

## Influencia de la temperatura sobre los antígenos somáticos

POR EL DR. AUGUSTO LEOPOLDO DURLACH

El «mosaico antigénico» del género *Salmonella* fué estudiado primeramente por White (1) y más tarde extendido su estudio por Kauffmann (2) Estos dos autores establecieron una notación especial de las diversas fracciones antigénicas somáticas y flagelares de los tipos que componen dicho género, notación que se conoce con el nombre de «Esquema de Kauffmann-White», y en el cual los antígenos somáticos son designados con números romanos (actualmente del I al XXXIII) y los flagelares con letras minúsculas y con números arábigos, estableciéndose así una «fórmula antigénica» para cada tipo del género.

Casi todas las fracciones antigénicas somáticas se repiten en varios tipos del género y con frecuencia la fórmula antigénica somática es idéntica para muchos de ellos, que sólo se diferencian por sus antígenos flagelares o por sus propiedades bioquímicas.

### ESQUEMA DE KAUFFMANN-WHITE

(tomado de: Monteverde, J. J. y Ferramola, R., An. de la Soc. Cient. Argentina, Mayo 1942, E. V, T. CXXXIII, p. 417)

T I P O	Antígenos «O»	Antígenos «H»	
		Fase 1	Fase 2
<i>Grupo A</i>			
1 S. paratyphi A . . . . .	[I], II, XII	a	—
<i>Grupo B</i>			
2 S. paratyphi B . . . . .	[I],IV,V,XII	b	1,2, . .
3 S. abony . . . . .	[I],IV,V,XII	b	enxz <sup>16</sup>

T I P O	Antígenos «0»	Antígenos «H»	
		Fase 1	Fase 2
4 S. typhimurium	[I],IV,[V],XII	i	1,2
5 S. stanley	IV,V,XII	d	1,2
6 S. heidelberg	IV,V,XII	r	1,2
7 S. chester	IV,[V],XII	eh	enz <sup>17</sup>
8 S. saint paul	[I],IV,V,XII	eh	1,2
9 S. zagreb	IV,V,XII	eh	1,2
10 S. kaposvar	IV,V,XII	e(h)	1,5
11 S. san diego 1	IV,[V],XII	eh	enz <sup>15z17</sup>
12 S. san diego 2	IV	eh	en
13 S. arechavaleta	IV,[V],XII	a	1,7
14 S. reading	IV,XII	eh	1,5
15 S. derby	[I],IV,XII	fg	—
16 S. essen	IV,XII	gm	—
17 S. budapest	[I],IV,XII	gt	—
18 S. brandenburg	IV,XII	lv	enz <sup>15z17</sup>
19 S. bispebjerg	[I],IV,XII	a	enz <sup>16</sup>
20 S. abortus equi	IV,XII	—	enz <sup>16</sup>
21 S. abortus ovis	IV,XII	c	1,6
22 S. abortus bovis	[I],IV,XXVII,XII	b	enz <sup>16</sup>
23 S. bredeney 1	I,IV,[XXVII],XII	lv	1,7
24 S. bredeney 2	[I],IV	lv	1,7
25 S. schleissheim	IV,XXVII,XII	bz <sup>12</sup>	—
26 S. californica	IV	gmt	—
27 S. altendorf	IV,XII	c	1,7
<i>Grupo C</i>			
28 S. paratyphi C	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,(Vi)	c	1,5
29 S. cholerae suis 1	VI <sup>1</sup> ,VII	[c]	1,5
30 S. cholerae suis 2	VI <sup>2</sup> ,VII	[c]	1,5
31 S. typhi suis	VI <sup>2</sup> ,VII	c	1,5
32 S. thompson	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	[k]	1,5
33 S. virchow	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	r	1,2
34 S. oranienburg	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	mt	—
35 S. potsdam	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	lv	enz <sup>15z17</sup>
36 S. bareilly	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	y	1,5
37 S. hartford	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	y	enx
38 S. mikawasima	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	y	enz <sup>15z17</sup>
39 S. montevideo 1	VI <sup>1</sup> ,VI <sup>2</sup> ,VII,..	gms	—

T I P O	Antígenos «0»	Antígenos «H»	
		Fase 1	Fase 2
40 S. montevideo 2	VP, VII	gms.	—
41 S. oslo	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII, ...	a	enzx <sup>16</sup>
42 S. amersfoort	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII, ...	d	enzx <sup>16</sup>
43 S. braenderup	VI <sup>1</sup> , VI <sup>2</sup> , VII, ...	eh	enz <sup>15</sup> z <sup>17</sup>
44 S. newport	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	eh	1, 2, ...
45 S. kottbus	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	eh	1, 5, ...
46 S. bovis morbificans	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	r	1, 5, ...
47 S. oregon	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	d	1, 2, ...
48 S. muenchen	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	d	1, 2, ...
49 S. manhattan	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	d	1, 5, ...
50 S. narashino	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	a	enzx <sup>16</sup>
51 S. glostrup	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	z <sup>10</sup>	enz <sup>15</sup> z <sup>17</sup>
52 S. lichfield	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	lv	1, 2, ...
53 S. duesseldorf	VI <sup>1</sup> , VIII, ...	z <sup>4</sup> z <sup>24</sup>	—
<i>Grupo D</i>			
54 S. typhi	IX, XII, (Vi)	d	—
55 S. enteritidis	[I], IX, XII	gm	—
56 S. dublin	I, IX, XII, ...	gp	—
57 S. rostock	I, IX, XII, ...	gpu	—
58 S. moscow	IX, XII, ...	goq	—
59 S. blegdam	IX, XII, ...	gmq	—
60 S. berta	IX, XII, ...	fgt.	—
61 S. eastbourne	[I], IX, XII, ...	eh	1, 5, ...
62 S. sendai	[I], IX, XII, ...	a	1, 5, ...
63 S. oranimon	I, IX, XII, ...	b	1, 2, ...
64 S. dar es salaam	[I], IX, XII, ...	lw	enz <sup>16</sup> z <sup>18</sup>
65 S. goettingen	IX, XII, ...	lw	enz <sup>15</sup>
66 S. panamá	I, IX, XII, ...	lv	1, 5, ...
67 S. gallinarum	IX, XII	—	—
<i>Grupo E</i>			
68 S. london	III, X, XXXVI	lv	1, 6, ...
69 S. give	III, X, XXXVI	lv	1, 7, ...
70 S. anatum	III, X, XXXVI	eh	1, 6, ...
71 S. muenster	III, X, XXXVI	eh	1, 5, ...
72 S. nyborg	III, X, XXXVI	eh	1, 7, ...
73 S. amager	III, X, XXXVI	y	1, 2, ...

T I P O	Antígenos «O»	Antígenos «H»	
		Fase 1	Fase 2
74 S. zanzibar.....	III,X,XXVI	k	1,5,..
75 S. shangani .....	III,X,XXVI	d	1,5,..
76 S. maleagrisdis.....	III,X	eh	lw
77 S. lexington .....	III,X,XXVI	z <sup>10</sup>	1,5,..
78 S. uganda.....	III,X,XXVI	lz <sup>13</sup>	1,5,..
79 S. vejle .....	III,X,XXVI	eh	1,2,..
80 S. newington .....	III,XV	eh	1,6,..
81 S. zelandia .....	III,XV	eh	1,7,..
82 S. new brunswick.....	III,XV	lv	1,7,..
83 S. illinois .....	III,XV	z <sup>10</sup>	1,5,..
84 S. senftenberg .....	I,III,XIX	gst..	—
85 S. niloese .....	I,III,XIX	d	z <sup>6</sup>
<i>Otros grupos</i>			
86 S. aberdeen .....	XI	i	1,2,..
87 S. rubislaw.....	XI	r	enx
88 S. poona .....	XIII,XXII	z..	1,6,..
89 S. borbeck.....	XIII,XXII	lv	1,6,..
90 S. worthington .....	I,XIII,XXIII	lw	z..
91 S. wichita.....	I,XIII,XXIII	d..	—
92 S. habana.....	I,XIII,XXIII	fg..	—
93 S. carrau .....	VI,XIV,XXIV	y	1,7,..
94 S. onderstepoort .....	[I],VI,XIV,XXV	eh	1,5,..
95 S. hvittingfoss .....	XVI	b	enxz <sup>16</sup>
96 S. gaminara .....	XVI	d	1,7,..
97 S. kirkee.....	XVII	b	1,2,..
98 S. cerro.....	XVIII	z <sup>4</sup> z <sup>23</sup> z <sup>25</sup>	—
99 S. kentucky .....	(VIII)XX	i	z <sup>6</sup>
100 S. minnesota.....	XXI,XXVI	b	enxz <sup>16</sup>
101 S. tel aviv .....	XXVIII	y	enxz <sup>15</sup>
102 S. ballerup .....	XXIX, [Vi]	z <sup>14</sup>	—
103 S. urbana .....	XXX	b	enx
104 S. arizona.....	XXXIII	z <sup>4</sup> z <sup>23</sup> z <sup>26</sup>	—

- ( ) Significa que no es predominante.
- [ ] Significa que puede faltar.
- ... Significa que hay restos antigénicos.

NOTA: Por razones prácticas en el presente esquema no están incluidos los antígenos de menor importancia ni los cambios de estructura obtenidos por inducción artificial. Tampoco se han incluido los *S. coli* (Kauffmann) que poseen antígenos comunes con las bacterias del género *Salmonella*.

Las diversas fracciones antigénicas de una misma bacteria pueden presentar diferencias, no solamente por su comportamiento «in vivo» e «in vitro», de acuerdo con el cual se hace su distinción, sino también en su resistencia frente a ciertas acciones físicas o químicas. Así, por ejemplo, Furth y Landsteiner (3) y Kauffmann (4) han demostrado que la fracción somática V es álcali y ácido-lábil, mientras que la fracción IV, que siempre se halla asociada a la primera, resiste la acción de ácidos y álcalis.

El propósito del presente trabajo consiste en poner en evidencia si la temperatura de ebullición del agua y la de 120° C. (autoclave) es capaz de producir una alteración, apreciable «in vitro», de los antígenos somáticos de algunas bacterias del género *Salmonella*.

Es bien sabido, desde los trabajos de Beyer y Reagh (5) y de Weil y Felix (6), que los antígenos flagerales son térmolábiles. Corrientemente se aprovecha esta labilidad para preparar sueros aglutinantes anti-somáticos, destruyendo o inhibiendo los antígenos flagelares por calentamiento durante dos horas a temperatura de ebullición del agua; al mismo tiempo las suspensiones bacterianas así tratadas dejan de ser aglutinadas por los sueros anti-flagelares correspondientes.

Boivin y Mesrobeanu (7), al referirse a las propiedades físicas de los antígenos glúcido-lípidos, afirman que en solución neutra pueden ser calentados a 100° C. durante media a una hora, sin que, en general, se note modificación apreciable en su constitución química y en sus propiedades biológicas; mantenidos un tiempo largo a 120° C. en el autoclave, a menudo se alteran, perdiendo más o menos completamente su poder antigénico; calentando un complejo glúcido-lípido en medio ácido, se destruye rápidamente.

Basado en estos hechos, y en conocimiento de los trabajos de Furth y Landsteiner y de Kauffmann sobre la álcali y ácido-labilidad de la fracción somática V, puede resultar interesante verificar si esta fracción V y otras fracciones somáticas del género *Salmonella* pueden ser suprimidas por la acción del calor, y obtenerse así suspensiones bacterianas que dejen de ser aglutinadas por los factores anti-somáticos correspondientes a estos antígenos termolábiles.

La supresión de una o varias de las fracciones somáticas del complejo antigénico de una bacteria puede ser aprovechada con distintos fines. Así podría suprimirse o inhibirse uno o varios de los antígenos somáticos de determinada cepa, mejor dicho, de una suspensión de esa cepa, destinada a ser inoculada para producir un suero aglutinante, obteniéndose

en consecuencia un suero que sólo contendría las aglutininas correspondientes al antígeno o a los antígenos que resistieron el calentamiento; es decir, que se podría proceder con esos antígenos somáticos termolábiles en la misma forma en que se suprimen o inhiben los antígenos flagelares, hecho que haría innecesaria la eliminación de las correspondientes aglutininas por absorción.

Un ejemplo puede aclarar esta suposición: si se inocula al conejo, de acuerdo con la técnica clásica, una cepa de salmonela de fórmula somática IV, XII, se obtendrán, como respuesta, en el suero del animal aglutininas para esas fracciones antigénicas IV y XII. Pero si se quiere poseer ahora un suero con aglutininas para la fracción IV solamente, será necesario eliminar por absorción el factor XII, mezclando ese suero IV, XII con una pasta de bacterias que posea el antígeno XII, pero no el IV (a tal efecto se podría usar una salmonela de fórmula IX, XII). Si resultara posible, en cambio, eliminar de la cepa a inocular la fracción XII por un procedimiento previo a la inoculación, en el suero del conejo inoculado aparecería únicamente el factor IV, y se evitaría entonces proceder a la absorción.

Además podría contemplarse la posibilidad de obtener por calentamiento suspensiones bacterianas aglutinables frente a un solo factor antisolómico; y podría ser también aprovechada la labilidad de algunos antígenos somáticos en la absorción de aglutininas.

Las experiencias efectuadas han abarcado solamente una mínima parte de todas estas posibilidades, pues nos hemos limitado a verificar si el calentamiento de suspensiones de bacterias durante cierto tiempo es capaz de modificar las fracciones antigénicas III, IV, V, IX, X, XII y XXVI de algunas cepas del género *Salmonella*, sólo en el sentido de su comportamiento «in vitro» como aglutinógenos frente a los factores aglutinantes correspondientes, obtenidos por adecuadas saturaciones.

#### PARTE EXPERIMENTAL

##### *Material utilizado.*

Fueron utilizadas las siguientes cepas de bacterias, todas ellas correspondientes al género *Salmonella*:

A. — De la colección de F. Kauffmann, existente en el Laboratorio de la Cátedra de Bacteriología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires.

Designación	C E P A	Fórmula antigénica abreviada
K 3	<i>S. paratyphi</i> B 3006	IV,V,XII, b, 1,2,..
K 4	<i>S. paratyphi</i> B 6617	I,IV,V,XII, b, 1,2,..
K 5	<i>S. paratyphi</i> B var. Java	IV,V,XII, b, —
K 13	<i>S. typhimurium</i> (O-form) 3173	IV,V,XII, —, —
K 15	<i>S. stanley</i> 7855	I,IV,XII, d, 1,2,..
K 16	<i>S. heidelberg</i>	IV,V,XII, r, 1,2,..
K 17	<i>S. chester</i>	IV,V,XII, eh, enz <sup>17</sup>
K 19	<i>S. reading</i>	IV,XII, eh, 1,5,..
K 21	<i>S. derby</i> 15145	I,IV,XII, fg., —
K 25	<i>S. bispebjerg</i> 9447	I,IV,XII, a, enz <sup>16</sup>
K 59	<i>S. typhi</i> 2 V	IX,XII,Vi, d, —
K 67	<i>S. moscow</i> 27	IX,XII, goq, —
K 68	<i>S. blegdam</i> 22	IX,XII, gmq., —
K 75	<i>S. pullorum</i> 971	IX,XII, —, —
K 78	<i>S. anatum</i> 293	III,X,XXVI, eh, 1,6,..
K 79	<i>S. muenster</i> 4546	III,X,XXVI, eh, 1,5,..
K 80	<i>S. nyborg</i> 1527	III,X,XXVI, eh, 1,7,..
K 83	<i>S. shangani</i> 5630	III,X,XXVI, d, 1,5,..
K 110	<i>S. san diego</i> 123	IV,V,XII, eh, enz <sup>15z</sup> <sup>17</sup>

B. — Cepas de *S. pullorum* (IX,XII, —, —) aisladas y clasificadas por Monteverde y Simeone en el Laboratorio de la Cátedra de Bacteriología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires (trabajo en realización): M 3; M 8; M 11; M 15; M 16 y M 17; además M 59, M 61, M 65 y M 72, aún no clasificadas, pero que aglutinaban con los sueros IX,  $\frac{IX}{XII}$  y IV/V/XII, y no aglutinaban con los sueros conteniendo los factores puros IV y V (es decir, de probable fórmula somática: IX,XII).

#### Procedimiento.

Cada cepa era repicada a un tubo de agar inclinado, que se incubaba durante 24 horas a 37° C. De este cultivo se obtenía una suspensión opalescente, introduciendo en el tubo un volumen de solución fisiológica estéril y agitando fuertemente.

Esta suspensión se probaba frente a los sueros conteniendo los factores anti-somáticos correspondientes a su fórmula antigénica. Hemos

utilizado la aglutinación macroscópica rápida, de acuerdo con la técnica corriente, que consiste en colocar sobre una lámina de vidrio cuadrada una gota de cada suero y una gota de antígeno junto con cada gota de suero; se mezclaban bien y los resultados se leían sobre el aglutinoscopio; solamente se tomaban en cuenta las aglutinaciones que aparecían como positivas dentro de los 3 minutos y se desechaba la cepa si esta no aglutinaba, o lo hacía en forma dudosa, o muy lentamente, con el factor que interesaba en ese momento. Al mismo tiempo se mezclaba también, sobre la lámina de vidrio, una gota de la suspensión con una gota de una solución de tripaflavina al 1/2000 en solución fisiológica, con el fin de poder descartar las cepas en variación «R».

Si el suero aglutinaba a la cepa en forma franca, a partir del tubo de agar se sembraba una botella de fondo plano (conteniendo agar simple); para ello se agregaba el tubo de agar más solución fisiológica estéril, hasta llenarlo casi por completo, se agitaba y se introducía toda la suspensión en la botella. Esta se dejaba un rato en reposo, en forma que la suspensión cubriese bien toda la superficie del agar y luego se la llevaba a incubación a 37° C. durante 2 días. (En la estufa, las botellas se mantenían invertidas, con el agar hacia arriba, de manera que la solución fisiológica no cubriese ya la superficie de cultivo).

Después de 2 días de incubación a 37° C., la botella se retiraba y el cultivo obtenido se desprendía en la forma corriente, utilizando la misma solución fisiológica que aún contenía. Se obtenía así una suspensión densa de bacterias, de concentración aproximadamente igual al antígeno de Huddleson de *Br. abortus*; es esta la concentración más adecuada para ser usada como «antígeno» en reacciones de aglutinación rápida.

Esta suspensión bacteriana era nuevamente probada frente a los sueros aglutinantes correspondientes y a la acción de la tripaflavina, en aglutinación macroscópica rápida, para poder comparar estas aglutinaciones, efectuadas antes del calentamiento, con las que se hacían durante y después del mismo.

La suspensión de la botella se pasaba a dos tubos de ensayo: uno era destinado a ser calentado a temperatura de ebullición del agua, y el otro para ser calentado a 120° C. en el autoclave.

El calentamiento a temperatura de ebullición del agua se hacía en baño-maría hirviendo. Este se llevaba primeramente a ebullición, luego se introducían los tubos, (provistos con su tapón de algodón) y se mantenía el baño en ebullición lenta. En estas circunstancias el termómetro acusaba entre 97° y 99° C., con pequeñas oscilaciones. (El termómetro no se introducía directamente en el agua, sino que se le colocaba dentro de un tubo de ensayo con solución fisiológica).



B. — Influencia de la temperatura sobre la fracción antigénica V

TIPO	Designación de la cepa	Fórmula antigénica somática abreviada	Aglutinación con suero V								
			antes de calentar	después de calentamiento a							
				Temperatura de ebullición del agua durante				120° C. durante			
1h.	2h.	3h.	4h.	25'	50'	75'	100'				
S. paratyphi B	K 3	IV,V,XII	+	+	+	±	—	+	±	—	×
S. paratyphi B	K 4	I,IV,V,XII	+	+	—	×	×	+	+	—	×
S. paratyphi B	K 5	IV,V,XII	+	+	+	±	×	×	×	×	×
S. typhimurium	K 13	IV,V,XII	+	±	—	×	±	±	±	—	×
S. stanley	K 15	IV,V,XII	+	+	+	+	—	+	±	—	×
S. heidelberg	K 16	IV,V,XII	+	+	+	+	—	×	×	×	×
S. chester	K 17	IV,V,XII	+	+	±	±	—	—	—	—	×
S. san diego	K 110	IV,V,XII	+	+	+	—	+	+	—	—	×

C. — Influencia de la temperatura sobre la fracción antigénica XII

TIPO	Designación de la cepa	Fórmula antigénica somática abreviada	Aglutinación con suero IX XII								
			antes de calentar	después de calentamiento a							
				Temperatura de ebullición del agua durante				120° C. durante			
1h.	2h.	3h.	4h.	25'	50'	75'	100'				
S. paratyphi B	K 3	IV,V,XII	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	×
S. paratyphi B	K 5	IV,V,XII	+	(+)	(+)	(+)	+	×	×	×	×
S. heidelberg	K 16	IV,V,XII	+	(+)	(+)	(+)	(+)	×	×	×	×
S. reading	K 19	IV,XII	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	×
S. derby	K 21	I,IV,XII	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	×
S. san diego	K 110	IV,V,XII	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	×

GRUPO D.

A. — Influencia de la temperatura sobre la fracción antigénica IX

TIPO	Designación de la cepa	Fórmula antigénica somática abreviada	Aglutinación con suero IX								
			antes de calentar	después de calentamiento a							
				Temperatura de ebullición del agua durante				120° C. durante			
1h.	2h.	3h.	4h.	25'	50'	75'	100'				
S. typhi	K 59	IX,XII	+	+	+	+	(+)	+	+	×	(+)
S. moscow	K 67	IX,XII	+	+	+	+	+	+	+	×	+
S. blegdam	K 68	IX,XII	+	+	+	+	(+)	+	+	×	(+)
S. pullorum	K 75	IX,XII	+	+	+	+	(+)	+	+	×	(+)
»	M 3	IX,XII	+	+	+	+	(+)	+	+	×	(+)
»	M 8	IX,XII	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
»	M 11	IX,XII	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
»	M 15	IX,XII	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
»	M 16	IX,XII	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
»	M 17	IX,XII	+	+	+	+	(+)	+	+	×	(+)
S. pullorum (?)	M 72	IX,XII	+	+	+	+	+	+	×	×	×



C. — *Influencia de la temperatura sobre la fracción antigénica XXVI*

TIPO	Designación de la cepa	Fórmula antigénica somática abreviada	Aglutinación con suero XXI XXVI								
			antes de calentar	después de calentamiento a							
				Temperatura de ebullición del agua durante				120° C. durante			
1h.	2h.	3h.	4h.	25'	50'	75'	100'				
S. anatum.....	K 78	III,X,XXVI	+	+	-	-	-	±	-	-	-
S. muenster.....	K 79	III,X,XXVI	+	+	+	-	-	+	+	-	-
S. shangani.....	K 83	III,X,XXVI	+	+	-	-	-	+	+	-	-

*Explicación de los signos usados en los cuadros precedentes:*

- + Significa aglutinación franca y dentro de los 5 minutos.
- ± Significa aglutinación dudosa.
- Significa reacción negativa.
- (+) Significa que la aglutinación tarda en presentarse unos 15 minutos después de mezclados el suero y la suspensión.
- × Significa que no se hizo.

*Resumen y discusión de los resultados.*

El estudio de los resultados obtenidos nos permite afirmar que las fracciones antigénicas III, IV y X, (al menos en las cepas con que trabajamos) pueden ser consideradas como estables (en cuanto a su aglutinabilidad) frente al calentamiento a temperatura de ebullición del agua y a 120° C., durante 4 horas y 75 a 100 minutos, respectivamente. Se notó, eso sí, que después de los primeros tiempos de calentamiento la aglutinación ya no era instantánea (como antes del calentamiento) pero se presentaba siempre dentro de los 5 minutos y en forma franca y bien evidente.

En cambio las fracciones V, XII y XXVI presentaban alteraciones apreciables. Después de cierto tiempo, variable con la cepa, el suero con factor aglutinante V dejaba de aglutinar la suspensión calentada (que antes del calentamiento aglutinaba en forma franca con ese mismo suero). Con frecuencia se notaba que la aglutinabilidad frente al suero V se perdía en forma progresiva, presentándose las aglutinaciones que se hacían después de cada tiempo de calentamiento, cada vez menos intensamente y en forma cada vez más dudosa. En un solo caso (K 5) la suspensión siguió aglutinando después de cuatro horas de calentamiento a temperatura de ebullición del agua, si bien en forma débil y dudosa.

También ha sido posible alterar la fracción antigénica XXVI por acción de la temperatura, pues las suspensiones dejaban de ser aglutinadas por el suero XXI, XXVI después de una o dos horas de temperatura de ebullición del agua y de 25 a 50 minutos a 120° C.

En cuanto a la fracción antigénica XII, la influencia de la temperatura es bien evidente. Antes del calentamiento, en todos los casos las suspensiones aglutinaban en forma instantánea y muy franca con el suero conteniendo el factor aglutinante XII. Pero después de cierto tiempo de calentamiento, según la cepa, una vez puestos en contacto y mezclados el suero y la suspensión, al principio no se apreciaba reacción alguna; después de unos minutos recién aparecía esta en forma parcial, intensificándose cada vez más, para, por último, y al cabo de unos 15 a 20 minutos, presentarse en forma muy franca. La temperatura determina, pues, un evidente retardo en la aglutinabilidad por el suero XII, pero no la suprime ni la debilita. Al respecto hacemos notar que no hemos observado diferencias apreciables en el comportamiento de la fracción XII asociada a las fracciones IV y V (grupo B del esquema de Kauffmann-White) y la misma fracción antigénica asociada a la fracción IX (grupo D del mismo esquema).

La acción de la temperatura sobre la fracción antigénica IX aparece ser algo irregular, pues en algunos casos se comportaba en la misma forma que las fracciones III, IV y X, es decir, como termo-estable; en otros casos, en cambio, se comportaba como la fracción XII, dando aglutinaciones tardías después de calentamientos prolongados.

Es cierto que los ensayos efectuados no son lo suficientemente numerosos como para hacer deducciones categóricas, pero al menos permiten deducir que la termo-estabilidad de los antígenos somáticos (aceptada como un hecho desde los trabajos de Beyer y Reagh) tiene algunas excepciones, en lo que se refiere a la aglutinabilidad de las suspensiones calentadas de ciertas cepas del género *Salmonella* frente a determinados sueros aglutinantes.

La presencia de la fracción antigénica XII, tanto en las especies del grupo B, como en las del grupo D del esquema de Kauffmann-White, entorpece en cierto modo la eficacia de la utilización del «antígeno» de *S. pullorum* en el diagnóstico de aves portadoras de este germen o de *S. gallinarum*, pues también las portadoras de *S. typhimurium* o de otras especies del grupo B (IV, V, XII) acusan reacción positiva frente a dicho «antígeno»; y viceversa, la presencia de esa fracción XII dificulta el descubrimiento de portadoras de, por ejemplo, *S. typhimurium* (IV, V, XII) con un «antígeno» preparado con este germen, pues todas las aves

portadoras de *S. pullorum* y de *S. gallinarum* dan reacción positiva con él (datos inédito de Monteverde y Simeone). Antes de comenzar este trabajo abrigamos la esperanza de poder suprimir la fracción XII de los «antígenos», de manera que estos quedaran constituidos por fracciones IX solamente los del grupo D, y por fracciones IV,V solamente los del grupo B, y así poder distinguir más claramente entre los portadores de gérmenes de uno y otro grupo. Pero lo único que conseguimos fué retardar la aglutinación de las suspensiones frente al suero conteniendo el factor XII; este hecho puede, sin embargo, presentar alguna ventaja, pues una aglutinación retardada del «antígeno», frente al suero de un ave sospechosa, indicaría que el «antígeno» reacciona frente al factor aglutinante XII, y que en el suero en cuestión no existen los otros anticuerpos (IX o IV,V, según el caso) que definen el grupo.

El hecho de haber obtenido, por calentamiento, suspensiones de bacterias que ya no aglutinan frente a los sueros conteniendo determinados factores aglutinantes (V y XXVI) demuestra que estos antígenos somáticos sufren una evidente alteración por influencia de la temperatura, pues dejan de funcionar «in vitro» como tales. Pero no sabemos si esta alteración también abarca sus propiedades aglutinogénicas «in vivo», y si lo hace, hasta qué punto quedan alteradas, ya que podría haber una completa supresión del aglutinógeno, o bien producirse un cambio en la especificidad inmunológica de esos antígenos supuestos lábiles.

#### A P E N D I C E

##### *Preparación de los sueros aglutinantes anti-somáticos.*

Se elige la cepa que posee el aglutinógeno correspondiente al factor aglutinante que se desea obtener y se verifica si se halla en variación «S» mediante aglutinación macroscópica rápida frente a una solución de tripaflavina al 1:2000. Se siembra un tubo de agar inclinado y se lleva 24 horas a incubación a 37° C. Obtenido un buen desarrollo se agrega un volumen de solución fisiológica estéril al tubo, se agita y se obtiene así una suspensión opalescente de bacterias, que se prueba por aglutinación macroscópica rápida frente al suero que contiene el factor aglutinante que se quiere preparar, y se prueba nuevamente frente a la solución de tripaflavina. Si la cepa aglutina en forma franca con el suero y no aglutina con la tripaflavina, a partir de esa misma suspensión se prepara el antígeno para inocular, agregando solución fisiológica estéril hasta obtener una suspensión que contiene unas 2000 millones de bacterias

por cc. (nefelometría). Este antígeno se somete a calentamiento a temperatura de ebullición del agua durante dos horas, para destruir los antígenos flagelares, cuando se trata de una cepa ciliada.

Como productor de suero se usa el conejo adulto joven, al que se le inocula el antígeno por vía endovenosa en cantidades de 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3 y 4 cc., con dos a cuatro días de intervalo. Después de la última inoculación se dejan pasar 10 a 12 días y, previo ayuno de 24 horas, se sangra el conejo a blanco por la arteria carótida. La sangre se recoge en un frasco estéril que queda en reposo durante 24 horas, para dar lugar a la formación del coágulo. Se separa el suero por sifonaje aséptico y se titula el suero por aglutinación macroscópica lenta y rápida, con la misma cepa inoculada.

Para obtener factores aglutinantes puros, se mezcla el suero con una pasta de bacterias de cepas que contienen las fracciones antigénicas correspondientes a los factores aglutinantes que se quieren eliminar del suero. Para obtener esta pasta de bacterias se cultiva la cepa (debidamente controlada frente a los sueros aglutinantes y la solución de tripaflavina) durante 48 horas a 37° C., sobre agar simple en grandes cristalizadores tapados con gaza, algodón y papel; el cultivo se raspa con una espátula y se mezcla con el suero a saturar. La mezcla se mantiene durante 24 horas en la cámara fría y se separa el suero por centrifugación. Para verificar la eliminación de esos factores, se prueba el suero saturado en aglutinación macroscópica rápida frente a una suspensión de la cepa utilizada en la saturación. Si el suero sigue aglutinando a esta cepa, debe repetirse la saturación.

A continuación se indican las cepas con que fueron preparados y saturados los sueros aglutinantes usados en el presente trabajo:

Factor	Cepa inoculada	Saturado con:
IV	S. brandenburg (IV,XII) calentada	S. pullorum (IX,XII)
V	S. typhimurium (O-form) (IV,V,XII)	S. typhimurium, var. Copenhagen (IV,XII)
III XIX	S. senftenberg (I,III,XIX) calentada	S. paratyphi A (I,II)
X	S. anatum (III,X,XXVI) calentada	S. newington (III,XV) y S. minnesota (XXI,XXVI)

Factor	Cepa inoculada	Saturado con:
XXI	S. minnesota (XXI,XXVI)	
XXVI	calentada	
IX	S. gallinarum (IX,XII)	S. typhimurium (IV,V,XII)
IX	S. pullorum (IX,XII)	
XII		
IV,V,XII	S. chester (IV,V,XII)	
ch enx <sup>17</sup>		

RESUMEN Y CONCLUSIONES

a) Se ha investigado la influencia de la temperatura sobre fracciones antigénicas somáticas de 29 cepas pertenecientes al género *Salmonella*.

b) Ha sido posible alterar en tal forma la fracción antigénica V y la fracción XXVI, que después de determinado tiempo de calentamiento dichas fracciones dejaron de funcionar como tales frente a los sueros aglutinantes correspondientes.

c) En cuanto a la fracción antigénica XII, se notó un evidente retardamiento de la aglutinación de las suspensiones calentadas, tanto en cepas del grupo B como del grupo D del esquema de Kauffmann-White.

d) Las fracciones III, IV y X no evidenciaron mayores alteraciones, en lo que a su aglutinabilidad se refiere, por acción de las temperaturas indicadas durante los tiempos que duró el calentamiento.

e) La fracción antigénica IX en algunos casos no evidenció alteraciones, mientras que en otros casos se observó retardamiento de la aglutinación después de calentamiento prolongado.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

*Influence of temperature on somatic antigens*

a) We have studied the influence of temperature on antigenic somatic fractions of 29 strains of the genus *Salmonella*.

b) It has been possible to alter the antigenic fraction V, and fraction XXVI in a way, that after a certain time of heating the said fractions did not function any longer as such in reaction to the corresponding serums.

c) We have observed with regard to the antigenic fraction XII, an evident retardment of agglutination of heated suspensions, in the strains of group B as well as in those of group D of the Kauffmann-White's scheme.

d) Fraction III, IV, and X did not show any great changes with regard to their agglutinability, through the action of temperatures indicated during the different periods of time the heating lasted.

e) In some cases the antigenic fraction IX did not show alterations, while in other cases we have observed retardation of agglutination after prolonged heating.

#### RESUMO E CONCLUSÕES

##### *Influencia da temperatura sobre os antígenos somáticos.*

a) Investigou-se a influencia da temperatura sobre frações antigênicas somáticas de 29 cepas pertencentes ao genero *Salmonella*.

b) Foi possível alterar em tal forma a fração antigênica V e a fração XXVI, que, depois de determinado tempo de aquecimento, ditas frações deixaram de funcionar como tais em presença dos soros aglutinantes correspondentes.

c) Quanto à fração antigênica XII, notou-se um evidente retardamento na aglutinação das suspensões aquecidas, tanto em cepas do grupo B, como do grupo D do esquema de Kauffmann-White.

d) As frações III, IV e X não revelaram maiores alterações, no que concerna à sua aglutinabilidade, por ação das temperaturas indicadas durante os tempos que durou o aquecimento.

e) A fração antigênica IX, em alguns casos, não revelou alterações, enquanto que, em outros casos, se observou retardamento da aglutinação, depois de aquecimento prolongado.

#### BIBLIOGRAFÍA

- TOPLEY, W. W. C., y WILSON, G. S.: "*The Principles of Bacteriology and Immunology*", Segunda Edición, 1937, Londres.
- (1) WHITE, P. B., Spec. Rep. Ser. med. Res. Council, Londres, N° 103 (1926) Journ. Path. Bact., 32, (1929), p. 85; «A System of Bacteriology in Relation to Medicine», (Med. Res. Coun.), 4, (1929), p. 86. (Citado por Topley y Wilson: op. cit.).
- (2) KAUFFMANN, F., Ergeb. Hyg. Bakt. Immunit. exp. Ther., 15, (1934), p. 219. (Citado por Topley y Wilson: op. cit.).

- (3) FURTH, J. y LANDSTEINER, K., Journ. exp. Med., 49, (1929), p. 727. (Citado por Boivin y Mesrobeanu: op. cit.).
- (4) KAUFFMANN, F., Zeitschr. Hyg. und Infektr., 118, (1936), p. 318. (Citado por Boivin y Mesrobeanu: op. cit.).
- (5) BEYER, H. G. y REACH, A. L., Journ. med. Res., 12, (1904), p. 313. (Citado por Topley y Wilson: op. cit.).
- (6) WEIL, E. y FÉLIX, A., Wiener Klin Wochenschr., 30, (1917), p. 1509. (Citado por Topley y Wilson: op. cit.).
- (7) BOIVIN, A. y MESROBEANU, L., Ann. Inst. Pasteur, 61, (1938), p. 426.