógiro, producción de barrera mucosa e inducción artificial de fases flagelares siguiendo la técnica de Sven Gard;
- b) Se ha verificado la presencia de cepas *S. paratyphi B.* tartrato de sodio dextrógiro positivas, las cuales probablemente son de origen animal;
- c) Se ha encontrado una estrecha correlación negativa entre la fermentación del tartrato de sodio dextrógiro y la producción de barrera mucosa;
- d) De acuerdo con los resultados obtenidos no es aconsejable la sola utilización de la fermentación del tartrato de sodio dextrógiro para obtener diferenciaciones rápidas entre *S. paratyphi B.* y *S. typhi murium* cuando se encuentran en fase 2;
- e) Siguiendo la técnica de Sven Gard y utilizando sueros conteniendo factores aglutinantes purificados por adecuadas saturaciones no se han podido lograr fases flagelares distintas de las ya mencionadas en las cepas estudiadas.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

a) Fifteen isolated *S. paratyphi B* strains of human and animal material have been used for the present experimental work. The morphological, biochemical and serological characters have been studied, special attention having been paid to the fermentative action on the tartrate dextrogyrous sodium, a product of mucous barrier and artificial induction of flagellar phases, following the technique of Sven Gard.

b) The presence of positive strains of *S. paratyphi B*. tartrate of dextrogyrous sodium has been identified, which are probably of animal origin.

c) A close negative correlation has been discovered between the fermentation of tartrate of dextrogyrous sodium and the production of a mucous barrier.

d) In accordance with the results obtained it is not advisable to use fermentation of tartrate of dextrogyrous sodium alone, to obtain rapid differentiations between *S. paratyphi B*. and *S. typhi murium* when they are in the second phase.

e) Following Sven Gard's technique, and using serums which contain agglutinated factors, purified by adequate saturations, it has not been possible to obtain different flagellar phases of those already mentioned in the investigated strains.

RESUMEM Y CONCLUSÕES

a) Quinze matas de *S. paratyphi B*. isoladas de material humano e animal, tem sido objeto do presente trabalho experimental. Estudaram-se as características morfológicas, bioquímicas e serológicas, dando preferida atenção a ação fermentativa sobre o tartrato de sodio dextrogiro, produção de barreira mucosa e indução artificial de fazes flagelares, seguindo a tecnica de Sven Gard.

b) Verificou-se a presença de matas de *S. paratyphi B* tartrato de sodio dextrogiro positivas, as quaes provavelmente são de origem animal.

c) Encontrou-se uma estreita correlação negativa entre a fermentação do tartrato de sodio destrogiro e a produção da barreira mucosa.

d) De acordo com os resultados obtidos, não seria aconselhado a só utilização da fermentação do tartrato de sodio dextrogiro para obter-se diferenciações rápidas entre *S. paratyphi B.* e *S. typhi murium* quando encontram-se em fase 2.

e) Seguindo-se a tecnica de Sven Gard e utilizando soros contendo fatores aglutinantes purificados por adecuadas saturações não se tem podido lograr fazes flagelares distintas das já mencionadas em matas estudadas.

BIBLIOGRAFIA

- 1) KRISTENSEN, M. y KLAUFFMANN, F., «Zeit. f. Hyg. und Infekt.», CXX 2, pp. 149-54. (1937).
- 2) CHALLINOR, S. W. y RHODES, A. J., «J. of Hyg.» Vol. XXXIX. N° 6. (Noviembre 1939).
- 3) BROWN, H. C., DUNCAN, J. T. y HENRY, T. A., «J. of Hyg.», Cam. XXIII, I (1924-25).
- 4) BRUNER, D. W. y EDWARDS, P. R., «Amer. J. of Hyg.» Vol. XXX, N° 2. Sec. B. (Sept. 1939).
- 5) GARD SVEN, «Ztschr. f. Hyg.» CXX 59. (1937).
- 6) WASSÉN, A., «Third Int. Cong. f. microb.» N. Y. Sec. VII, p. 632 (1939).
- 7) HERRMANN, D., «Zentralbl. f. Bakt. Abt.» I orig. 143-207. (1939).
- 8) HORMAECHE, E. y SALSAMENDI, R., «Arch. Urug. de Med. Cir. y Espec.» IX, pp. 665-672. (1936).
- 9) BITTER, L., WEIGMANN, F. y HABS, H., «Münch. med. Wschr.», LXXIII, 940. (1926).
- 10) SIMMONS, «J. of Inf. Dis.», XXXIX, p. 209. (1926).
- 11) STERN, W., «Zbl. Bakt.», LXXVIII, p. 481. (1916).
- 12) HOHN, J. y HERMAN, W., «Zeit. f. Hyg.», CXVII, pp. 722-41. (1935).
- 13) «Third Int. Cong. f. microb.», pp. 832-40. (1939).